

Maria Fátima Guarizo Klingbeil

**Ação do *Viscum album* em cultivo celular de carcinoma
epidermoide de cabeça e pescoço**

**São Paulo
2010**

Maria Fátima Guarizo Klingbeil

**Ação do *Viscum album* em cultivo celular de carcinoma
epidermoide de cabeça e pescoço**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obter o título de
Doutor, pelo programa de Pós Graduação em
Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

**São Paulo
2010**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Klingbeil, Maria Fátima Guarizo

Ação do *Viscum album* em cultivo de células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço / Maria Fátima Guarizo Klingbeil; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2010.

161p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Carcinoma de células escamosas – *Viscum album* - Ação. 2. Patologia bucal. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Klingbeil MFG. Ação do *Viscum album* em cultivo celular de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Patologia Bucal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar dedico esse trabalho aos pacientes, que se encontram fora dos fatores etiológicos extrínsecos conhecidos (exceto HPV e U.V.), e que significam as razões pelas quais nos dedicamos tanto à pesquisa, em busca de possibilidades de melhorar, de alguma forma, o prognóstico, formas de tratamento e principalmente a qualidade de vida e sobrevida desses pacientes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior, agradeço com especial carinho, porque acima de tudo, foi a primeira pessoa que me proporcionou a possibilidade do desenvolvimento deste trabalho, sempre me incentivando e acrescentando novas idéias ao desenvolvimento do mesmo. Agradeço por ser a pessoa que é, além de pesquisador apaixonado pela ciência, acima de tudo um grande “PATOLOGISTA” que não só o departamento, mas a Universidade de São Paulo deveria se orgulhar. Obrigada pela paciência, obrigada pelos papos, obrigada pelas risadas (que não foram poucas) e obrigada pelas discordâncias, afinal, elas fazem parte. Foi muito bom conviver ao seu lado e espero que nossos caminhos sempre continuem se encontrando.

À Prof. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa, a quem devo inúmeros agradecimentos, além de ser uma profissional de grande capacidade, é uma das pessoas mais justa, respeitável e nobre de que eu tenha conhecimento. Suzana, adorei ter convivido com você durante esses três anos. Obrigada por toda ajuda e certamente essa tese também é sua.

Aos professores do departamento: Marina H. C. G. de Magalhães, Fábio D. Nunes, Marília T. Martins, Andrea Mantesso, Karem L. Ortega, Luciana Correa e Nathalie P. M. de Rezende, muito obrigada por todos os ensinamentos e convivência prazerosa ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr Fernando Soares e ao Ivan (Hospital A. C. Camargo) muito obrigada pela doação dos anticorpos, pois sem isso eu jamais teria conseguido terminar minhas reações. Vocês não têm idéia da dimensão dessa ajuda. Serei eternamente grata.

Às nossas queridas: Zilda (uma das criaturas mais doce que já conheci), Néia, Nair, Elisa (quanto papo gostoso), Adriana, Bia, Edna e ao querido Juvani, muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim, cada uma ou um, na sua particularidade. Digo à todos que foi absolutamente um imenso prazer ter convivido com vocês, e acrescento que sentirei muita saudade.

Aos colegas: Flávia, por toda ajuda, competência, profissionalismo e amizade, à Kati, M^a Fernanda e Camila, além da amizade, por terem também compartilhado tanta informação, e à todos os demais colegas, oxalá não esqueça de ninguém:

Felipe Daltoé, Lucyene, Fábio P., Fabio Coracin, Karin, Yonara, Ronald, Roberto, Fabi, Márcio, Renata Caraméz, Renata Acay, Thaís, Paulo Bráz, Paulo S. S. S., Alexandra, Juliana, Michella, Gabi, Ana Cláudia, Ana Rita, Gustavo, Joelma, José Henrique, Fernando, Marco Túlio, e provavelmente alguém que eu tenha esquecido. À Aluana e à Camila Fragata: pela convivência agradável, por toda amizade e carinho.

À Érika, por sempre ter compartilhado os momentos mais tensos no laboratório, com sua frase mais utilizada: “fica calma Fá, tudo vai dar certo”. Obrigada pela amizade.

Ao Brunno e à Fernanda, por terem compartilhado tantas dificuldades e facilidades ao longo desses três anos. Pelos meus primeiros passos e introdução ao departamento e especialmente ao Brunno, pelos ensinamentos em patologia.

Não poderia me esquecer do Helder, pelos primeiros ensinamentos em imuno e pela amizade.

À Luciana por ter compartilhado tantos chazinhos, papinhos e também muitos conhecimentos, além de uma grande amizade. Obrigada Lu!

À Aline por ter me aguentado, compartilhado ensinamentos e, ao mesmo tempo, ter me aturado com tantas idéias, por vezes, adversas.

Ao Felipe Sperandio, por ter me ajudado tanto com seu excelente inglês, pela máquina fotográfica, pela paciência e principalmente pelas suas histórias, dos orgotopongos, ao sequestro do ônibus....e pelas inigualáveis e incomparáveis risadas.

E finalmente à minha grande amiga Fernanda “Indignação” Giudice, por você ser simplesmente quem você é! Uma pessoa de grande sabedoria e capacidade intelectual, pela sua idoneidade, firmeza, pelo seu caráter, senso de justiça, pela demonstração de amizade, pelo seu carinho, profissionalismo, por toda a sua ajuda e acima de tudo pela sua amizade. Você sabe que você irá muito longe e eu sou sua fã!!! Estarei sempre torcendo por você. Obrigada por tudo Fê! Foi um imenso prazer ter compartilhado esses anos com você e espero que nossa amizade não pare por aqui.

À minha querida ex e ao mesmo tempo eterna orientadora, Monica, amiga e parceira profissional, mais uma vez, muito obrigada por toda ajuda em mais essa etapa. Você

sabe da minha eterna admiração e espero (e tenho certeza) que sempre poderei continuar contando com sua ajuda e esclarecimentos, além das inúmeras idéias.

À Andrea pela ajuda em algumas correções e inúmeras dicas.

À Patrícia Severino, pelo exemplo de profissionalismo, sabedoria e competência. Obrigada por toda ajuda, que não foram poucas, e espero que possamos continuar compartilhando muitos momentos, muitos trabalhos e amizade.

Ao Rodrigo, pela ajuda inicial com as reações de PCR.

Ao Luíz Sardinha, pela imensa colaboração com a Citometria de Fluxo.

Ao grande responsável pela realização deste trabalho: Dr. Nilo Gardin, pela dedicação, profissionalismo e toda ajuda. Querido Nilo, se não fosse você, esse trabalho jamais teria sido realizado. Te devo muito!!!

Ao Dr. Ricardo Ghelman, pelas idéias inovadoras que muito acrescentaram ao trabalho, enriquecendo-o. Obrigada por compartilhar tantos ensinamentos.

Ao Dr. Michael Werner e ao Instituto Hiscia (Arlesheim, Suíça) por toda a doação dos fármacos e por acreditar que nós poderíamos, de alguma forma, acrescentar resultados às pesquisas com o *Viscum album*.

À minha “grande” família: Désirée e Natascha, por toda ajuda, mesmo à distância, por acreditarem em mim e me darem “aquela força”.....

Ao meu eterno companheiro, cúmplice, amigo, amante, fã, ídolo Uli.....obrigada pela paciência, pelo entendimento e compreensão de toda minha ausência e pela ajuda em tudo aquilo que foi possível você ter me ajudado. Espero que tenha valido a pena e prometo que foi o primeiro e último doutorado.....

Não poderia deixar de mencionar os meus três grandes amores (meu pai e minhas duas tias), que quando iniciei essa etapa estavam por aqui, e por razões “x” resolveram tomar outro rumo.....Sinto muita falta de vocês e adoraria poder compartilhar esse momento....um dia a gente se encontra novamente.

E a todos aqueles amigos e familiares, que durante essa minha jornada estiveram ao meu lado de alguma forma, torcendo, orando, compartilhando e principalmente acreditando.....

Sem exceção: todos vocês foram muito importantes pra mim: MUITO OBRIGADA!

Toda cognição que tu aspiras com o único fito de enriquecer teus conhecimentos pessoais, apenas para acumular tesouros em ti, desviar-te-a do teu caminho; toda cognição, porém, que procuras para tornar-te mais maduro no caminho do enobrecimento humano e da evolução cósmica far-te-a avançar um passo

Rudolf Steiner

*O ser humano só vê claramente no mundo exterior,
O que ele pode irradiar com a luz de seu interior.*

Rudolf Steiner

RESUMO

Klingbeil MFG. Ação do *Viscum album* em cultivo celular de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2010. 161 f.

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, hoje considerada mundialmente uma das neoplasias mais frequentes desta região, tornou-se um problema de saúde pública, necessitando urgente de medidas a serem tomadas, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos, conseqüentemente aumentando a sobrevivência, avaliada em cinco anos. O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é uma doença complexa, e inclui vários fatores etiológicos, além de alterações moleculares, capazes de desencadear e dar continuidade a alguns eventos. No geral os carcinomas orais são tratados primeiramente com cirurgia excisional ou radioterapia individualmente, ou em combinação para os estágios mais avançados. As preparações dos extratos fermentados de *Viscum album* (VA), uma planta semiparasita da família das Lorantáceas, vêm sendo utilizada, principalmente em países da Europa, com resultados promissores no âmbito das terapias coadjuvantes, especialmente a medicina antroposófica. Em conjunto com as terapias convencionais, tem demonstrado uma melhora na qualidade de vida dos pacientes portadores de neoplasias malignas. Estudos “*in vitro*”, realizados em células cancerígenas, têm demonstrado que vários tipos de VA podem apresentar citotoxicidade em células de carcinoma, sendo capazes de ativar a cascata apoptótica ou levando as células à necrose. Este estudo teve por objetivo verificar a ação de três tipos de extratos de VA (Iscador Qu Spezial, Iscador P e Iscador M), em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de língua (SCC9 e SCC25). Para isso foi verificada a ação citotóxica do fármaco Iscador Qu Spezial, por meio do teste de viabilidade celular, para a obtenção da IC₅₀. Em seguida foram realizados com os três fármacos: o teste de Tunel, para verificação de apoptose, Anexina V FITC/Iodeto de Propídeo, com auxílio de citômetro de fluxo, para a verificação quantitativa do índice de apoptose provocado pelos fármacos. Em seguida foi verificado o comportamento de cinco genes (Akt1, Akt2, Akt3, PTEN e Ciclina D1) por meio de análises feitas por qRT-PCR, e de seus produtos (pAkt, PTEN e Ciclina

D1) pelas técnicas de Imunofluorescência e Western-Blot. Os fármacos, na concentração de 0,3 mg/mL (IC₅₀) apresentaram resultados positivos na indução de apoptose nas células analisadas, e mostraram diferentes níveis de expressão para os genes analisados. Nos ensaios por Imunofluorescência, as proteínas exibiram diferentes localizações e comportamentos nos compartimentos celulares analisados. As análises quantitativas dessas proteínas, analisadas por Western-Blotting, mostraram diferentes níveis de expressão. Por meio deste estudo foi possível concluir que os fármacos Iscador Qu Spezial e Iscador M, possuem maior potencial citotóxico nas células das linhagens SCC9 e SCC25, quando comparados aos controles e ao fármaco Iscador P. As células da linhagem SCC9 exibiram um perfil mais resistente à ação dos fármacos analisados do que as células da linhagem SCC25.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermoide, Carcinogênese, *Viscum album*, Iscador, Terapia Complementar, Medicina Integrativa, Medicina Antroposófica, Akt, PTEN, Ciclina D1.

ABSTRACT

Klingbeil MFG. *Viscum album* effect in head and neck squamous cell carcinoma cell culture [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2010. 161 f.

Head and neck squamous cell carcinoma, one of the most common malignancies worldwide in this area, became a public health problem that requires urgent attitudes to be taken in order to improve the quality of life of the affected patients, increasing survival that today valued at five years. Head and neck squamous cell carcinoma is a complex disease which includes several etiologic factors and different molecular changes that may trigger and get on with some events. In general, oral carcinomas are treated primarily with surgical excision or radiotherapy alone or in combination for cases in more advanced stages. Preparations of fermented extracts from fermented *Viscum album* (VA), a plant from the Loranthaceae family have been used, mainly in European countries, with promising results as adjuvant therapies, especially in the Anthroposophy Medicine. In combination with conventional therapies, VA has lead to improvement in quality of life of patients with cancer. “*in vitro*” studies have demonstrated that various types of VA may have cytotoxicity in carcinoma cells being able to activate the apoptotic cascade or leading cells to necrosis. The present study aimed to verify the effect of three types of VA extracts (Iscador Qu Spezial, Iscador P and Iscador M) in squamous cell carcinoma of the tongue (SCC9 and SCC25). The cytotoxic action of Iscador Qu Spezial was verified by cell viability test obtaining the IC₅₀. The three drugs were tested as follow: Tunnel to evaluate apoptosis, Annexin V and FITC/propidium iodide were evaluated by flow cytometry to quantify the apoptosis rate induced by the drugs. Then we verified the expression levels of five genes (Akt1, Akt2, Akt3, PTEN and Cyclin D1) by qRT-PCR and their products (pAkt, PTEN and Cyclin D1) by immunofluorescence and Western blot. The concentration of 0.3 mg/mL (IC₅₀) of the drugs presented positive results in the induction of apoptosis and showed different expression levels for the genes analyzed. Immunofluorescence assays evidenced that the proteins exhibited different locations and behaviors in the cellular compartments analyzed. Quantitative analysis of these

proteins by Western-Blot, evidenced that they presented different levels of expression. Through this study, it was concluded that Iscador Qu Spezial drugs and Iscador M have higher cytotoxic potential on SCC9 and SCC25 cell lines when compared to controls and the drug Iscador P. It could also be concluded that the SCC9 cell line was more resistant to the action of the drugs examined.

Keywords: Squamous cell carcinoma, Carcinogenesis, *Viscum album*, Iscador, Complementary Therapy, Integrative Medicine, Anthroposophy Medicine, Akt, PTEN, Cyclin D1.

LISTA DE ABREVIATURAS, SINÔNIMOS E SINAIS

Areca	Noz de areca, semente da palmeira areca (Areca catechu), que cresce em grande parte do Pacífico tropical, Ásia e partes do leste da África
α	Alfa
AKT	(Sinônimo de PKB) serine/threonine protein kinase, Proteína quinase serina/treonina
APS	Ammonium persulfato / Persulfato de amônia
ATCC	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
Betel	Folha de uma trepadeira pertencente à família da Piperaceae, que inclui a pimenta, oriunda do Sul e Sudeste da Ásia (Índia, Bangladesh e Sri Lanka)
Bidi	Uma forma de uso do tabaco, onde este é prensado em folhas secas de tendu ou temburmi, sendo bastante utilizada na Ásia sul oriental
β	Beta
BSA	Bovine Serum Albumine / Albumina Sérica Bovina
CdKs	Quinase dependente de ciclinas
Ckis	Inibidor de quinase dependente de ciclina
DA	Daltons
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor/ Fator de crescimento epidérmico
ERK	Extracellular signal-regulated kinase/ Quinase reguladora de sinais extracelulares
γ	Gama
GSK3	Quinase de síntese de glicogênio
IC ₅₀	"50% of Inhibition concentration". Concentração de 50% de Inibição
IKB	Inibidor de Kappa B
mA	(milliAmpere) Miliamperagem
NF-kB	Fator nuclear de kappa B
mL	Mililitro
mM	milimolar

nm	nanômetro
pAKT	serine/threonine protein kinase Proteína quinase serina/treonina fosforilada
PBS	Phosphate Buffered Saline, calcium and magnesium free/Solução tampão fosfato salina, livres de cálcio e magnésio
PCR	“Polimerase Chain reaction” Reação de polimerase em cadeia
pg	Pico gramas
pH	Cologarítimo de concentração hidrogeniônica de uma solução (potencial hidrogeniônico)
PI	Iodeto de Propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol 3- quinase
PIP 2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP 3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
PVDV	Fluoreto de Polivinilideno
Raf/MEK	(mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase) Proteína ativadora mitogênica/quinase reguladora de sinal extracelular.
Rb	retinoblastoma
Rpm	Rotações por minuto
Sample Buffer	(Tampão de amostra): 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate / Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT	Signal Transducer and activation of transcription extracellular signal - egulated Kinases. Sinal de tradução e ativação extracelular de quinase regulada de sinal
Tampão de transferência:	(48 mM Tris-Base; 39 mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3)
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
Thr	Treonina
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
V	Voltagem
W	Wattagem
μ M	Micromolar
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE	21
2.1.1 Epidemiologia.....	21
2.1.2 Fatores Genéticos & História Familiar	25
2.1.3 Tratamento	27
2.2 AKT.....	28
2.3 PTEN	32
2.4 CICLINA D1	36
2.5 <i>VISCUM ALBUM</i> (VA).....	40
2.5.1 Viscotoxinas	42
2.5.2 Lectinas	43
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 MATERIAIS.....	47
4.2 MÉTODOS.....	48
4.2.1 Cultivo Celular.....	48
4.2.2 Tripsinização das Células.....	49
4.2.3 Teste de Viabilidade Celular	49
4.2.3.1 Metodologia Estatística	51
4.2.4 Análise das Células Apoptóticas pelo método TUNEL	52
4.2.5 Análise quantitativa de apoptose por ANEXINA V FITC e Iodeto de Propídeo.....	53
4.2.5.1 Metodologia Estatística	54
4.2.6 PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)	55
4.2.6.1 Obtenção do RNA	55
4.2.6.2 Transcrição Reversa	57
4.2.6.3. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	57
4.2.6.4 Metodologia Estatística	59
4.2.7 Imunofluorescência	60
4.2.8 Western Blotting	61

4.2.8.1 Extração Proteica.....	61
4.2.8.2 Quantificação protéica.....	62
4.2.8.3 SDS PAGE.....	62
5 RESULTADOS	66
5.1 VIABILIDADE CELULAR.....	66
5.2 ANÁLISES DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS PELO MÉTODO UNEL.....	73
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE APOPTOSE POR ANEXINA V FITC E IODETO DE PROPÍDEO	76
5.4 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DOS GENES AKT1, AKT2, AKT3, PTEN E CICLINA D1	85
5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA	99
5.6 WESTERN BLOTTING	108
6 DISCUSSÃO	111
7 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS	130
APÊNDICES	159
ANEXO	161

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, sendo hoje considerada mundialmente a sexta neoplasia mais freqüente, continua tendo como consequência altos índices de morbidade e de mortalidade. Desta forma, ao longo dos anos, a comunidade científica tem se mobilizado na busca constante de novas formas de tratamento e alternativas terapêuticas. A disponibilidade dos tratamentos disponível, apesar dos benefícios terapêuticos alcançados, mostrou não ter contribuído significativamente nos últimos anos, pois os índices de mortalidade continuam elevados. Infelizmente, podemos afirmar que dos pacientes diagnosticados anualmente com carcinoma oral, 50% irão morrer nos próximos cinco anos. Além das limitações causadas pelo tratamento cirúrgico, os tratamentos combinados de radio e quimioterapia, além de não alcançarem o sucesso esperado, relatam alto índice de toxicidade e desconforto para o paciente, diminuindo de maneira drástica sua qualidade de vida.

De conhecida etiologia, fazendo parte dos fatores extrínsecos temos: a utilização do tabaco, o abuso do consumo de álcool, a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) e a radiação ultravioleta. Entretanto, não podemos esquecer que as alterações genéticas, como fatores não extrínsecos, exercem papel fundamental para o desenvolvimento e a progressão do carcinoma epidermoide.

Para a ocorrência desses eventos e dessas alterações torna-se indispensável a participação de dois tipos de genes: os oncogenes e os genes supressores de tumor. Os oncogenes ativados dão início à proliferação celular, entretanto a inativação dos genes supressores de tumor é suficiente para o descontrole do ciclo celular.

Como papel fundamental dentro do capítulo das neoplasias de cabeça e pescoço, podemos citar a família do oncogene Akt (Akt1, Akt2 e Akt3). A ativação de Akt se dá pelo complexo formado por um heterodímero presente na camada interna da membrana plasmática PI3K/Akt, uma das vias “alvo” mais freqüentes, capaz de modular numerosos processos intracelulares, como diferenciação, sobrevivência, apoptose, proliferação, progressão do ciclo celular, metabolismo de glicose e tradução de proteínas.

PTEN “Phosphatase Tensin Homolog”, um gene supressor tumoral, é capaz de bloquear o ciclo celular na fase G1, suprimindo a formação e a progressão tumoral. Seu papel de supressor tumoral foi comprovado após ter sido demonstrada sua capacidade em antagonizar os efeitos da ativação do complexo PI3K/Akt.

Akt é capaz de inativar a GSK-3, uma proteína capaz de modular eventos que mantém a célula inativa, ao mesmo tempo em que atua indiretamente sobre a Ciclina D1, um oncogene indispensável para a progressão do ciclo celular.

A ciclina D1, também conhecida como um oncogene, quando ativada, atua diretamente no ciclo celular, pois este é diretamente dependente da sua expressão. A sua amplificação e superexpressão são eventos presentes e descritos em vários tipos de tumores humanos, incluindo o carcinoma de cabeça e pescoço.

As ciclinas formam complexos com as quinases dependentes de ciclina (ciclina/CdKs), as quais são indispensáveis para que ocorra a transição das fases específicas do ciclo celular.

No âmbito das terapias complementares, empregada tradicionalmente pela medicina antroposófica para o tratamento das neoplasias malignas, podemos citar o *Viscum album* (VA), como sendo uma planta semiparasita, habitante do norte da Europa ao noroeste da África, o sudoeste e o centro da Ásia e o Japão. O extrato total da planta tem sido utilizado na Europa, por aproximadamente nove décadas, para o tratamento complementar dos tumores malignos. Suas preparações são frequentemente utilizadas em conjunto com as terapias convencionais como: quimioterapia e/ou radioterapia. Atualmente 1/3 dos pacientes oncológicos na Alemanha utilizam VA de forma injetável como tratamento complementar. Estudos “in vitro” demonstraram que vários tipos de VA podem ser tóxicos para uma variedade de células de carcinoma, sendo capazes de ativar a cascata apoptótica ou levá-las à necrose. Como principais componentes identificados em seus compostos, temos: as lectinas, as viscotoxinas e os polissacarídeos. Essas substâncias agem de modo combinado, revelando um efeito antitumoral e imunoestimulante.

Desta forma, esse trabalho teve como objetivo a verificação do efeito inibidor e apoptótico de três tipos de *Viscum album* (Iscador Qu, Iscador P e Iscador M) em duas linhagens celulares de carcinoma de língua e a verificação de seu efeito na participação das vias de sinalização Akt/PTEN/Ciclina D1 em termos de localização, expressão gênica e análise de suas proteínas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE

2.1.1 Epidemiologia

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço se tornou mundialmente a sexta neoplasia mais freqüente^{1,2,3,4}. Sua incidência continua bastante elevada⁵ constituindo uma grande causa de morbidade e de mortalidade. Desta maneira, a mesma se tornou um problema de saúde pública, necessitando urgente de medidas e atitudes a serem tomadas^{1,2}.

Sob uma perspectiva epidemiológica e clinicopatológica, o câncer oral pode ser dividido em três categorias topográficas: carcinoma da cavidade oral propriamente dito, carcinoma do vermelhão do lábio e carcinoma da orofaringe. O carcinoma intraoral, que corresponde a 50% dos carcinomas epidermóides^{6,7}, é mais comum em homens do que em mulheres^{8,9}. Alguns estudos americanos, anteriores a 2002, apontaram uma proporção de 2:1 respectivamente^{8,9}.

Embora esses sítios sejam anatomicamente diferentes, os tumores malignos da cavidade oral e orofaringe são na maior parte homogêneos, no que diz respeito à epidemiologia descritiva, apresentação clínica e os principais fatores de risco associados à sua causa¹⁰.

Jerjes e colaboradores, em um trabalho realizado em 2010, avaliaram 115 pacientes e em ordem decrescente, relataram que as primeiras localizações de desenvolvimento identificadas do carcinoma epidermoide da cavidade oral, foram principalmente a língua, totalizando 46,9%, seguido do assoalho bucal com 20,9%, região alveolar com 10,4% e mucosa bucal com 9,6%¹¹.

Nesse mesmo trabalho, do total dos pacientes analisados, 65 eram homens e 50 mulheres, com uma média de idade de 61,7 anos no momento do diagnóstico¹¹.

As informações e dados disponíveis mostram que o carcinoma oral apresenta desigualdades consideráveis, tanto na incidência, quanto na

sobrevivência. A investigação epidemiológica nesta área torna-se dificultada pela variedade de subsítios anatômicos, resultando numa diversidade de informação¹¹, além de uma acentuada variação geográfica na incidência desta neoplasia⁴.

Focando na incidência do carcinoma oral, podemos relatar que anualmente são registrados 400.000 novos casos⁴ e desses, em torno de um terço acontece em países em desenvolvimento¹². Nos países situados no subcontinente da Índia, o carcinoma oral além de representar um terço da incidência mundial da doença, chega a ser a neoplasia mais comum entre os homens daquela região, equivalendo até a 40% de todas as neoplasias malignas¹³.

As taxas também se mostram elevadas em locais como: Melanésia, outras ilhas do Pacífico, partes do Sudeste e Ásia¹³, Taiwan e algumas províncias da China continental, onde o hábito de mascar areca e/ou betel são bastante comuns^{14, 15, 16}.

O Programa Nacional de Controle do Câncer do Sri Lanka de 2009 apontou que a incidência dos carcinomas da cavidade oral e orofaringe neste país foram de 14,1 e 3,8 para cada 100.000 habitantes, para homens e mulheres respectivamente¹⁷.

Contudo, existem alguns bolsões de alta incidência em países ocidentais industrializados, por exemplo, a região de Bas-Rhin, na França, onde se relata um dos maiores índices do mundo¹⁸.

Nos Estados Unidos, aproximadamente 30.000 casos de carcinoma epidermoide da cavidade oral são diagnosticados anualmente, ou seja, um em cada 10.000 adultos, representando 3% de todas as neoplasias malignas, o que resulta numa estimativa de 7.320 mortes neste país¹⁹.

No Reino Unido essa proporção é de 1,3 para cada 10.000 adultos, o que representa também um índice de 3% de todas as neoplasias^{20, 21}.

Entretanto na Suécia, a incidência ficou relativamente estável nos últimos 40 anos⁴, onde esta freqüência é de 1,4% de todas as neoplasias²².

Desde os anos 70, no Reino Unido, tem ocorrido um aumento alarmante na quantidade de pacientes jovens diagnosticados com esse tipo de tumor^{4, 9}. Os fatores de risco nesses pacientes parecem ser os mesmos²³, tendo como principal evidência a associação com o aumento do consumo de álcool²⁴.

De uma forma geral, para aqueles indivíduos que utilizam tabaco ou abusam do consumo de álcool, as duas drogas lícitas de maior consumo mundial, o

risco de se diagnosticar uma neoplasia na cavidade oral pode aumentar para cinco em cada 10.000 adultos^{20, 21}.

Mesmo assim, a sobrevida entre os pacientes jovens ainda é mais favorável do que em pacientes com idade mais avançada²⁵.

No Brasil, fontes do Instituto Nacional de Câncer – INCA/MS, apontaram que o número de novos casos de carcinoma epidermoide, tendo como localização primária a cavidade oral, para o ano de 2010, foram de 10.330 em homens e 3.790 em mulheres, totalizando 14.120²⁶. Estes dados, distribuídos entre os estados brasileiros, estão mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Estimativa nacional, para o ano de 2010, do número e das porcentagens de novos casos de câncer da cavidade oral, dividida pelos estados brasileiros²⁶

<i>Estados</i>	<i>Carcinoma cavidade oral</i>	<i>%</i>
Acre	20	0,0027
Alagoas	130	0,0042
Amapá	20	0,0030
Amazonas	80	0,0023
Bahia	790	0,0056
Ceará	500	0,0059
Distrito Federal	150	0,0058
Espírito Santo	340	0,0097
Goiás	350	0,0058
Maranhão	90	0,0014
Mato Grosso	150	0,0050
Mato Grosso do Sul	150	0,0061
Minas Gerais	1.180	0,0060
Pará	190	0,0025
Paraíba	240	0,0064
Paraná	1.010	0,0097
Pernambuco	580	0,0066
Piauí	110	0,0035
Rio de Janeiro	1.950	0,0122
Rio Grande do Norte	210	0,0066
Rio Grande do Sul	1.050	0,0098
Rondônia	50	0,0032
Roraima	20	0,0044
Santa Catarina	450	0,0072
São Paulo	4.120	0,0099
Sergipe	160	0,0077
Tocantins	30	0,0022
Total	14.120	0,0074

*números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Infelizmente o carcinoma de cabeça e pescoço só é diagnosticado quando os sintomas se fazem presentes, sendo que nesses casos, aproximadamente 2/3 desses pacientes apresentam estágios avançados da doença no momento do diagnóstico, mesmo apesar do fácil acesso à cavidade oral para exames regulares^{27, 28}. A remoção de fatores de risco após o diagnóstico da doença, além de melhorar o prognóstico, pode reduzir o risco de recorrências de um segundo tumor, no caso de pacientes com tumores orais preexistentes²⁹.

O carcinoma oral continua tendo um prognóstico pobre, com uma estimativa média de cinco anos de sobrevida de 56%³⁰. Apesar dos avanços nas terapias adjuvantes, esses índices nos últimos 20 anos não apresentaram mudanças significativas³¹.

À grosso modo, dos pacientes diagnosticados anualmente com carcinoma oral, 50% irão morrer nos próximos cinco anos^{29, 30, 32}. Esses índices podem ter uma variação de 40 a 50%, inclusive em países desenvolvidos^{5, 33, 34}.

A etiologia e mecanismos da carcinogênese bucal contam com vários fatores extrínsecos, tais como: o uso do tabaco, o abuso do consumo de álcool, e o hábito de mascar betel³⁵, principalmente se ainda associados à radiação ultravioleta, quando a localização se der em lábios^{36, 37}.

Ainda como fator extrínseco, temos a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV), o qual está associado a vários tipos de lesões epiteliais, das quais a maioria são hiperplasias benignas, entretanto um subgrupo desse vírus está associado a lesões que são propensas à transformações carcinogênicas. Entre os tipos de vírus considerados de alto risco temos as cepas do HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 e 52^{38, 39}.

Contudo, quando esses fatores deixam de ser extrínsecos, a etiologia e os mecanismos existentes acabam fazendo parte de um processo multifatorial que acontece durante um período de tempo, podendo ser traduzido em anos. O conhecimento desses processos tem se tornado cada vez mais consistente⁴⁰.

2.1.2 Fatores Genéticos & História familiar

Quando uma história familiar preexistente de carcinoma oral se faz presente, a susceptibilidade hereditária pode se tornar um fator a ser considerado. Esse risco torna-se ainda maior, principalmente, quando o grau de parentesco for primário. A história familiar parece estar mais associada ao aumento do risco no início precoce das lesões. Muito provavelmente isso se deve também aos diferentes hábitos nocivos presentes nos membros de uma mesma família⁴¹.

A maioria dos casos de neoplasias orais e de mortes é devida tanto à predisposição individual, ligadas a características genéticas, quanto à exposição a agentes cancerígenos causada por comportamentos do estilo de vida familiar. Especificamente, 20-30% dos casos em geral, são atribuídos ao uso do tabaco e bidi^{42, 43, 44}, 7-19% dos casos são atribuídos ao consumo abusivo de álcool etílico^{42, 45}, 10-15% dos casos são atribuídos à deficiência de micronutrientes^{46, 47}, e ainda 3% dos casos são atribuídos a infecção pelo papilomavírus humano, geralmente (mas não exclusivamente) associado ao comportamento sexual⁴⁸. Além disso, a exposição a dois ou mais desses fatores tem um efeito sinérgico no aumento do risco dessa neoplasia^{49, 50, 51}.

O carcinoma epidermoide demonstra marcada heterogenicidade, desta forma, tumores que apresentam o mesmo padrão e grau histopatológico podem ter estórias e evolução clínica diferentes^{32, 52}. O impacto de numerosas alterações genéticas sublinha o desenvolvimento e a progressão do carcinoma epidermoide. Os mesmos surgem de um acúmulo de lesões moleculares em dois tipos de genes: os genes supressores de tumor, os quais, quando inativados, promovem o desenvolvimento do tumor, e os oncogenes, que ao contrário dos genes supressores, quando ativados, promovem o desenvolvimento do mesmo. Muitos dos oncogenes ativados dão início à proliferação celular, mas a inativação dos genes supressores de tumor é que é responsável pela perda de controle do ciclo celular⁵².

Esses genes estão diretamente envolvidos com o mecanismo de regulação do ciclo celular, incluindo a parada do ciclo celular e apoptose. Uma vez que o gene supressor de tumor é inativado, a célula perde o controle do ciclo celular, predispondo-a ao crescimento e divisões celulares descontrolados, contribuindo

dessa forma para o fenótipo de malignidade. Os genes supressores de tumor são inativados por mecanismos como: pontos de mutações e/ou deleção nos dois alelos do mesmo gene⁵³. A ativação dos genes supressores se dá com a codificação de proteínas que regulam negativamente os oncogenes⁵⁴, ao contrário dos oncogenes que podem ser ativados pela mutação de somente uma das duas cópias de um único gene⁵³.

Hanahan e Weinberg, em 2000, descreveram seis características essenciais das células cancerígenas que as distinguem e diferem muito bem das suas homólogas normais. Essas células são autosuficientes em termos de sinalização de crescimento, se mostram insensíveis aos sinais de controle de crescimento, apresentam evasão da morte celular programada (apoptose), imortalidade ou potencial replicativo ilimitado, capacidade de promover a angiogênese e invasão tecidual e metástase⁵⁵.

Existem duas teorias que explicam a habilidade que essas células possuem para iniciar um tumor, uma delas é chamada de modelo de evolução clonal (modelo estocástico)⁵⁶ e a outra chamada de modelo de célula tronco cancerígena⁵⁷. O modelo da evolução clonal sustenta a teoria que as células cancerígenas são geneticamente instáveis promovendo uma heterogenicidade dentro dos tumores com respeito aos seus genomas e seus potenciais tumorigênicos^{56, 58}. Em adição a isso uma certa pressão seletiva dentro do tumor exercida pelo ambiente do próprio hospedeiro, pode enriquecer as células com maior potencial tumorigênico^{56, 58}. Em contraste, o modelo das células tronco cancerígenas sustenta a capacidade que essas células possuem de se autorenovar e dar início a tumores dominados exclusivamente por uma subpopulação dessas células iniciadoras de tumor^{59, 60}, as quais são responsáveis pela progressão, metástase e recidiva do tumor após o tratamento⁶⁰.

Em adição, tumores com alto índice de crescimento demonstraram um aumento no recrutamento de células tronco de origem mensequimal para o estroma do tumor⁶¹ e também para estimular a angiogênese^{62, 63}.

2.1.3 Tratamento

Os carcinomas orais são tratados primeiramente com cirurgia excisional ou radioterapia somente, ou em combinação para os estágios mais avançados^{30, 64, 65}. A terapia adjuvante complementar, como a quimioterapia, é ocasionalmente utilizada para controlar a doença locoregional ou à distância^{30, 64, 65}, ou ainda, como paliativo de quadros recorrentes ou refratários aos tratamentos^{64, 65}.

Apesar dos benefícios terapêuticos alcançados com os tratamentos combinados de radio e quimioterapia, os relatos de toxicidade associados continuam elevados^{66, 67}.

As mucosites, assim como a disfunção das glândulas salivares, traduzidas pela hipofunção, como consequência da radioterapia, são as causas mais freqüentemente observadas das complicações do tratamento deste câncer^{68, 69}. Fora isso, esse tipo de tratamento afeta não só a saúde oral, podendo provocar cáries, doença periodontal, candidíase e disfagia^{68, 70}, mas também a saúde geral, ou ainda pode causar implicações nos tratamentos subseqüentes⁶⁹. A disfagia, causada tanto pelo tumor quanto pela alteração anatômica local devida à ressecção do mesmo, possui um grande impacto na qualidade de vida do paciente^{68, 69}. Os cistos e fístulas salivares, como consequências pósoperatórias, podem interferir também na cicatrização⁶⁸. A qualidade de vida do sobrevivente de um carcinoma oral permanece pobre após o término do tratamento²⁹, embora alguns efeitos causados durante e/ou após o tratamento com quimioterapia, como neutropenia e náusea, já estejam relativamente bem controlados⁷¹. No caso da prevalência das mucosites, considerada entre todas as consequências negativas, uma das mais debilitantes, existe uma variação entre os pacientes, dependendo do protocolo de tratamento utilizado para cada caso⁷². Alguns tipos de tratamento são considerados de alto risco para o seu surgimento. Esse tipo de tratamento inclui radioterapia associada a altas doses de quimioterapia, o que eleva potencialmente o índice do aparecimento das mucosites severas em até 50%⁷². Vale ainda ser lembrado que extensas áreas do nosso corpo, que são recobertas por mucosa, estão igualmente envolvidas nas manifestações das mucosites, podendo na região intestinal, se manifestar com sintomas de dores abdominais, diarréias, anasarcas ou edemas generalizados^{73, 74}.

2.2 AKT

Akt, identificada como um oncogene há mais de duas décadas^{75, 76}, é uma serina/treonina quinase de 60 kDa, também conhecida como PKB (proteína quinase B). Estudos demonstraram que a ativação de Akt é frequentemente relatada em um grande número de tumores malignos sólidos e hematológicos^{75, 77}. Akt, além de ser alvo, está localizada, dentro da via de sinalização, em posição inferior à fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Vários estudos sugeriram que a via de sinalização PI3K/Akt é uma das vias “alvo” mais frequentes em todas as neoplasias malignas humanas, incluindo o tumor maligno de cabeça e pescoço^{77, 78}. Akt, quando ativada, é capaz de modular numerosos processos intracelulares, incluindo: diferenciação, sobrevivência, apoptose, proliferação normal e aberrante, progressão do ciclo celular, metabolismo de glicose e tradução de proteínas, por meio de outras proteínas localizadas na porção inferior da via de sinalização^{79, 80}. Os substratos caracterizados da Akt incluem proteínas antiapoptóticas, como as Foxo, BAD e IKK-h; reguladoras do ciclo celular, como p27kip1, p21cip1, MDM2 e Myt1 e GSK-3, que são envolvidas numa variedade de processos intracelulares⁷⁹.

Recentemente, utilizando vários sistemas de cultivo celular, foi demonstrado que a Akt pode exercer distintas funções em tumores de origens diferentes, como: mesenquimais, epiteliais, hematopoiéticos ou linfáticos. Isto se deve ao fato dos mecanismos transcricionais e postranscricionais^{79, 81}.

Sua ativação é um processo de várias etapas, envolvendo desde translocação de membrana até fosforilação⁷⁹. Akt é estimulada por múltiplas moléculas de superfície celular pela ativação da PI3K e conseqüentemente a PDK1^{79, 82}.

A ativação da PI3K, um heterodímero composto por subunidades reguladoras e catalíticas⁸³, que atua como uma quinase que fosforila lipídeos (fosfoinosítídeo) presentes na camada interna da membrana plasmática, recruta proteínas para este local, resultando em moléculas que ativam receptores tirosino-quinase, tais como: EGFR (receptor de fator de crescimento epitelial), pequenas GTPases relacionadas com Ras e Rac, receptores de citocinas, como as interleucinas 2, 3, 4, 5, e 8, insulina, fator de crescimento do tipo insulina, ou

receptores de sinais como proteína G heterodiméricas^{83, 84, 85}. Essa e outras interações podem ser visualizadas na Figura 2.1.

Esta ativação acontece após a ligação do seu domínio SH2 da subunidade regulatória p85, a específicos resíduos fosfo-tirosinos do receptor tirosino-quinase da membrana plasmática ativado. Esta ligação permite o recrutamento da sua subunidade catalítica p110 para a membrana plasmática, com consequente ativação^{83, 85}.

O domínio homólogo de pleckstrina das quinases de Akt tem afinidade com as 3'fosfoinosítídeos fosforilados 3,4,5-trifosfato (PI-3,4,5-P3) e PI-3,4,-P2 produzidas por PI3K, quando ativada. PIP3 por sua vez recruta as proteínas quinases Akt e PDK1 para a membrana plasmática, onde consequentemente a Akt será fosforilada para a sua ativação, nas regiões da quinase Thr^{308/309} e somente para a sua máxima atividade, na serina Ser^{473/474}, na cauda terminal carboxil, transformando-a em sua forma ativa (pAkt), uma molécula chave, capaz de regular inúmeras moléculas-alvo responsáveis pelas funções celulares descritas anteriormente, como proliferação, sobrevivência celular, entre outras^{79, 82, 84, 86, 87}.

Outro exemplo da interação de Akt na proliferação celular é a sua atuação indireta sobre a proteína da Ciclina D1 no ciclo celular, por meio da inativação da GSK-3⁸⁸. A GSK-3 é uma proteína constitutivamente ativa em células que não estão sendo estimuladas, responsável por fosforilar as proteínas c-myc e Ciclina D1, mantendo-as em um estado inativo. A GSK-3 pode ser fosforilada por muitas quinases, incluindo a proteína quinase C (PKC), p90, p70 e a Akt. Quando fosforilada, a Akt inativa a GSK-3. Desta forma, pode-se afirmar que a via de sinalização PI3K/Akt é um complexo ativador da Ciclina D1, fator importante na progressão do ciclo celular⁸⁸.

A via de sinalização PI3K/Akt, descrita até o momento, está representada na Figura 2.1

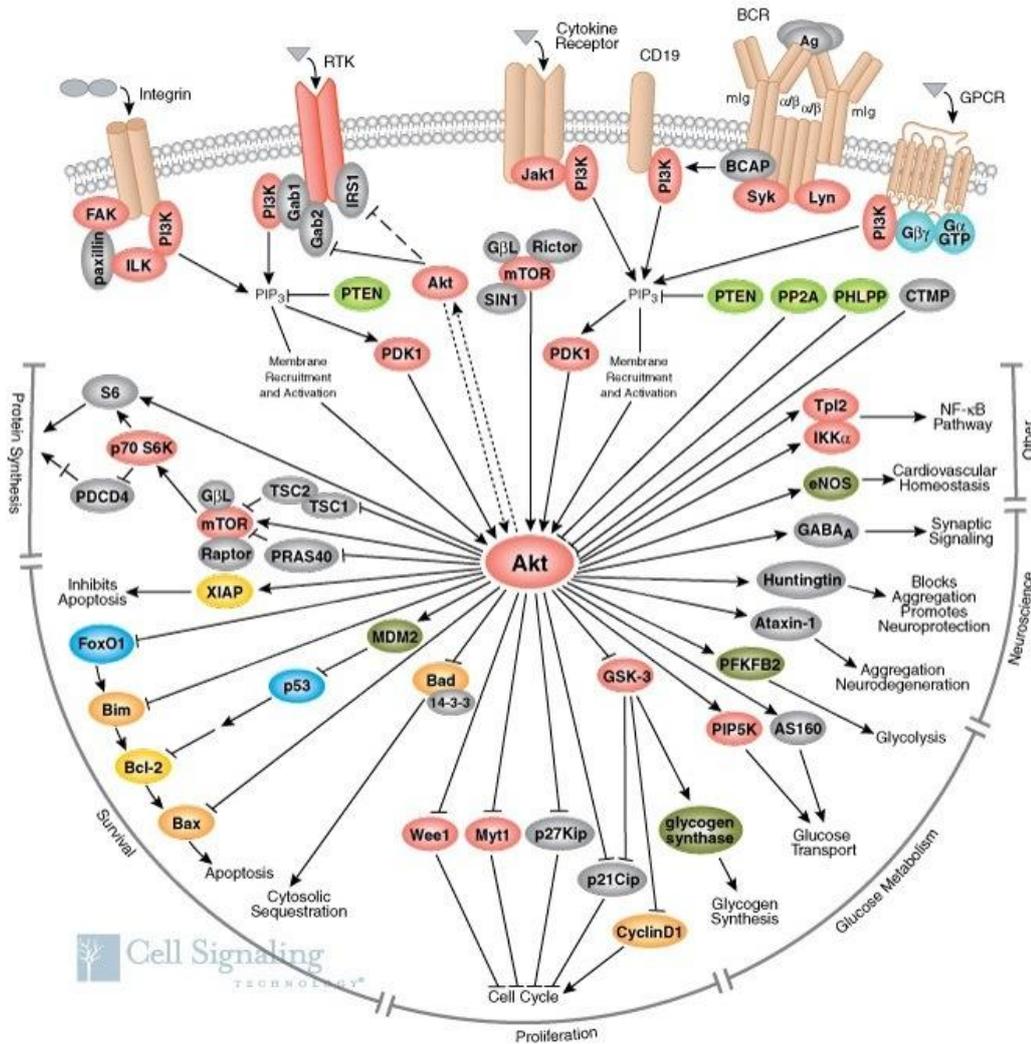


Figura 2.1 - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt⁸⁹

Vários estudos relataram que a localização celular da Akt parece depender do contexto e da linhagem celular. Acredita-se que a localização nuclear da Akt ativada ocorre após um estímulo capaz de transportá-la do citoplasma para o núcleo. Foi demonstrado ainda que a Akt fosforilada, além de presente, pode também ser ativada no núcleo⁹⁰.

Em mamíferos três isoformas do Akt são descritas: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) e Akt3 (PKB γ), localizadas nos cromossomos 14q32, 19q13 e 1q44, respectivamente^{91, 92}. As três isoformas de Akt são estruturalmente homólogas, ou seja, possuem características estruturais comuns, com três regiões funcionais distintas, um amino terminal NH2 homólogo ao domínio da pleckstrina, um domínio catalítico no centro da estrutura, e um terminal hidrofóbico COOH^{91, 93, 94}.

As mesmas dividem mecanismos similares de ativação, embora os locais de expressão nos tecidos sejam diferentes. Akt1 e Akt2 são expressas por ubiquitinação, enquanto que a Akt3 é expressa de forma restrita⁹⁴.

Estudos em modelos animais contribuíram para o entendimento de que a sinalização aberrante de Akt exerce papel importante na transformação maligna “in vivo”, tanto em sua expressão, como em cooperação com outras alterações genéticas^{95, 96}, além de ser ainda capaz de influenciar a relação do estroma do tumor com o aumento da angiogênese^{97, 98}.

Modelos animais especiais foram criados para investigações da interação dessas três isoformas de Akt. Vários grupos de pesquisadores desenvolveram ratos com ausência (“knockout”) dos genes Akt1, Akt2 e Akt3, e observaram que esses ratos além de serem viáveis, apresentavam fenótipos que variavam de médio a severo, dependendo do gene alvo. Esses fenótipos manifestaram retardo no crescimento global, às vezes com nanismo, além de envolverem os seguintes sítios: pele, ossos, sistema cardiovascular, sistema nervoso e timo. Outros casos evoluíram para diabetes e óbito fetal no 11° ou 12° dias, dentre os 21 dias de gestação de ratos, além de morte poucos dias após o nascimento^{99, 100, 101}.

Alguns estudos reportaram um aumento de atividade da quinase Akt1 em tumores primários de próstata, mama, e ovário¹⁰², enquanto que os resultados de estudos “in vivo” demonstraram que a ablação de Akt1, por si só, não tem um grande impacto fenotípico, porém existe um aumento espontâneo de apoptose no adulto⁹⁹. Estudos em tumores de mama, ovário, pâncreas, colon e cabeça e pescoço, mostraram amplificação ou mutações de Akt2^{103, 104, 105, 106}, enquanto que outros trabalhos demonstraram que a falta dessa isoforma, além de desenvolver uma resistência à insulina e um fenótipo de diabetes, não foi compensada pelas isoformas Akt1 e Akt3^{87, 100}. A expressão de Akt3 foi restritamente detectada em alguns tecidos, como cérebro, coração e rim, e em linhagens celulares de tumores de mama, do tipo não dependente de hormônio, e próstata^{107, 108}.

2.3 PTEN

O gene PTEN “Phosphatase Tensin Homolog” (fosfatase homóloga à tensina)^{109, 110, 111, 112}, localizado no cromossomo 10q23, identificado como um supressor tumoral em 1997^{109, 110, 111, 112}, se encontra frequentemente alterado por vários tipos de mutação em vários tipos de tumores¹¹⁰ além de estar subregulado em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço¹¹³. PTEN é composto por nove exons que codificam a proteína formada por 403 aminoácidos, no lado ativo da proteína tirosino fosfatase, que é homóloga às proteínas do citoesqueleto tensina e auxilina¹¹⁰. A tensina é uma proteína ligada à actina, localizada no complexo de adesão focal¹¹⁴.

PTEN é um lipídeo, ao mesmo tempo uma proteína fosfatase, que pode desfosforilar substratos protéicos nos resíduos de treonina, serina e tirosina¹¹⁵. Existem dois domínios principais de PTEN, uma sequência N-terminal associada ao domínio fosfatase e o domínio C2 associado à cadeia C-terminal¹¹⁴. Essa atividade é essencial para que PTEN, pela remoção da PIP3^{116, 117, 118}, que acredita-se ser seu principal substrato¹¹⁹, antagoniza o estímulo provocado pela PI3K^{116, 117, 118, 190, 120, 121, 122}. O aumento da concentração de PIP3, quando provocado pela inatividade de PTEN, leva à hiperativação de Akt^{119, 123}. Isso ficou comprovado em linhagens de células neoplásicas, onde os níveis de PTEN e Akt fosforilados são inversamente correlacionados^{119, 123, 124}.

É na fase G1 que PTEN bloqueia o ciclo celular, desta forma, suprimindo a formação e progressão tumoral¹²⁵.

O papel de PTEN como um supressor tumoral ficou comprovado, após ter demonstrado ser capaz de antagonizar atividades conhecidas provocadas pela PI3K/Akt, tais como: proliferação celular, sobrevivência^{119, 121} motilidade celular e invasão tumoral^{120, 123}, progressão do ciclo celular, síntese, tradução e fosforilação de proteínas^{122, 124, 126, 127}.

Várias modificações fenotípicas em células com deficiência de PTEN foram constatadas após estudos “in vitro”, tais como: aumento de proliferação^{128, 129}, redução de apoptose¹³⁰ e aumento da migração^{131,132}. Em contraste, a super expressão de PTEN selvagem (que não sofreu mutação) em células cancerígenas

foi capaz de induzir a apoptose e bloquear a progressão do ciclo celular, além da formação de colônias e migração celular^{131, 133, 134, 135, 136}.

Portanto o papel de PTEN na supressão tumoral tem sido na maior parte das vezes, atribuído à sua atividade na sequência N-terminal da fosfatase lipídica¹³⁷. Entretanto mais de 40% das mutações de PTEN tumorigênico ocorrem no domínio C-terminal¹³⁸, mostrando que essa região tem um papel significativo na supressão tumoral. O domínio C-terminal que contém ambos os domínios C2, está envolvido na estabilidade¹³⁹ e no recrutamento de PTEN para as membranas fosfolipídicas¹⁴⁰ além de comprovar que esta região é necessária para que haja a interação de PTEN com o centrômero¹⁴¹. Shen e colaboradores afirmam que neste caso, a atividade fosfatase de PTEN se torna dispensável¹⁴¹. PTEN possui ainda uma região de cauda que pode estar relacionada não só com a estabilidade¹⁴², mas também com a interação proteína/proteína¹⁴³. As análises da sua estrutura revelaram que PTEN possui um domínio do tipo “ β -sheet” (folha de β) sugerindo uma base para a sua interação com DNA e outras proteínas¹⁴⁴.

As mutações de PTEN estão associadas a 80% dos casos de Síndrome de Cowden e 60% dos casos da síndrome de Bannayan–Riley–Ruvalcaba¹⁴⁵. Ambas as síndromes demonstram susceptibilidade para o surgimento do câncer. Essas mutações se localizam na maioria das vezes na região da sequência N-terminal, onde se localiza a unidade catalítica da fosfatase¹⁴⁶.

Puc e colaboradores desenvolveram um trabalho pioneiro para a verificação da deficiência e instabilidade genética de PTEN¹⁴⁷.

Células tronco embrionárias desprovidas de PTEN demonstraram exibir defeitos nos pontos de checagem e reparo do DNA em resposta à radiação ionizante, o que resultou num acúmulo de cromossomos sem reparos, com lacunas e quebras da fita dupla. Outros estudos sobre os mecanismos sugeriram que os defeitos observados nos pontos de checagem G2 provavelmente foram resultados de comprometimento funcional de uma proteína de checagem importante, a CHK1, devido à falta de PTEN. A deficiência de PTEN eleva diretamente a atividade de Akt que desencadeia a fosforilação da CHK1. A CHK1 fosforilada sofre ubiquitinação e não consegue entrar no núcleo. O sequestro da CHK1 no citoplasma prejudica sua função normal em iniciar o reparo do DNA neste ponto. Em adição ao defeito do ponto de checagem G2, a inativação da CHK1 em células com deficiência de PTEN pode levar ao acúmulo de fitas duplas quebradas¹⁴⁷. Essas demonstrações

observadas “in vitro” foram igualmente demonstradas “in vivo”. Ao examinar a localização da CHK1 num grande painel de carcinomas de mama, foi observado um aumento do nível citoplasmático de CHK1 nas células tumorais com baixa expressão de PTEN e elevada fosforilação de Akt¹⁴⁷.

Esses estudos sugeriram que a deficiência de PTEN pode iniciar um processo de sinalização oncogênica por causar disfunção de importantes proteínas de pontos de checagem¹⁴¹. Como mostrado na Figura 2.2, PTEN nuclear pode utilizar dois novos mecanismos para manter a integridade cromossômica. Primeiro: PTEN interage com o centrômero e mantém a sua estabilidade. Acredita-se que para isso PTEN utilize seu domínio C2, pois, como já citado anteriormente, PTEN necessita desse domínio para sua interação com o centrômero¹⁴¹. Também já foi observado em outros trabalhos que, mutação de PTEN sem o domínio C2 perde a capacidade de interação com os centrômeros¹⁴¹. Segundo: PTEN pode ser necessário para o reparo de DNA, pois a sua perda resulta numa alta frequência de quebras de fitas duplas, assim como, ainda pode afetar essa quebra pela regulação de Rad51, um componente chave no reparo por recombinação homóloga da quebra de fita dupla. Desta maneira, a localização nuclear de PTEN foi portanto justificada^{148, 149}. Da mesma forma que foi possível comprovar ainda a associação física de PTEN com um componente integral do centrômero dentro do núcleo, e que a ruptura, neste caso, causa a quebra do centrômero com aberrações cromossômicas massivas¹⁴¹. Esses novos achados revelaram a nova função do PTEN em ser um guardião do genoma¹⁵⁰. O citoplasma foi considerado o primeiro sítio de PTEN para elucidar sua função de supressor tumoral, a qual foi demonstrada pela habilidade no bloqueio da sinalização da quinase PI3K^{151, 152}. Entretanto, outros estudos comprovaram que a distribuição de PTEN pode variar nos diferentes tipos de tecido. No caso de estar localizado em sua maioria no compartimento nuclear, temos o PTEN endógeno de neurônios, gliomas, células de tireóide, de pâncreas e pele^{153, 154, 155, 156, 157}. Alguns trabalhos sugerem ainda que as malignidades possam estar associadas à translocação de PTEN do núcleo para o citoplasma^{153, 154, 156}.

A função de PTEN no núcleo até agora se mostrou consistente, com um papel alternativo no controle da estabilidade genética e envolvimento da função da cromatina. Em adição, altos níveis de expressão nuclear foram recentemente associados com a parada do ciclo celular na fase G0/G1^{145, 158}, indicando também um papel nuclear de PTEN na inibição da proliferação celular. Desta forma,

múltiplos aspectos da função antioncogênica de PTEN como, regulação de crescimento e migração, foram independentes da sua atividade fosfatase^{159, 160, 161,162, 163, 164}

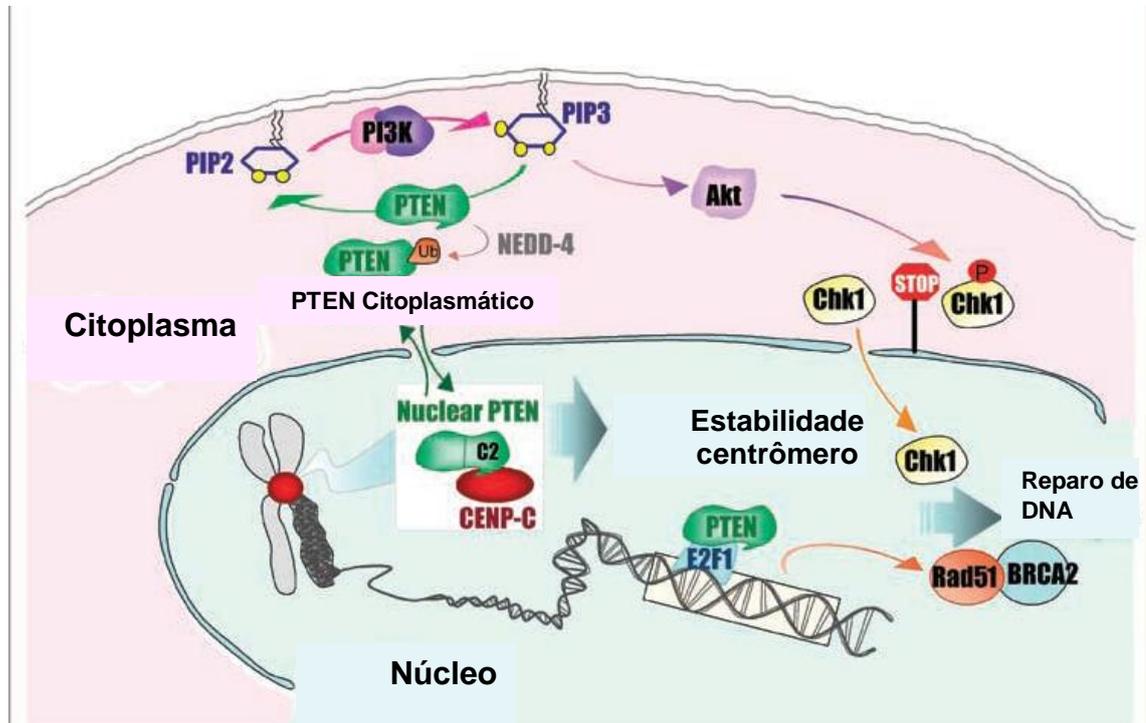


Figura 2.2 - Modelo de PTEN como guardião do genoma. PTEN mantém a estabilidade genômica por meio de múltiplos mecanismos. No citoplasma, PTEN antagoniza a atividade de PI3K pela desfosforilação de PIP3 prevenindo a ativação de Akt, ao mesmo tempo impedindo a fosforilação do ponto de checagem Chk1 pelo Akt ativado, liberando sua entrada no núcleo e consequentemente o reparo do DNA. PTEN pode se movimentar reciprocamente do citoplasma para o núcleo e vice versa, por meio de mecanismo dependente de ubiquitinação. NEDD-4 (oncogene que degrada PTEN por ubiquitinação) promove a entrada de PTEN para o núcleo por um mecanismo de monoubiquitinação. No núcleo PTEN se associa fisicamente com os centrômeros por meio de CENP-C (um componente integral do cinetócoro) e mantém a integridade do cromossomo. PTEN ainda age na cromatina para coordenar com a E2F-1 (fator de transcrição) a regulação da transcrição de Rad51 (componente de regulação homóloga de reparo de DNA), assim resultando no reparo da dupla fita de DNA¹⁶⁵. (modificada pela autora)

2.4 CICLINA D1

A Ciclina D1 é um protooncogene, localizado no 11q13^{166, 167, 168}. Um protooncogene se torna um oncogene, quando a proteína, resultado de seu produto, torna-se insensível aos processos de regulação normais de controle da divisão celular. A ativação de um protooncogene ocorre por meio de mutações pontuais, translocações cromossômicas ou amplificação do gene¹⁶⁹. À nível celular, um oncogene exerce um fenótipo dominante sobre seu protooncogene, pois somente uma cópia de um oncogene é suficientemente necessária para dar início à uma neoplasia. Entretanto, no caso de um gene supressor de tumor é necessário que a mutação ocorra em ambas as cópias desse gene para que uma neoplasia se inicie¹⁶⁹. A Ciclina humana D1, também conhecida como PRAD1 ou CCND1, foi primeiramente isolada de adenoma de paratireóide como um gene rearranjado por translocação para o hormônio paratireoideano¹⁷⁰. Dois outros tipos de Ciclinas D (D2 e D3) foram igualmente clonadas e as mesmas estão distribuídas de acordo com o tipo celular. No caso da Ciclina D1, esta se encontra amplamente presente em células epiteliais e fibroblastos¹⁷¹.

Esses genes, pertencentes às ciclinas descritas, codificam proteínas de peso molecular de 30-45 kDa¹⁷².

O ciclo celular é diretamente dependente da expressão das ciclinas, que é regulada por eventos como transcrição e pós-transcrição, e tradução e pós-tradução¹⁷³.

O gene da ciclina se encontra frequentemente amplificado e/ou super expresso em vários tipos de tumores humanos, incluindo o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço^{166, 167, 168}, esôfago, carcinoma de mama, linfoma de células do manto, além de outros locais¹⁷⁴. A sua superexpressão acelera a fase G1, além de reduzir a dependência das células à fatores mitogênicos^{126, 175, 176, 177} e aumentar a quimiosensibilidade em cultura celular¹⁷⁸. Os vários mecanismos que sublinham a superexpressão da Ciclina D1 em câncer incluem amplificação gênica, translocação cromossomal e estímulo mitogênico do gene de transcrição^{179, 180, 181}.

O aumento da expressão da Ciclina D1 está correlacionado com o aumento da atividade do oncogene NF-kB e a manutenção da expressão dos também oncogenes Bcl-2 e Bcl-xL¹⁸². A anulação da expressão da Ciclina D1,

proporcionada pela estratégia do mecanismo de antisense, provocou a apoptose em células humanas de câncer de pulmão e de várias linhagens de carcinoma epidermoide^{183, 184, 185, 186}.

Estudos comprovaram uma correlação direta entre a sua amplificação e/ou expressão e um pior prognóstico, assim como^{187, 188}, com um comportamento mais agressivo do tumor, associado à invasão e metástase^{167, 189, 190, 191}. Quantitativamente, a superexpressão da ciclina D1 foi verificada em 25-70% dos tumores de boca¹⁹² e em uma grande porcentagem de lesões premalígnas¹⁹³, corroborando, com todos os estudos que concluíram que a sua amplificação e conseqüentemente a super expressão da sua proteína exercem papel fundamental na tumorigênese, além da progressão do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço¹⁹⁴.

Eventos como: proliferação, diferenciação, senescência e apoptose, intimamente relacionados a comportamentos biológicos anormais das células cancerígenas, estão baseados nas aberrações do ciclo celular. Como exemplo dessas aberrações temos o escape das dependências mitogênicas, ou resistência aos antimitogênicos, tolerância aos danos do DNA, resistência à apoptose e a progressão das células com atividade oncogênica, além da inativação dos genes supressores de tumor por meio dos múltiplos pontos de checagem, resultando no aumento da instabilidade genômica. Tudo isso afeta e/ou são afetados pelas proteínas regulatórias do ciclo celular¹⁷³.

Os complexos formados pelos membros das famílias das ciclinas junto com as quinases dependentes de ciclina (ciclina/CdKs) são indispensáveis para que ocorra a transição das fases específicas do ciclo celular¹⁷³ formando o núcleo de regulação do ciclo celular¹⁷¹. Ao contrário das ciclinas, o nível constante das CdKs não são marcadamente modulados durante a divisão celular¹⁸⁹. A atividade das CdKs é regulada por fosforilação e desfosforilação na subunidade catalítica e também pela associação com as ciclinas¹⁹⁰. A complementação ciclina/Cdk se ativa cataliticamente e cada um desse complexo fosforila pontos alvos específicos de proteínas que regulam a progressão do ciclo celular¹⁹⁰.

As ciclinas do tipo G1 incluem as ciclinas C, D e E, e as mesmas exercem um papel importante na sinalização do ciclo celular^{180, 190, 191}. A fase G1 do ciclo celular é a fase que regula o início da síntese do DNA, além de ser o momento

de decisão que as células têm para se manter no ciclo e proliferar, ou abandonar o ciclo celular para se manter quiescentes, se diferenciar ou ainda morrer¹⁸⁹.

A ciclina C interage com a CdK8 e a ciclina D, interage com a CdK 4 e 6, as quais são necessárias para a fase de transição G0/G1/S^{173, 180, 192, 193}. A ciclina E se liga a CdK2 e mediam a entrada da fase S. Outras ciclinas ainda fazem parte dos eventos reguladores do ciclo celular, como o complexo A/CdK2 que regula a passagem da célula para a fase S. Mais tarde, em conjunto com a cdc2 (um regulador central de mitose) também induz à fase G2 (Figura 2.3). A Ciclina B e cdc2 engatam eventos moleculares também associados à mitose¹⁷³.

A ciclina D1 representa uma ligação entre o estímulo mitogênico, localizado em posição superior dentro de sua via de sinalização, e a regulação da função do gene supressor de tumor pRb^{190, 194}.

A fosforilação do pRb resulta na liberação do fator de transcrição E2F (Figura 2.3) e da ativação subsequente de genes necessários para a síntese de DNA, que leva as células à fase S^{166, 167, 168, 195, 196, 197}.

As proteínas relacionadas à pRB, p107, p130 são substratos fisiologicamente importantes para os complexos da Ciclina D/CdK4/6 e apesar de outros substratos existirem, como os fatores de transcrição myb-like ou mib¹⁹⁸, a fosforilação da pRB pelo complexo Ciclina D/CdK4/6 ocorre tardiamente durante a fase G1 e revoga sua função inibidora de crescimento^{190, 198}.

Ainda como inibidores das CdKs 4/6 temos a família da INK4 que inclui os genes supressores de p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, e p20^{INK4d}^{172, 195, 199, 200, 201, 202}.

Muitos tumores humanos abrigam a deleção ou mutação do gene p16²⁰⁰, embora nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço a metilação é reportada como o principal mecanismo da inativação do p16²⁰³. Essa inativação age potencializando a unidade oncogênica da Ciclina D1, desregulada nos tumores de cabeça e pescoço^{187, 188}. Na maioria das células de tumores primários de carcinoma de boca, a super expressão da ciclina D1 parece independente da inativação da p16/INK4^{195, 199, 200}.

A fosforilação do complexo Ciclina/CdK é ativada pela quinase CdK (CAK), enquanto que o complexo ciclina/CdK é negativamente regulado por uma quantidade de inibidores de CdK (Ckis)¹⁹⁰. Ckis pertencem a duas grandes famílias, INK4 e Cip/Kip, baseado em suas propriedades estruturais e funcionais. A família Cip/Kip inclui p21, p27 e p57 e é um amino terminal homólogo que contém regiões

de ciclina e CdK contíguas unidas^{204, 205, 206, 207, 208}, enquanto que os membros das famílias Cip/Kip especificamente inibem a atividade da CdK2 pela ligação de ambos aos complexos de ciclina E/CdK2 e ciclinaA/CdK2²⁰⁰.

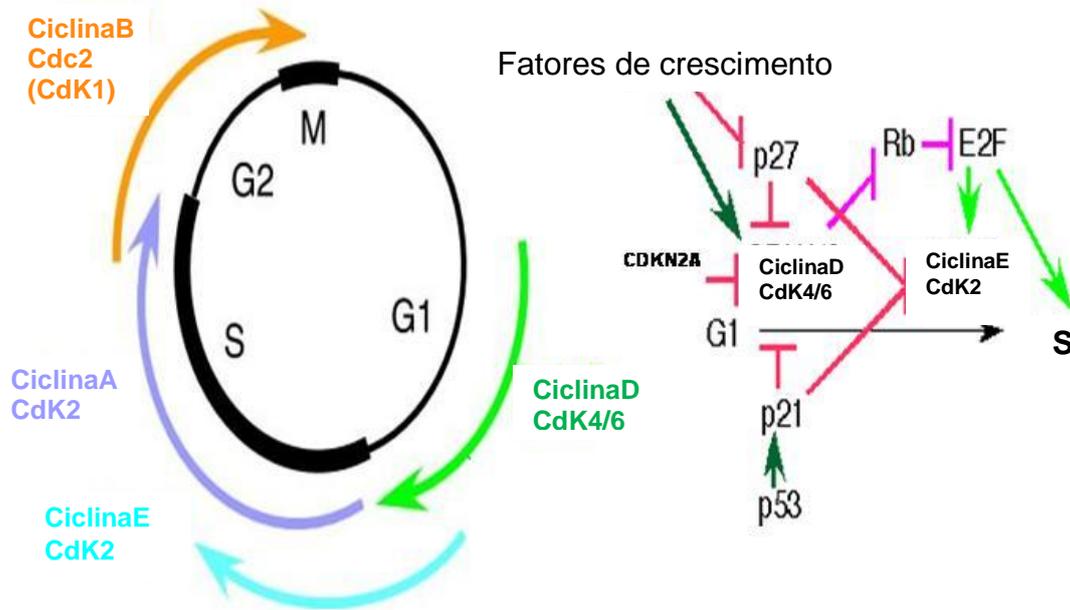


Figura 2.3 - Representação esquemática do envolvimento das ciclinas e das quinases dependente de ciclinas (CdK) em algumas fases do ciclo celular²⁰⁹. (Modificada pela autora)

2.5 *VISCUM ALBUM* (VA)

Na resolução RE nº 1027, de 9 de julho de 2001, foi concedida pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a liberação e comercialização do *Viscum album*, em todo o território nacional.

“O Diretor da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere a Portaria 724, do Diretor Presidente, de 10 de outubro de 2000, e tendo em vista o inciso IV do art. 50 e o § 3º do art. 111 do Regimento Interno aprovado pela Portaria n.º 593, republicada no D.O.U. de 22 de dezembro de 2000, considerando o art. 12 da Lei n.º 6.360, de 23 de setembro de 1976, resolve:

Art.1º conceder o Registro de Produto Similar, Medicamento Homeopático Novo, Nova Concentração, Nova Apresentação Comercial, Novo Acondicionamento, Alteração de Registro por Modificação de Adjuvante, Cancelamento Total de Registro do Produto a Pedido, Retificação de Publicação de Registro, Inclusão de Marca - Resolução 510/99, de produtos farmacêuticos”²¹⁰.

O *Viscum album Linnaeus* é uma planta semiparasita da família Lorantáceas, que habita do norte da Europa ao noroeste da África, o sudoeste e o centro da Ásia e o Japão²¹¹. É comum nos depararmos com a nomenclatura “*Mistletoe*”, muitas vezes utilizada para designar essa subespécie.

O *Viscum album* utilizado no tratamento das neoplasias é constituído pelo extrato da planta total, o que implica numa composição de grande complexidade química²¹¹.

Suas preparações são frequentemente utilizadas em conjunto com as terapias convencionais como: quimioterapia e/ou radioterapia²¹². A utilização de seu extrato no tratamento posoperatório, em combinação com a terapia convencional, tem demonstrado uma melhora na qualidade de vida e intervalos livres de recidiva em pacientes com câncer de mama^{213, 214}. Além disso, alguns pacientes são capazes de suportar melhor a agressividade das sessões de quimioterapia quando recebem, ao mesmo tempo, suporte complementar com a utilização do extrato de VA²¹⁴.

Estudos “in vitro” realizados em linhagens celulares e culturas primárias de células cancerígenas têm demonstrado que vários tipos de VA podem exercer

efeitos citotóxicos em uma variedade de células de carcinoma, desta maneira, sendo capazes de ativar a cascata apoptótica ou levando essas células à necrose^{215, 216, 217}. Até o momento nenhum estudo “in vitro” foi direcionado para estabelecer esse potencial de citotoxicidade em células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço.

Outras propriedades atribuídas a esses extratos foram as suas propriedades imunomoduladora e antiangiogênica²¹⁸.

Em estudos desenvolvidos por Elluru e colaboradores, ficou demonstrada a ação de VA em reduzir a densidade vascular do tumor em até 66%. Esse resultado foi atribuído à formulação do VA derivado do carvalho, VA Qu Spezial. Os autores relataram ainda que esse potencial está relacionado ao índice de apoptose das células endoteliais provocada pelo efeito citotóxico da quantidade de lectina contida nessa formulação²¹⁹.

As preparações originárias de arbustos que crescem em diferentes árvores hospedeiras possuem quantidades diferentes de princípios ativos e composições distintas, as quais resultam em efeitos citotóxicos de várias magnitudes²¹⁶. Além disso alguns trabalhos demonstraram que esses preparados são capazes de influenciar de forma diferente o perfil de expressão gênica de células de carcinoma de mama²¹⁵. É muito provável que o efeito citotóxico das VA seja parcialmente provocado pela lectina do tipo I, conhecida como *Mistletoe Lectina I*, representada por ML-I (ML é a abreviação do termo em inglês, *mistletoe lectin*). Um recombinante dessa proteína tem mostrado ser um potente agente que é capaz de reduzir a proliferação celular e induzir a apoptose numa concentração de 0,1-1 ng/mL^{220, 221}. Entretanto a toxicidade “in vitro” do VA nem sempre está relacionada à quantidade de lectina sugerindo, desta forma, que outros componentes podem igualmente exercer um papel de toxicidade^{215, 216}.

Os polissacarídeos do VA possuem interação com ML-I, demonstrada por sua capacidade de ligação com essas proteínas²²². Isto indica que ao se tentar isolar apenas um princípio ativo no VA, como na maioria dos fitomedicamentos, muito provavelmente as interações vitais com outros compostos poderão se perder, mesmo que ainda não sejam completamente conhecidas^{211, 222}.

O VA está disponível em várias formulações e preparos diferentes, sendo que essas diferenças podem ser atribuídas, por exemplo, à variação das espécies hospedeiras e/ou aos processos de manufatura destes compostos, podendo desta

maneira, definir quimicamente o principal componente da mistura^{215, 216}. Devido a heterogeneidade desta composição, certamente irá provocar respostas particulares para cada tipo de célula tumoral^{215, 216}. Os principais componentes, de importância terapêutica, já identificados nesses compostos são: lectinas, viscotoxinas, polissacarídeos²¹¹, aminoácidos²²³ e lipídeos²²⁴. Essas substâncias, agindo de modo combinado, têm efeito antitumoral e imunoestimulante²¹¹.

As viscotoxinas, que durante o verão atingem a concentração máxima²²³, estão concentradas na periferia do arbusto do VA, principalmente nas folhas e em menores quantidades no caule, sendo a isoforma A1 mais abundante nas sementes²²⁴, enquanto que as lectinas estão concentradas na região mais central da planta (caule e rizóide), com atividade máxima no inverno²²⁵.

2.5.1 Viscotoxinas

As viscotoxinas encontradas no *Viscum* da Europa, subespécies *Viscum album*, são polipeptídeos de baixo peso molecular (aproximadamente 5 kDa²²⁶), altamente básicos, ricos em cisteínas²²³, contendo 46 aminoácidos, compartilhados numa sequência de alto grau de similaridade, contendo três pontes dissulfeto²²⁷. Com base na sequência homóloga, as viscotoxinas pertencem a duas famílias das tioninas, α e β , as quais incluem várias proteínas de origem vegetal²²⁶. A principal característica confirmada e relatada de quase todas as tioninas é o seu efeito citotóxico em vários sistemas biológicos, com suas propriedades: fungicida e bactericida, além de sua ação tóxica em insetos²²⁸. Essas moléculas de peptídeos antimicrobianos catiônicos comprovaram alta toxicidade contra as células tumorais²²³. A explicação para essas propriedades antitumorais está na presença da carga positiva da superfície, e sugere a possibilidade de lados de interações com moléculas que trazem potenciais de superfície negativos, como as membranas fosfolipídicas²²³. O padrão de unidade estrutural do tipo dissulfeto parece ser o responsável por estabilizar um tipo de estrutura comum presente em várias proteínas pequenas, capazes de interagir com a membrana plasmática²²⁶. Acredita-se que o padrão de distribuição dos resíduos de cisteínas, todos envolvidos nas pontes dissulfeto, é responsável por essa interação²²⁶. Desta forma, a toxicidade da tionina é exercida por meio da desestabilização e consequente ruptura da membrana plasmática, embora esse tipo de mecanismo não esteja totalmente

elucidado. Foi ainda proposto que a tionina induz a formação de canais de íons na membrana plasmática, causando a dissipação da concentração de gradientes de íons²²⁹. Outra possível teoria sobre sua ação citotóxica é que essa ruptura da membrana seja provocada por meio da interação eletrostática da tionina com a carga negativa dos fosfolipídeos²³⁰.

Algumas isoformas das viscotoxinas foram caracterizadas, tais como: A1, A2, A3, B, 1-PS²³¹ e UP-S²²⁷ que parece ser um produto transformado da 1-PS^{223, 227}.

Estudos sugerem que a isoforma A3 é uma das três viscotoxinas mais abundantes no extrato do VA. A mesma, devido a sua pronunciada característica hidrofóbica, juntamente com as isoformas A2 e B, interage fortemente com as biomembranas, ao mesmo tempo em que possui uma grande afinidade pela fosfatidilserina fosfolipídica ácida (FFA) da membrana plasmática²³², se ligando paralelamente à superfície da mesma e modificando sua organização supramolecular. O resultado de sua citotoxicidade é obtido por meio de um efeito de enrijecimento²³³. As células tumorais expressam sete a oito vezes mais FFA do que células não-tumorais, o que explica a especificidade de sua ação citotóxica²²⁹. Assim como as células que estão entrando em apoptose, geralmente possuem uma proporção significativa de FFA no folheto externo da membrana. Isso é uma rara ocorrência em células eucarióticas onde a assimetria lipídica é ativamente mantida e a FFA ocorre somente no folheto interior da membrana²³⁴.

2.5.2 Lectinas

As lectinas, toxinas heterodiméricas, são glicoproteínas termolábeis, sensíveis à variação do pH. Descrevem-se três isoformas de lectinas europeias presentes no VA, *Mistletoe Lectin* (ML): ML-I (*viscumin*), ML-II e ML-III²²⁵. As lectinas possuem duas cadeias, A e B, que se diferem em termos de peso molecular, quando comparadas. Assim para a ML-I temos 29 e 34 kDa, para a ML-II, 27 e 32 kDa, e para ML-III, 25 e 30 kDa, respectivamente²³⁵.

A mais estudada e mais freqüente é a ML-I, uma glicoproteína inativadora de ribossomo tipo 2, (ribosomeinactivating protein, RIPII). A cadeia A, que é a parte cataliticamente ativa, tem uma atividade N-glicosidase, por conta de sua propriedade

inativadora de ribossomo, desta maneira aprisionando a síntese protéica no interior da célula²³⁶.

A cadeia B possui uma propriedade de ligação específica da toxina com o receptor, na superfície da célula neoplásica. Após essa ligação, ocorre a endocitose da subunidade A para o citossol²³⁷, a qual é levada à rede transgolgi e desta ao retículo endoplasmático, onde sofre translocação²³⁸. Depois da internalização da cadeia A, acontece a inativação da subunidade ribossomal 60S e a depuração de um único resíduo de adenosina dentro do 28S rRNA²³⁹. Essa ligação é específica para galactose, além de carboidratos ou glicoconjugados contendo D-galactose²³⁸. A grande potência dessas toxinas é evidenciada pelo fato de que poucas moléculas no citossol são suficientes para matar a célula tumoral²⁴⁰. A cadeia B se ligando à superfície celular causa aglutinação “in vitro”²⁴¹, ao mesmo tempo em que facilita a internalização da toxina, razão da alta citotoxicidade da RIPII em comparação à cadeia RIPI²⁴². Essas cadeias estão unidas por uma ligação dissulfeto, como os outros membros desta mesma família, incluindo-se a ricina e abrina, caracterizadas no grupo das toxinas vegetais, as quais exercem suas propriedades citotóxicas pela inibição da síntese protéica^{236, 237, 238, 239}. Essas subunidades quando analisadas individualmente parecem não possuir propriedades citotóxicas²³⁸.

A ML-I possui efeito citostático em cultura de células tumorais, induz apoptose, aumenta a secreção de citocinas próinflamatórias²⁴⁰, tais como: interleucina 1 e 6, TNF- α (Tumor Necrose Factor), fator estimulante de macrófago e granulócito^{241, 242, 243} estimula a proliferação e a atividade das células *natural killer* (NK)²⁴⁰, além de aumentar a proliferação de células progenitoras hematológicas e a atividade fagocitária²⁴⁴. Assim, a lectina do VA estimula a imunovigilância mediada pelo NK de ação antitumoral e antiviral, além de induzir, por meio das citocinas secretadas, um padrão imunológico tipo TH1, extremamente interessante na condição do câncer de padrão TH2²⁴⁴. Algumas investigações supõem que a ML-I é o componente mais ativo dos extratos, sob o ponto de vista desta habilidade imunomoduladora^{245, 246} e alguns pesquisadores acreditam ainda, que a atividade antitumoral das lectinas é preferencialmente devido à habilidade imunomoduladora mais do que a citotoxicidade²⁴⁷.

Experimentos apontaram que a administração de ML-I proporcionou um aumento de β -endorfina no plasma sanguíneo²⁴⁸, um oligopeptídeo que diminui a resposta de dor no sistema nervoso central²⁴⁹.

Porém, a contribuição das lectinas ML-II e ML-III e outros compostos como as viscotoxinas, não deveria ser ignorada. A ML-II possui afinidade específica para β -galactosídeo, N-acetil-galactosamina e polissacarídeos, induz seletivamente a morte celular por apoptose em células tumorais e não em linfócitos normais²⁵⁰. A ML-III possui afinidade para a N-acetilgalactosamina, sendo a mais citotóxica “in vitro”²⁵¹, em torno de 10 vezes mais em comparação com a ML-I²⁵².

Ribereau-Gayon e colaboradores, em 1997, demonstraram uma inibição do crescimento das células Molt 4 (leucemia). Isso ocorreu com baixa concentração de lectina (pg/mL), enquanto as células eram cultivadas em meio de cultura sem adição de soro. O primeiro evento observado foi a perfuração da membrana plasmática e a protrusão dos elementos do interior celular²⁵².

Num estudo realizado por Bantel e colaboradores em 1999, foi observado que células de linhagens de leucemia T e B, tratadas com ML-I desencadearam morte celular por apoptose. Para esse estudo foi utilizado um peptídeo inibidor da cascata de apoptose, o qual foi quase completamente capaz de prevenir o efeito da ML-I. Esses autores demonstram ainda, que ML-I é capaz de potencializar o efeito de drogas quimioterápicas²⁵³.

A distinção na citotoxicidade encontrada entre as toxinas da ML pode ser devido às diferenças da especificidade de seus carboidratos assim como as particularidades no transporte intracelular das subunidades enzimáticas^{245, 246}.

3 PROPOSIÇÃO

Verificação da ação “in vitro” de três extratos fermentados padronizados de *Viscum album* em duas linhagens celulares de carcinoma epidermoide de língua, de forma controlada e comparativa.

Determinação da dose dos fármacos a ser utilizada, por meio de testes com o fármaco Iscador Qu Spezial, definindo a IC₅₀.

Comparar a ação dos três extratos de *Viscum album* quanto à inibição da proliferação e morte celular, buscando elucidar o mecanismo de ação, seja por apoptose ou por necrose.

Esclarecer o mecanismo de ação quanto à inibição da proliferação celular, avaliando a via de sinalização PI3K/Akt/PTEN e Ciclina D1, buscando verificar a expressão dos genes envolvidos e sua tradução protéica, de forma qualitativa e quantitativa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em 9 de junho de 2009, sob o nº 122/2008 (ANEXO A).

4.1 MATERIAIS

Os experimentos foram realizados utilizando células de linhagem de carcinoma epidermoide de língua: SCC9 (ATCC, Nº de catálogo CRL-1629), proveniente de paciente do sexo masculino, 25 anos de idade e SCC 25 (ATCC, Nº de catálogo CRL-1628) proveniente de paciente do sexo masculino, 70 anos de idade.

Foram utilizados três tipos diferentes de extratos aquosos fermentados injetáveis, da planta *Viscum album*, derivados de diferentes árvores hospedeiras: Carvalho, Pinheiro e Macieira. Cada extrato difere em suas concentrações dos princípios ativos atuantes, os quais estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Nome comercial, procedência e quantidades de lectinas e viscotoxinas dos tipos de *Viscum album* utilizados

	Nome comercial e concentração de extrato por ampola	Árvore hospedeira	Quantidade de Lectina	Quantidade de Viscotoxina
VA <i>Spezial</i>	Iscador Qu 5mg	Carvalho	375 ng/mL	15 µg/mL
	Iscador P 10mg	Pinheiro	10 ng/mL	5 µg/mL
	Iscador M 5mg	Macieira	250 ng/mL	10 µg/mL

Esses fármacos são desenvolvidos e provenientes dos laboratórios do Instituto Hiscia (Suíça), e são comercializados pela Indústria Farmacêutica Weleda. Os extratos são acondicionados em ampolas de vidro contendo 1 mL de volume total de conteúdo injetável estéril. O princípio ativo é o extrato vegetal fresco fermentado, o qual é diluído em solução fisiológica. O nome comercial dessas ampolas contendo *Viscum album* é “Iscador”, desta maneira, todas as vezes que, no decorrer do

trabalho, nos referirmos aos fármacos, esta nomenclatura será utilizada. A formulação Qu provém da Suíça, portanto é o Iscador Qu Spezial. Spezial é a denominação que se refere à padronização da quantificação dos dois princípios ativos, lectinas e viscotoxinas, nas ampolas, diferente do Iscador não Spezial. Vale acrescentar ainda, que as apresentações e denominações utilizadas pela ANVISA no Brasil são: D1 para 20 mg, D2 para 10 mg, D2 50% para 5 mg, D3 para 1 mg, D4 para 0,1 mg, e D5 para 0,01 mg.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultivo celular

As células de carcinoma estavam acondicionadas em tubos especiais e meio próprio para congelamento, em tambor de Nitrogênio líquido, em temperatura de -180°C . Os experimentos tiveram início com o descongelamento e cultivo dessas células, objetivando a propagação para obtenção de quantidades necessárias para o desenvolvimento dos experimentos. As células (SCC9 e SCC25) foram cultivadas com meio de cultura, constituído por: DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) (Sigma, cat. D6429) e meio de Ham F12 (Gibco, cat. 11765) (na proporção de 1:1), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco cat. 12.657-029), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), gentamicina (50 $\mu\text{g/mL}$), anfotericina B (2.5 $\mu\text{g/mL}$) e glutamina (4 mM) (Gibco BRL: 21.051-040), em garrafas próprias para cultivo celular.

Essas células foram incubadas a 37°C em incubadora úmida com 5% de CO_2 , até atingirem a subconfluência, ou seja, até preencherem 70% a 80% da área total da garrafa de cultura. Após atingirem a sub-confluência eram realizados os repiques, conseqüentemente a amplificação dessas células, para posterior utilização das mesmas nos experimentos²⁵⁴.

4.2.2 Tripsinização das células

Quando as células atingiram a subconfluência, procedeu-se a tripsinização. Primeiramente todo o meio de cultivo foi retirado com o auxílio de uma pipeta e reservado. Em seguida as células, aderidas à garrafa, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.5, e a mesma, em seguida, aspirada. Na garrafa foi colocada solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% por 10 a 15 minutos, sendo a mesma neutralizada, em seguida, com o meio de cultivo anteriormente reservado. Essa operação faz com que a função enzimática da tripsina seja neutralizada pelo soro fetal bovino, contido no meio de cultivo. Em seguida, todo o conteúdo da garrafa (células, tripsina/EDTA e meio de cultivo) foi retirado com o auxílio de uma pipeta e colocado em um tubo próprio para centrifuga, para em seguida ser centrifugado a 1500 rpm, durante 5 minutos. Após a centrifugação, todo o meio de cultura (sobrenadante) foi aspirado, deixando no fundo do tubo o precipitado celular. Essas células foram ressuspensas em um novo meio de cultivo, descrito anteriormente, contadas em câmara hemocitométrica sob microscópio de luz invertida, e novamente semeadas (6×10^3 células/cm²), em garrafas próprias para cultura de células. Essas células foram mantidas em cultura, em atmosfera úmida à 37°C com 5% de CO₂, com troca de meio de acordo com a necessidade metabólica, para novamente serem utilizadas quando atingirem a subconfluência²⁵⁴.

Todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar do tipo vertical.

4.2.3 Teste de viabilidade celular

As células foram semeadas em placas contendo 96 poços, cada poço com 0,335 cm² de área. Em cada poço foram semeadas 3×10^3 células (em torno de 9×10^3 células/cm²) com o meio de cultura original descrito anteriormente, utilizado para o cultivo dessas células. Os testes foram realizados em triplicata, sendo que

nos poços, contendo os controles, foram feitas dez repetições. Após 24 horas, todo o meio, contido nos poços, foi aspirado e um novo meio de cultura, desta vez, acrescido com o respectivo fármaco, nas diferentes concentrações, foi adicionado. Como controle dos experimentos, foi utilizado 100% de meio de cultura. Um segundo tipo de controle, denominado de “Branco” foi utilizado. O Branco nada mais é do que 10% de solução fisiológica, do volume total de meio de cultura utilizado. A solução fisiológica é o veículo utilizado para a diluição do fármaco e a obtenção da solução aquosa, desta maneira, todas as diluições utilizadas para os experimentos, foram complementadas com solução fisiológica para totalizar 10% do volume final de meio de cultivo. O fármaco utilizado para esse experimento foi o Iscador Qu Spezial. As diferentes diluições, as quais resultaram nas concentrações utilizadas para esse teste, estão apresentadas na Tabela 4.2:

Tabela 4.2 - Diluições do fármaco utilizado, Iscador Qu Spezial, e as concentrações correspondentes as diluições

<i>Diluições</i>	<i>Quantidade de Iscador Qu por mL de meio de cultura</i>
1/38	0,13 mg/mL
1/35	0,14 mg/mL
1/33	0,15 mg/mL
1/30	0,16 mg/mL
1/28	0,17 mg/mL
1/25	0,2 mg/mL
1/23	0,21 mg/mL
1/20	0,25 mg/mL
1/18	0,27 mg/mL
1/17	0,29 mg/mL
1/15	0,33 mg/mL
1/14	0,35 mg/mL
1/10	0,5 mg/mL

Após 24 horas foi realizado o primeiro teste de viabilidade celular com o MTS Kit Cell Titer96 (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Em cada poço da placa de 96 poços contendo as células, todo o meio de cultura foi removido e adicionado 100 µL de meio de cultura novo e 10 µL de da solução de MTS: Cell Titer96. Tomando-se o cuidado de proteger o máximo possível da luz, durante todo o

procedimento. Esse é um teste de citotoxicidade, o qual se fundamenta no procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund & Puerner²⁵⁵ para triagem de agentes citotóxicos sobre monocamada celular. O método é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio (MTS). O MTS é biorreduzido pelas células, baseado na conversão celular do sal tetrazolium incolor, em formazam azul, pelas enzimas desidrogenase presentes em células metabolicamente ativas. Isso resulta em um produto que é solúvel no meio de cultura, propiciando assim uma análise espectrofotométrica do corante incorporado²⁵⁶. Desta maneira, o meio torna-se intensamente azulado, quanto maior a quantidade de células viáveis presentes naquele poço. As células com a solução foram incubadas por duas horas, à 37°C. Ao término da reação procedeu-se a leitura num leitor de ELISA (EXL 800BIO-Tek instruments Inc.) com um comprimento de onda de 490 nm, para a detecção do grau de absorbância. O mesmo procedimento foi repetido após 48 e 72 horas.

4.2.3.1 Metodologia Estatística

Para a aplicação dos testes estatísticos o nível de significância adotado foi de 5% (0,05), ou seja, quando o valor de significância calculada (p) for menor do que 5% (0,05), observa-se uma diferença ou uma relação dita “estatisticamente significativa” (salientada em negrito), e quando o valor de significância calculada (p) for igual ou maior do que 5% (0,05), observa-se uma diferença ou relação dita “estatisticamente não-significante”.

Foi feita uma comparação entre o controle e as concentrações do fármaco utilizadas. Para isso foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com o intuito de verificar possíveis diferenças, para as variáveis de interesse, entre o controle e cada concentração²⁵⁷.

O programa utilizado para a obtenção dos resultados nestes testes foi o SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0.

4.2.4 Análises das células apoptóticas pelo método Tunel

Após prévia tripsinização e contagem, as células foram cultivadas, sobre lamínulas de vidro, de formato redondo, com 15 mm de diâmetro e 0,13-0,17 mm de espessura. Essas lamínulas foram previamente esterilizadas e colocadas em poços, com 3,8 cm² de área, em placas próprias para cultivo celular, contendo doze unidades. Foram semeadas $1,3 \times 10^5$ (em torno de $3,4 \times 10^3/\text{cm}^2$) de células por poço.

No primeiro dia de experimento, as células foram semeadas com o meio de cultura original e condições descritas anteriormente.

Após 24 horas, todo este meio de cultivo foi aspirado e um novo meio, acrescido com os respectivos fármacos (Iscador Qu, Iscador P e Iscador M) na concentração de 0,3 mg/mL de meio de cultura, previamente determinada, foi colocado e as placas incubadas sob as condições descritas. Este experimento foi realizado em duplicata, com os respectivos: controle e branco. Tanto o branco, quanto os poços contendo os fármacos, possuíam 10% do volume total de solução fisiológica e solução fisiológica mais princípio ativo, respectivamente.

A fixação foi feita com solução de paraformaldeído a 4% (diluído em PBS, solução tampão), por 25 minutos a 4°C, após uma primeira lavagem com PBS.

Após a fixação, foram feitas duas lavagens de 5 minutos cada, com PBS, em temperatura ambiente.

As lamínulas foram permeabilizadas com solução de Triton X 100 a 2%, diluída em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente.

Após a permeabilização, foram realizadas mais duas lavagens por 5 minutos cada, com PBS em temperatura ambiente. Após as lavagens, as lamínulas foram incubadas com a solução Equilibration Buffer, contida no kit DeadEnd Fluorometric Tunel System – Promega, por 5 a 10 minutos.

Após essa incubação, depois da remoção completa de toda a solução, foi realizada nova incubação com solução rTdT incubation buffer, em câmara úmida, ao abrigo de luz, por 20 minutos à 37°C e por mais 40 minutos em temperatura ambiente.

Para cada lamínula, foram utilizados 18 uL de rTdT Incubation Buffer, composto por: 16 uL de Equilibration buffer (88%), 1,8 uL de Nucleotid Mix (9,91%) e 0,36 uL de rTdT Enzime (1,98%).

Decorrido o tempo de incubação e após a remoção de todo excesso da solução anterior, foi dado início à última incubação, feita agora com a solução 20 X SSC (solução tampão feita com citrato de sódio e cloreto de sódio, NaCl), diluída em 1:10 de água deionizada, portanto obtida uma solução final de 2 X SSC, por 15 minutos, em temperatura ambiente e protegida de luz. Após esse período, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS, durante 5 minutos por três vezes. Após essas lavagens, as lamínulas foram montadas com, cerca de 18µL de meio de montagem VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010), sobre lâminas de vidro, limpas previamente com álcool absoluto e fixadas com a utilização de esmalte incolor.

Em seguida as lamínulas foram visualizadas e analisadas qualitativamente em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as respectivas imagens capturadas.

Todo o procedimento foi novamente repetido após 48 horas de incubação com os respectivos fármacos analisados.

Este sistema detecta o DNA fragmentado das células apoptóticas por meio da incorporação catalítica da fluoresceína-12-dUTP à extremidade final 3'-OH do DNA, utilizando a enzima recombinante Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT). A fluoresceína-12-dUTP, ligada ao DNA, pode ser visualizada diretamente pelo microscópio de imunofluorescência. A análise ao microscópio exibiu coloração verde fluorescente as células apoptóticas e em azul fluorescente, por meio da utilização do DAPI contido na solução de Vectahield, os núcleos de todas as células fixadas nas lamínulas, tanto as apoptóticas, como as células viáveis.

4.2.5 Análise quantitativa de apoptose por Anexina V FITC e Iodeto de Propídeo

A apoptose foi analisada quantitativamente pelos reagentes FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (cat. 556547, BD), utilizado de acordo com os procedimentos do fabricante.

Foram semeadas $1,3 \times 10^5$ células em garrafas próprias para cultivo celular, com 25 cm^2 de área ($5,2 \times 10^3/\text{cm}^2$) com o meio de cultura original descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições que os experimentos anteriores, nas mesmas concentrações e tempos. Desta maneira, após 24 horas de cultivo inicial, todo o meio de cultivo foi removido e um novo meio foi adicionado, como os respectivos fármacos, nas concentrações predeterminadas, mais o controle e o branco. Após 24 e 48 horas respectivamente, as células foram tripsinizadas e colocadas em tubos próprios para centrifuga. As amostras foram centrifugadas a 1.500 rpm, durante 10 minutos, e todo o sobrenadante aspirado. Em seguida o precipitado celular foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta e colocado em placas de 96 poços, com fundo arredondado. Foi adicionado 100 μL de solução tampão, previamente diluído com água deionizada, conforme instruções do fabricante. As células foram centrifugadas, mais uma vez, agora por 5 minutos a 1.500 rpm, a solução aspirada e em seguida essas células foram ressuspensas na própria placa, com o auxílio de um vórtex, como o objetivo de soltá-las.

Essas células foram então ressuspensas em 50 μL da solução tampão, acrescida com 5 μL da solução de anexina, mais 5 μL da solução de iodeto de propídeo. Depois de homogeneizá-las, essas células foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente em local protegido de luz. Após o tempo de incubação, as amostras foram ressuspensas em 400 μL de solução tampão, totalizando 500 μL de volume final.

Foi então realizada a leitura das amostras, dentro de 1 (uma) hora, após o tempo de incubação, num equipamento BD FACSAria, utilizando o programa FACSDIVA, versão - 6.1.3.

4.2.5.1 Metodologia Estatística

Para a aplicação dos testes estatísticos foi adotado o nível de significância de 5% (0,05), ou seja, quando o valor da significância calculada (p) for menor do que 5% (0,05), observamos uma diferença ou uma relação dita “estatisticamente significativa”, e quando o valor da significância calculada (p) for

igual ou maior do que 5% (0,05), observamos uma diferença ou relação dita “estatisticamente não-significante”.

Primeiramente foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis para verificar diferenças entre os fármacos analisados, quando comparados concomitantemente.

Após ser detectado algum valor de significância estatística, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, ajustado pela Correção de Bonferroni, para a complementação das análises, comparando-se os fármacos par a par²⁵⁷.

O programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0, foi utilizado para a obtenção dos resultados.

4.2.6 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

4.2.6.1 Obtenção do RNA

Para a realização das reações de qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa), foi feita a extração do RNA total das células pelo método do fenol-clorofórmio (TRIzol®, Invitrogen Carlsbad, CA, USA), utilizando o reagente TRIzol, seguindo protocolo recomendado pelo fabricante.

As células, $1,2 \times 10^6$ (em torno de $15 \times 10^3/\text{cm}^2$), foram semeadas em placas com 78 cm^2 de área. Após 24 horas foi dado início aos experimentos, utilizando os mesmos procedimentos para as análises anteriores, ou seja, a incubação com os respectivos fármacos, controle e branco, nas concentrações pré-determinadas (0,3 mg/mL).

Após 24 horas de incubação, procedeu-se a extração do RNA, iniciando-se com a retirada de todo o meio de cultivo, seguida de duas a três lavagens com PBS gelado. As placas de cultivo, contendo as células, foram então colocadas sobre placas congeladas em capela de exaustão. Foi adicionado 1 (um) mL de solução de TRIzol® em cada placa e após 5 a 10 minutos, com auxílio de raspadores próprios, foi realizada a colheita do material e o mesmo foi transefido para tubos de polipropileno, de 1,5 mL de volume, livres de RNase e Dnase (Dnase e Rnase free).

Em seguida as amostras foram mantidas em gelo até a centrifugação, a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C.

O sobrenadante das amostras foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Os tubos foram, delicadamente, agitados por inversão, durante 1 (um) minuto e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos, para dar início à separação das fases. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas, a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C.

A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis de 2,0 mL, onde foram adicionados 500 µl de isopropanol (volume/volume) e agitado por inversão, durante 1(um) minuto. Especial cuidado foi tomado ao transferir o sobrenadante com a pipeta, pois na interface se encontravam as proteínas alifáticas, representadas por um halo branco, as quais não deveriam ser retiradas.

As amostras foram, mais uma vez, centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante dos tubos, onde os precipitados ou “pellets” estavam fixados no fundo, foi descartado, emborcando-os e os mesmos foram lavados com 1 (um) mL de etanol gelado a 70% (preparado com água DEPC, dimetil pirocarbonato), de três a cinco vezes, tomando-se o cuidado de a cada lavagem, centrifugá-los por 2 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. Em seguida os precipitados foram secos, em banho seco, a 42°C, por 1 ou 2 minutos e ressuspensos em 10 µl de água DEPC, e mais uma vez, deixados em banho seco por 10 minutos, desta vez a 55°C, para melhor solubilização.

As amostras foram acondicionadas em freezer, à temperatura de -80°C.

A pureza do RNA extraído foi verificada por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ cuja razão $A_{260/280}$ variou entre 1,3 a 1,9. A qualidade do RNA, avaliada pela sua integridade, foi feita por meio de gel de agarose a 1% de tampão TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA), sendo considerada ótima quando as bandas ribossômicas 28S e 18S apresentaram-se nítidas e intensas, numa razão aproximada de 2:1, respectivamente.

Em seguida, procedeu-se a etapa de tratamento com DNase I (Invitrogen) para as amostras de RNA com qualidade considerada satisfatória ou boa.

Em todas as etapas, a utilização das pipetas automáticas e ponteiras estéreis, livres de RNase e Dnase se fez presente.

4.2.6.2 Transcrição reversa

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa pela *MultiScribe*[™] transcriptase reversa, a partir de oligonucleotídeos randômicos (*High Capacity cDNA Archive kit*, Applied Biosystems, Foster City CA), para o volume final de reação de 20µL, utilizando-se 1µg de RNA total. A mistura, com todos os reagentes necessários para a reação, foi preparada e os tubos com as amostras foram colocados em termociclador (*Mastercycler*, Eppendorf), sendo submetidos a 25°C por 10 minutos, seguidos de um período de ciclagem de 120 minutos a 37°C e mais 5 minutos a 85°C.

4.2.6.3 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Com a finalidade de determinar a diferença da expressão gênica de maneira mais precisa, foram realizados estudos de expressão por meio de qRT-PCR. Desta maneira, a amplificação dos transcritos dos genes AKT1, AKT2 e AKT3, PTEN e CICLINA D1 foi avaliada por qRT-PCR, gerando dados quantitativos. O gene de expressão constitutiva GAPDH foi utilizado para controle de normalização de massa. Todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, foram desenhados a partir da sequência de mRNA do gene em questão, contidos no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. Os mesmos foram desenhados utilizando o programa Gene Tool 2.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá), de maneira que os primers estivessem em éxons diferentes, apresentando uma temperatura de associação entre 59 e 62°C e gerando produtos de tamanhos idealmente entre 80 e 200 pares de base, com concentração de G/C entre 40-60%, e a presença de no máximo dois nucleotídeos C e/ou G nas últimas cinco bases da extremidade 3'. As sequências dos iniciadores para os genes específicos e para o gene constitutivo, para análise de PCR em tempo real, estão apresentadas na Tabela 4.3. Os produtos de transcrição serviram de molde para a amplificação por qPCR.

Tabela 4.3 - Sequência dos iniciadores para os genes específicos e para os genes constiutivos utilizados nas reações de qPCR

Gene	Número de acesso	Iniciadores 5' 3'		Tamanho do produto
		Senso	Antisenso	
AKT1	NM 001014431.1	TTTTTGAGCTCATCCTCATGG	ACACGATACCGCAAAGAAG	168 PB
AKT2	NM 001626.3	TGCCCTTCTACAACCAGGAC	AACCTGTGCTCCATGACCTC	181 PB
AKT3	NM 005465.3	GAGGACCAGATGATGCAAAAG	TGAGGTTTAAAAGGAGGTACAAGC	103 PB
PTEN	NM 000314.4	AGTGGCACTGTTGTTTCAACAAG	GTGTGGGTCCTGAATTGGAG	185 PB
CICLINA D1	NM 53056.2	CGTGGCCTCTAAGATGAAGG	CTGGCATTTTGGAGAGGAAG	128 PB
GAPDH	NM 002046	GCATCCTGGGCTACACTGA	CCACCACCCTGTTGCTGTA	162 PB

PB = pares de base

As reações foram realizadas em um volume final de 10 uL, contendo 5 uL de SYBR® Green Master Mix® (Applied Biosystems), 0,3 uL de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso), na concentração de 10 pmol/μL, 1 uL de cDNA da amostra a ser testada e 3,4 uL de água deionizada estéril, em aparelho Rotor Gene RG-300 (Corbet Research).

O processo de ciclagem térmica constitui em desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos por desnaturação a 95°C por 15 segundos e associação (anelamento) e extensão a 60°C por 1 (um) minuto. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à etapa adicional para a obtenção da curva de dissociação com intuito de analisar a especificidade através da cinética de dissociação dos produtos amplificados. Para esta etapa, aumentou-se a temperatura de forma linear e a fluorescência emitida de cada produto único amplificado foi graficamente representada na ausência de qualquer curva de dissociação bimodal ou sinal anormal de amplificação. Todas as amostras experimentais foram amplificadas em duplicata técnica e para cada par de iniciadores a reação de qPCR apresentou um controle de contaminação, onde o cDNA da amostra foi substituído por água deionizada estéril.

A análise dos dados foi realizada por meio da quantificação relativa da expressão gênica, em relação às amostras calibradoras, definida como as células do grupo controle²⁵⁸.

A normalização foi feita por meio da média de amostras do Controle em relação às amostras tratadas: Branco, Iscador Qu, Iscador P e Iscador M.

Para atingir a melhor eficiência da reação para cada gene estudado, foram testadas diferentes concentrações finais dos oligonucleotídeos, a saber: 2,5 pmol/ μ L, 5 pmol/ μ L e 10 pmol/ μ L. A eficiência da reação foi calculada pela equação $E=10^{(-1/\text{slope})}$, em que "E" é a eficácia e "slope" é a inclinação da reta de melhor ajuste determinada por diluições seriadas de cDNA e o seu respectivo Ct (cycle threshold, número de ciclos requeridos para a amplificação de sinais) de amplificação.

4.2.6.4 Metodologia Estatística

Para as análises estatísticas foi feito primeiramente um estudo do efeito do tempo, tipo de célula e medicamento para as variáveis dos genes, pela aplicação da Análise de Variância Multivariada. Este tipo de análise teve o intuito de verificar do grau dos efeitos que todas as situações analisadas com relação ao controle, provocaram sobre os genes analisados. Como nos testes anteriores, o nível de significância adotado foi de 5% (0,05).

Como houve efeitos de interação estatisticamente significantes em todos os níveis abordados, foi feito um estudo do impacto de cada variável (fármaco, tempo e tipo de célula) na expressão desses genes. Verificou-se inicialmente se o impacto do tratamento com fármacos na expressão de cada um dos genes era significativo. Para isso foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis. Quando foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, ajustado pela Correção de Bonferroni, na tentativa de identificar quais os fármacos se diferenciam entre si, quando comparados em pares. Além disso foi feito um estudo comparando o efeito do fármacos sobre a expressão dos genes com relação ao tempo.

Para esse estudo foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, com a finalidade de observar se os efeitos provocados pelos fármacos obtiveram valores de significância estatística²⁵⁷.

O programa utilizado, para a obtenção dos resultados, foi SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0.

4.2.7 Imunofluorescência

Para essa análise, todo o procedimento teve início idêntico ao procedimento para as análises das células apoptóticas pelo método de Tunel, até o momento da primeira lavagem, ou seja, após 24 horas, as lamínulas de vidro foram lavadas três vezes com PBS gelado (dentro do próprio poço) e fixadas, com metanol, durante 6 minutos a -20°C. Em seguida, essas lamínulas foram lavadas mais três vezes com PBS novamente, tomando-se o cuidado de, na primeira lavagem colocar o PBS dentro do poço, contendo ainda o metanol.

Em seguida foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos, feito com solução de PBS e BSA (albumina sérica bovina) a 1%. Nesta etapa é importante manter a superfície da lamínula, onde as células estão aderidas, imersa na solução. Esse período de incubação foi realizado durante 30 minutos em câmara úmida a 4°C. Após a incubação, essas lamínulas foram novamente lavadas em PBS, mais seis vezes.

Para a realização desse experimento, foram selecionados três anticorpos de proteínas diretamente relacionadas com a via de sinalização da carcinogênese, as quais são frequentemente super expressas nas neoplasias malignas, sendo elas: pAkt, PTEN e Ciclina D1.

Então, a incubação com o anticorpo primário, foi realizada durante 90 minutos, em câmara úmida, a 4°C. O anticorpo primário foi diluído em PBS e BSA a 1%. Assim como durante a etapa de bloqueio, a solução deve permanecer, durante todo o tempo, em contato com a superfície da lamínula.

O anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 4.4 :

Tabela 4.4 - Anticorpos, diluições, fabricantes, hospedeiro e número de catálogos utilizados

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição</i>	<i>Empresa</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Catálogo</i>
pAkt	1:50	Santa Cruz	Coelho	Sc 7985
PTEN	1:50	Santa Cruz	Rato	Sc 7974
Ciclina D1	1:100	Santa Cruz	Rato	Sc 8396

Após a incubação com o anticorpo primário, antes da incubação com o anticorpo secundário, as lamínulas foram novamente lavadas, seis vezes, com PBS.

O anticorpo secundário, conjugado com fluoresceína (Novocastra Laboratories Ltda – UK) foi incubado numa concentração de 1:50, respectivamente anti-rato, para a Ciclina D1 e Pten e anti-coelho para pAkt, durante 45 minutos, em câmara úmida e escura, a 4°C.

Finalizado o tempo de incubação, as lamínulas foram novamente lavadas em PBS, seis vezes, para em seguida serem montadas com, cerca de 18µL de meio de montagem VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010), sobre lâminas de vidro, limpas previamente com álcool absoluto e fixadas com a utilização de esmalte incolor.

Em seguida as lamínulas foram visualizadas e analisadas qualitativamente em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as respectivas imagens capturadas.

Todo o procedimento foi novamente repetido após 48 horas de incubação com os respectivos fármacos analisados.

4.2.8 Western Blotting

4.2.8.1 Extração protéica

As células foram semeadas em placas com 78 cm² de área, numa quantidade de 1,2x10⁶ (em torno de 15x10³/cm²).

Após 24 horas foi dado início aos experimentos, utilizando os mesmos procedimentos para as análises anteriores, ou seja, a incubação com os respectivos controle, branco e fármacos, nas respectivas concentrações utilizadas para os experimentos anteriores (0,3mg/mL) .

Após 24 horas de incubação com os fármacos, foi realizada a colheita das proteínas, tendo início com a retirada de todo o meio de cultivo, seguida de duas a três lavagens com PBS gelado. As placas de cultivo, contendo as células, foram então colocadas sobre placas congeladas. Foram adicionados 1 mL de solução de RIPA⁺ (10 mol/L Tris HCl pH 7,5; 1% de desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF), acrescida de 10 µL/mL de um conjunto de inibidores de protease (Chemicon, Sigma, St. Louis,

MO) por um período de 20 minutos. Após esse período, as placas foram raspadas com raspadores apropriados para essa finalidade, e as células foram coletadas com o auxílio de ponteiras de 1000 µL acopladas as pipetas automáticas.

Todo o conteúdo lisado foi colocado em pequenos tubos cônicos, próprios para centrífuga (1 a 2 mL) e centrifugado em rotação máxima (15.000 rpm) durante 30 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta e conservado -80 °C.

4.2.8.2 Quantificação proteica

As proteínas dos lisados foram quantificadas, por meio do método do ácido biocinconinico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce Chemical CO, Rockford, IL, USA), seguindo as instruções do fabricante. Esse método tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre (Cu^{2+}) resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídeos com o cátion cuproso (Cu^+). Por sua vez, o ácido biocinconinico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA- Cu^+ , produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro (Elisa-ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.), no comprimento de onda de 562 nm. Assim, quanto maior a intensidade da cor púrpura, mais absorção de luz ocorre, significando maior quantidade de proteína.

Após a quantificação, as amostras foram analisadas por reação de Western-Blot.

4.2.8.3 SDS-Page

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS).

Dois tipos de gel foram confeccionados: um gel de separação e acima deste, um gel de empilhamento, ambos descritos na Tabela 4.5. No gel de

empilhamento foi colocado um pequeno dispositivo, que tem por objetivo formar canaletas onde, posteriormente, as amostras foram colocadas.

Tabela 4.5 - Composição dos Géis de bis-acrilamida a 10% (20 mL)

	Gel de separação 10%	Gel de empilhamento 5%
Água deionizada	16,1mL	12mL
Acrilamida/bisacrilamida	13,3mL	2,66mL
Tampão de separação	10mL	-
Tampão de empilhamento 4x	-	5mL
SDS 10%	0,4mL	0,2mL
Persulfato de amônia	0,4mL	0,2mL
Temed	26,6mL	10uL

Para a reação de eletroforese em gel, foram utilizados 10 µg de proteína de cada amostra analisada. Os experimentos foram realizados em triplicata. A quantidade de proteína, correspondente aos 10 µg, foi homogeneizada, juntamente com 6 µL de “tampão de amostra” (Sample Buffer), em pequenos tubos para centrífuga. Essas amostras foram fervidas, durante 5 minutos, para a denaturação das proteínas.

Em seguida, as amostras (proteína mais “tampão de amostra”) foram aplicadas em cada canaleta, as quais foram empilhadas no gel de empilhamento e posteriormente separadas no gel de separação. A eletroforese se deu a 120 Volts, 100 mA e 30 Watt durante 3 (três) horas. O padrão de peso molecular (variação 10-250 kD) utilizado foi: Kaleidoscope (BioRad, Hercules, Califórnia, USA).

Após a corrida das proteínas no gel, foi feita a transferência das mesmas para uma membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham CO, Arlington Heights, IL, USA). Essa transferência foi realizada por eletrotransferência úmida em aparelho especial (Hoefler, mini VE, Amersham CO, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), com utilização do tampão de transferência, como recomendado pelo fabricante, utilizando uma voltagem de 100 V, 70 mA, 30 W por 3 (três) horas²⁵⁹.

Finalizada a transferência, a membrana foi submetida ao bloqueio dos sítios inespecíficos, feita com 1% de BSA diluído em TBST para o anticorpo anti pAkt, por este ser fosforilado e 5% de leite em pó desnatado diluído em TBST para os anticorpos anti PTEN e anti ciclina D1, durante 1 (uma) hora sob agitação branda,

em temperatura ambiente. Após o bloqueio, foi realizada a incubação dos anticorpos primários, descritos na Tabela 4.6, diluídos nas mesmas soluções utilizadas para o bloqueio. Essa incubação foi feita sob agitação branda a 4°C, por 18 horas.

Tabela 4.6 - Anticorpos, diluições, fabricantes, hospedeiro e número de catálogos utilizados

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluição</i>	<i>Empresa</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Catálogo</i>
pAkt	1:700	Santa Cruz	Coelho	sc 7985
PTEN	1:100	Abcam	Coelho	ab 23694
Ciclina D1	1:75	Santa Cruz	Rato	sc 8396
β- Actina	1:7000	Sigma	Rato	AC-15

Após o período de incubação, para a remoção do anticorpo não absorvido, foram realizadas várias lavagens com TBST, sob agitação branda em temperatura ambiente. Para os anticorpos Ciclina D1 e PTEN, as lavagens foram rápidas com quantidade abundante de TBST (solução tampão: Tris-HCl, NaCl e Tween), em torno de três lavagens sob agitação branda. Para o anticorpo pAkt, por este ser um anticorpo fosforilado, é comum obter marcações inespecíficas, provocando “fundo”, portanto foram realizadas em torno de cinco lavagens, sob agitação branda de 5 minutos cada lavagem, em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários: anti coelho e anti rato respectivamente, diluído nas mesmas soluções de bloqueio (1:3000), foram então incubados por 1 (uma) hora, sob agitação branda em temperatura ambiente. Após essa última etapa de incubação, procedeu-se às lavagens, feitas com TBST, sob agitação branda, por 5 minutos cada, em temperatura ambiente.

A revelação foi realizada por detecção colorimétrica, com o auxílio do kit Opti-4CN (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA), segundo instruções do fabricante, ou seja: uma parte do diluente concentrado Opti-4CN, foi adicionada a nove partes de água deionizada. Utilizou-se cerca de 0,25 mL do total da solução, para cada cm² de membrana. As membranas foram incubadas no substrato por até 30 (trinta) minutos, em ambiente protegido de luz e em seguida lavadas em água deionizada por cerca de quinze minutos. Após esses procedimentos as membranas estavam prontas para

a documentação. Esta reação produziu uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse.

Como controle foi utilizado anticorpo gerado em camundongo: β -actina.

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR

O teste de viabilidade celular definiu a quantidade do fármaco a ser utilizada, para a inibição do crescimento e morte de 50% das células (IC₅₀). O fármaco demonstrou ser tempo dependente, pois houve uma correlação entre dose e tempo avaliados. O Iscador Qu Spezial foi utilizado em várias concentrações, com três intervalos de tempo, nas duas linhagens celulares SCC9 e SCC25. Em todos os experimentos que foi utilizado a formulação Qu, a formulação foi a Qu Spezial.

Para o controle foram feitas dez repetições e as demais amostras foram testadas em triplicata.

Os resultados foram obtidos primeiramente em valores de absorbância, gerados pela leitura da densidade ótica, detectada pelo comprimento de onda de 490 nm (4.2.3).

Os valores de absorbância que cada concentração testada gerou, foram revertidos em porcentagem, calculando a média gerada pela triplicata, dividida pela média das amostras controle, multiplicada por 100. Desta maneira foi obtida a porcentagem das células viáveis.

$$\text{Viabilidade celular \%} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO Células controle}} \times 100 \quad (\text{DO} = \text{densidade ótica})$$

A aplicação do Teste de Mann-Whitney foi utilizada com o objetivo de verificar possíveis diferenças entre o controle e cada concentração testada.

Baseado nesses resultados foi determinada a IC₅₀, estabelecida em 0,3 mg/mL para ambas as linhagens celulares, com um p valor de 0,011, portanto, estatisticamente significante. Os valores estatisticamente significantes estão destacados em negrito.

Nas Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 encontram-se os valores das porcentagens de células viáveis da linhagem SCC9 após a utilização do Iscador Qu Spezial e nas Tabelas 5.4, 5.5 e 5.6 esses mesmos valores referentes à linhagem SCC25. Esses

resultados, com ajuste de curva sigmoidal, estão representados nos gráficos 5.1, 5.2 e 5.3 para a linhagem SCC9 e 5.4, 5.5 e 5.6 para a linhagem SCC25.

Tabela 5.1 - Resultados em porcentagem, obtidos com as quantidades de células viáveis (SCC9) após 24 horas de incubação com o fármaco Iscador Qu, nas respectivas concentrações utilizadas

Linhagem celular	Concentração mg/mL	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p) em relação ao Controle
SCC9 24h	Controle	10	100,00	14,55	83,35	133,09	90,72	96,60	107,30	
	Branco	3	93,41	4,49	90,26	98,55	90,84	91,41	94,98	0,499
	0,13	3	102,85	5,20	97,40	107,76	100,39	103,38	105,57	0,446
	0,14	3	99,39	6,69	92,56	105,92	96,13	99,70	102,81	0,866
	0,15	3	101,85	4,96	96,25	105,69	99,94	103,62	104,66	0,554
	0,16	3	103,16	2,57	100,39	105,46	102,01	103,62	104,54	0,446
	0,17	3	103,00	9,30	92,33	109,37	99,82	107,30	108,34	0,554
	0,20	3	102,77	0,94	102,23	103,85	102,23	102,23	103,04	0,498
	0,21	3	98,40	4,94	95,10	104,08	95,56	96,02	100,05	0,866
	0,25	3	96,40	1,04	95,33	97,40	95,91	96,48	96,94	0,933
	0,27	3	87,04	0,83	86,12	87,73	86,70	87,27	87,50	0,128
	0,29	3	84,12	7,01	76,21	89,57	81,40	86,58	88,08	0,063
	0,30	3	86,58	3,17	83,12	89,34	85,20	87,27	88,31	0,063
	0,33	3	76,83	4,02	73,45	81,28	74,60	75,75	78,52	0,011
	0,50	3	74,22	0,13	74,14	74,37	74,14	74,14	74,26	0,011

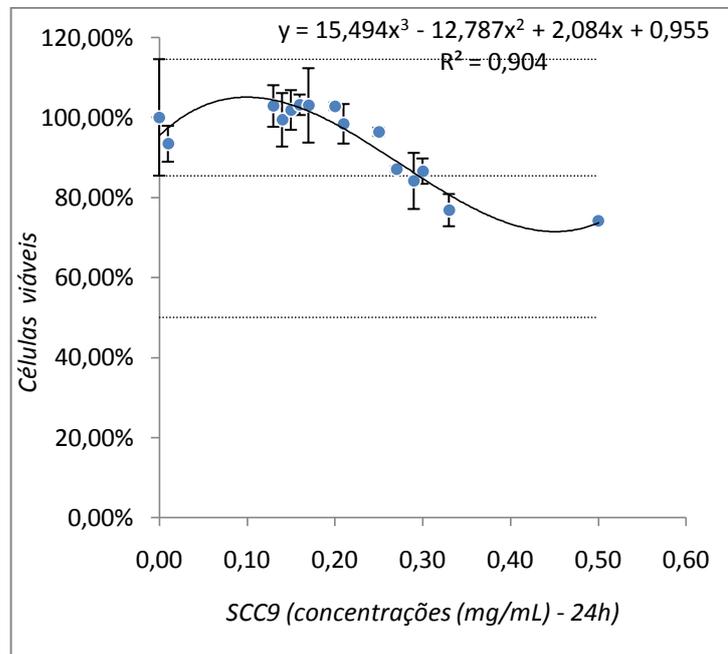


Gráfico 5.1 – Representação gráfica das porcentagens das células viáveis (Tabela 5.1), com ajuste de curva sigmoidal

Tabela 5.2 – Resultados em porcentagem, obtidos com as quantidades de células viáveis (SCC9) após 48 horas de incubação com o fármaco Iscador Qu, nas respectivas concentrações utilizadas

Linhagem celular	Concentração mg/mL	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p) em relação ao Controle
	Controle	10	100,00	13,72	82,24	122,04	86,11	99,20	107,33	
	Branco	3	78,78	3,81	74,49	81,77	77,28	80,07	80,92	0,011
	0,13	3	92,77	18,66	72,17	108,56	84,87	97,57	103,07	0,612
	0,14	3	80,07	5,48	73,87	84,25	77,98	82,08	83,17	0,018
	0,15	3	87,92	11,62	76,20	99,43	82,16	88,12	93,78	0,237
	0,16	3	82,70	9,99	71,71	91,22	78,45	85,18	88,20	0,063
	0,17	3	84,10	14,95	69,23	99,12	76,59	83,94	91,53	0,128
SCC9 48h	0,20	3	76,71	12,72	68,61	91,37	69,39	70,16	80,77	0,043
	0,21	3	75,78	9,03	65,36	81,15	73,10	80,84	81,00	0,011
	0,25	3	73,87	9,18	67,52	84,40	68,61	69,69	77,05	0,018
	0,27	3	77,33	1,83	76,20	79,45	76,28	76,35	77,90	0,011
	0,29	3	56,16	6,18	49,09	60,55	53,97	58,85	59,70	0,011
	0,30	3	59,16	2,56	56,22	60,86	58,31	60,40	60,63	0,011
	0,33	3	55,39	1,84	53,28	56,68	54,75	56,22	56,45	0,011
	0,50	3	53,74	1,78	52,04	55,60	52,82	53,59	54,60	0,011

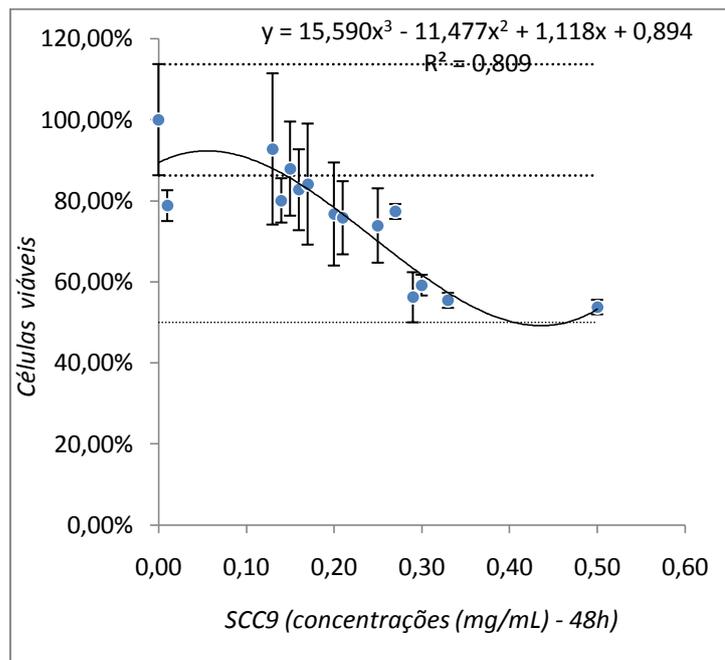


Gráfico 5.2 – Representação gráfica das porcentagens das células viáveis (Tabela 5.2), com ajuste de curva sigmoidal

Tabela 5.3 – Resultados em porcentagem, obtidos com as quantidades de células viáveis (SCC9) após 72 horas de incubação com o fármaco Iscador Qu, nas respectivas concentrações utilizadas

Linhagem celular	Concentração mg/mL	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p) em relação ao Controle
	Controle	10	100,00	7,34	90,72	111,49	94,26	99,19	104,12	
	Branco	3	99,56	4,29	94,70	102,80	97,94	101,18	101,99	0,866
	0,13	3	87,43	2,87	85,42	90,72	85,79	86,16	88,44	0,014
	0,14	3	83,26	6,43	76,58	89,40	80,19	83,80	86,60	0,011
	0,15	3	90,92	10,03	79,38	97,50	87,63	95,88	96,69	0,237
	0,16	3	74,32	4,81	69,81	79,38	71,80	73,78	76,58	0,011
	0,17	3	93,86	7,44	88,51	102,36	89,62	90,72	96,54	0,204
SCC9 72h	0,20	3	81,69	10,03	73,64	92,93	76,07	78,50	85,72	0,028
	0,21	3	86,65	6,34	80,41	93,08	83,43	86,45	89,77	0,028
	0,25	3	65,68	0,89	64,80	66,57	65,24	65,68	66,13	0,011
	0,27	3	56,85	7,91	50,07	65,54	52,50	54,93	60,24	0,011
	0,29	3	44,23	1,14	43,30	45,51	43,60	43,89	44,70	0,011
	0,30	3	44,62	3,09	41,09	46,83	43,52	45,95	46,39	0,011
	0,33	3	38,19	1,14	37,26	39,47	37,56	37,85	38,66	0,011
	0,50	3	47,72	2,37	45,80	50,37	46,39	46,98	48,68	0,011

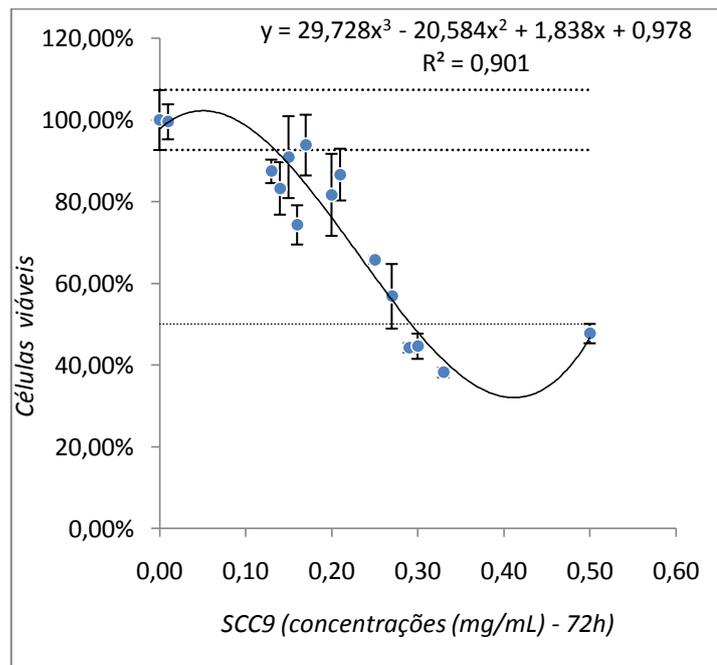


Gráfico 5.3 – Representação gráfica das porcentagens das células viáveis (Tabela 5.3), com ajuste de curva sigmoidal

Tabela 5.4 – Resultados em porcentagem, obtidos com as quantidades de células viáveis (SCC25) após 24 horas de incubação com o fármaco Iscador Qu, nas respectivas concentrações utilizadas

Linhagem celular	Concentração mg/mL	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p) em relação ao Controle
SCC25 24h	Controle	10	100,00	5,71	93,17	113,66	97,78	98,55	102,99	
	Branco	3	97,67	3,91	93,34	100,94	96,03	98,72	99,83	0,866
	0,13	3	91,74	3,84	87,36	94,53	90,35	93,34	93,94	0,028
	0,14	3	93,14	9,76	85,65	104,18	87,62	89,58	96,88	0,310
	0,15	3	92,03	0,47	91,72	92,57	91,76	91,80	92,19	0,011
	0,16	3	88,73	1,99	86,51	90,35	87,92	89,33	89,84	0,011
	0,17	3	94,48	2,83	91,80	97,44	93,00	94,19	95,82	0,043
	0,20	3	91,66	2,25	89,07	93,17	90,91	92,74	92,96	0,014
	0,21	3	95,07	9,81	87,79	106,23	89,50	91,20	98,72	0,310
	0,25	3	88,13	3,33	85,57	91,89	86,25	86,93	89,41	0,011
	0,27	3	85,88	11,12	75,75	97,78	79,94	84,12	90,95	0,034
	0,29	3	83,35	6,37	76,00	87,36	81,34	86,68	87,02	0,011
	0,30	3	84,12	3,55	80,70	87,79	82,28	83,86	85,83	0,011
	0,33	3	78,37	10,22	69,09	89,33	72,89	76,69	83,01	0,011
	0,50	3	76,97	6,37	71,65	84,03	73,44	75,23	79,63	0,011

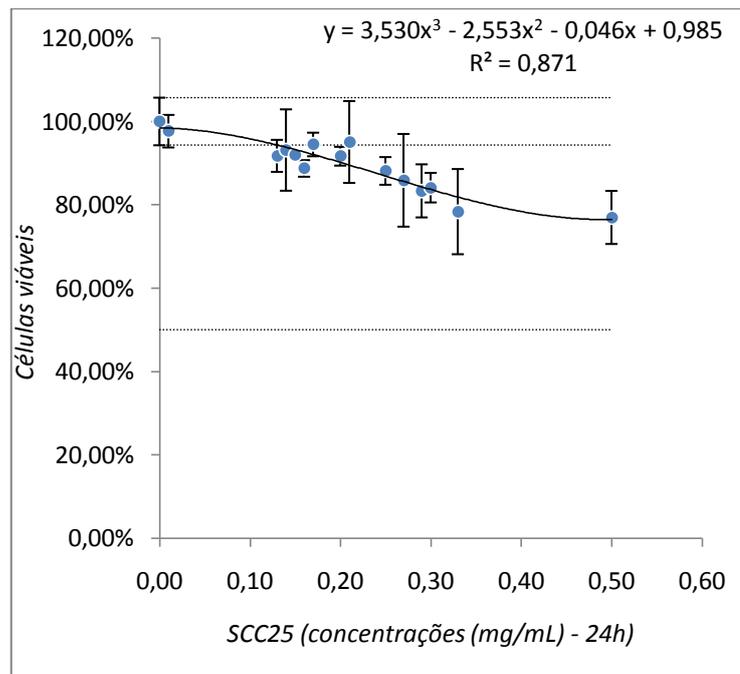


Gráfico 5.4 – Representação gráfica das porcentagens das células viáveis (Tabela 5.4), com ajuste de curva sigmoidal

Tabela 5.5 – Resultados em porcentagem, obtidos com as quantidades de células viáveis (SCC25) após 48 horas de incubação com o fármaco Iscador Qu, nas respectivas concentrações utilizadas

Linhagem celular	Concentração mg/mL	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p) em relação ao Controle
	Controle	10	100,00	9,79	84,27	113,25	93,55	101,31	108,61	
SCC25 48h	Branco	3	86,58	20,24	63,66	101,99	78,87	94,08	98,04	0,237
	0,13	3	77,43	1,30	75,98	78,49	76,90	77,81	78,15	0,011
	0,14	3	76,13	10,81	65,64	87,24	70,58	75,52	81,38	0,028
	0,15	3	85,79	7,50	77,88	92,79	82,30	86,71	89,75	0,063
	0,16	3	64,42	5,16	58,56	68,30	62,48	66,40	67,35	0,011
	0,17	3	75,68	3,69	71,95	79,33	73,85	75,75	77,54	0,011
	0,20	3	65,84	6,83	57,96	69,97	63,78	69,59	69,78	0,011
	0,21	3	75,07	1,02	73,93	75,91	74,65	75,37	75,64	0,011
	0,25	3	57,95	3,20	54,38	60,54	56,66	58,94	59,74	0,011
	0,27	3	45,58	5,35	39,55	49,74	43,51	47,46	48,60	0,011
	0,29	3	49,06	4,53	43,89	52,33	47,43	50,96	51,65	0,011
	0,30	3	44,72	1,15	43,66	45,94	44,12	44,57	45,26	0,011
	0,33	3	44,52	7,12	36,36	49,44	42,06	47,76	48,60	0,011
	0,50	3	26,92	2,18	24,41	28,29	26,24	28,07	28,18	0,011

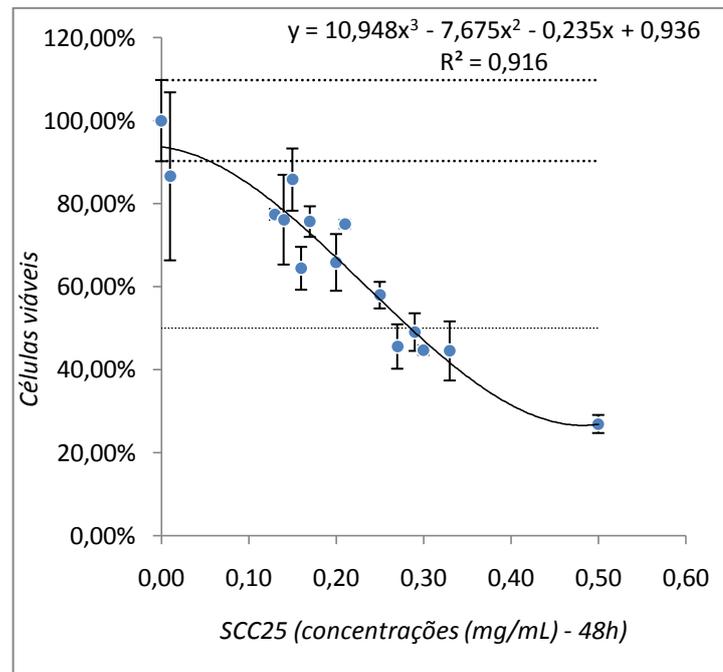


Gráfico 5.5 – Representação gráfica das porcentagens das células viáveis (Tabela 5.5), com ajuste de curva sigmoidal

Tabela 5.6 – Resultados em porcentagem, obtidos com as quantidades de células viáveis (SCC25) após 72 horas de incubação com o fármaco Iscador Qu, nas respectivas concentrações utilizadas

Linhagem celular	Concentração mg/mL	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p) em relação ao Controle
SCC25 72h	Controle	10	100,00	10,76	76,50	109,75	98,47	103,24	107,74	
	Branco	3	98,02	5,97	91,62	103,44	95,32	99,01	101,23	0,398
	0,13	3	55,19	23,13	28,55	70,19	47,69	66,83	68,51	0,011
	0,14	3	71,04	12,54	59,91	84,63	64,25	68,58	76,61	0,018
	0,15	3	58,43	12,36	49,50	72,54	51,38	53,26	62,90	0,011
	0,16	3	60,03	9,02	51,99	69,79	55,15	58,30	64,05	0,011
	0,17	3	65,87	8,02	56,62	70,80	63,41	70,19	70,50	0,011
	0,20	3	50,80	9,29	44,00	61,39	45,51	47,02	54,21	0,011
	0,21	3	70,80	16,53	60,52	89,87	61,26	62,00	75,94	0,028
	0,25	3	36,41	12,42	22,84	47,22	31,00	39,16	43,19	0,011
	0,27	3	28,10	1,49	27,20	29,82	27,24	27,27	28,55	0,011
	0,29	3	33,56	7,22	27,14	41,38	29,66	32,17	36,78	0,011
	0,30	3	26,24	1,22	24,85	27,14	25,79	26,73	26,94	0,011
	0,33	3	24,83	0,74	24,05	25,52	24,49	24,92	25,22	0,011
	0,50	3	17,71	1,92	15,52	19,08	17,03	18,54	18,81	0,011

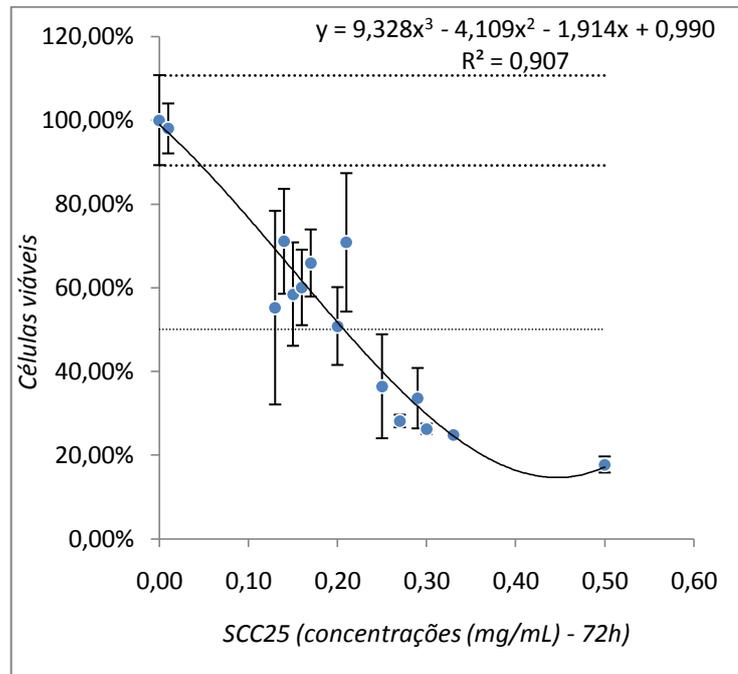


Gráfico 5.6 – Representação gráfica das porcentagens das células viáveis (Tabela 5.6), com ajuste de curva sigmoidal

A determinação da IC_{50} nos possibilitou sua utilização para ambas as linhagens celulares, em todos os experimentos realizados. As células pertencentes à linhagem SCC9 se mostraram mais resistentes, quando comparadas às células pertencentes à linhagem SCC25.

Frente aos resultados, a concentração estabelecida para os três tipos de Iscador (Qu, M e P) foi de 0,3 mg/mL de meio de cultivo. A quantidade de fármaco utilizada das ampolas de Iscador P, foi a metade da quantidade utilizada das ampolas do Iscador Qu e M, devido a concentração do extrato por ampola, neste fármaco, ser o dobro (Tabela 4.1).

O teste de viabilidade celular foi realizado utilizando somente o Iscador Qu, por essa ser a formulação que contém as maiores quantidades de lectinas e viscotoxinas (Tabela 4.1). Sendo todos os experimentos comparativos, a mesma concentração foi utilizada para todos os fármacos.

5.2 ANÁLISES DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS PELO MÉTODO TUNEL

As células das linhagens SCC9 e SCC25, após o término da reação com o kit: DeadEnd Fluoremetric Tunel System (Promega) (4.2.4) foram visualizadas em microscópio de fluorescência e as respectivas imagens capturadas. A ação dos três fármacos (Iscador Qu, Iscador P e Iscador M), Controle e Branco foi avaliada após 24 e 48 horas respectivamente. As imagens resultantes deste experimento estão mostradas na Figura 5.1 para as células da linhagem SCC9 e na Figura 5.2 para as células da linhagem SCC25.

As células apoptóticas estão identificadas pela coloração verde fluorescente, como resultado da incorporação catalítica do reagente da fluoresceína-12-dUTP à extremidade 3'-OH do DNA fragmentado no interior do núcleo da célula, em decorrência do efeito provocado pelos respectivos fármacos. Ao mesmo tempo é possível a visualização dos núcleos das células viáveis, por meio da utilização do DAPI, reagente contido no meio de montagem.

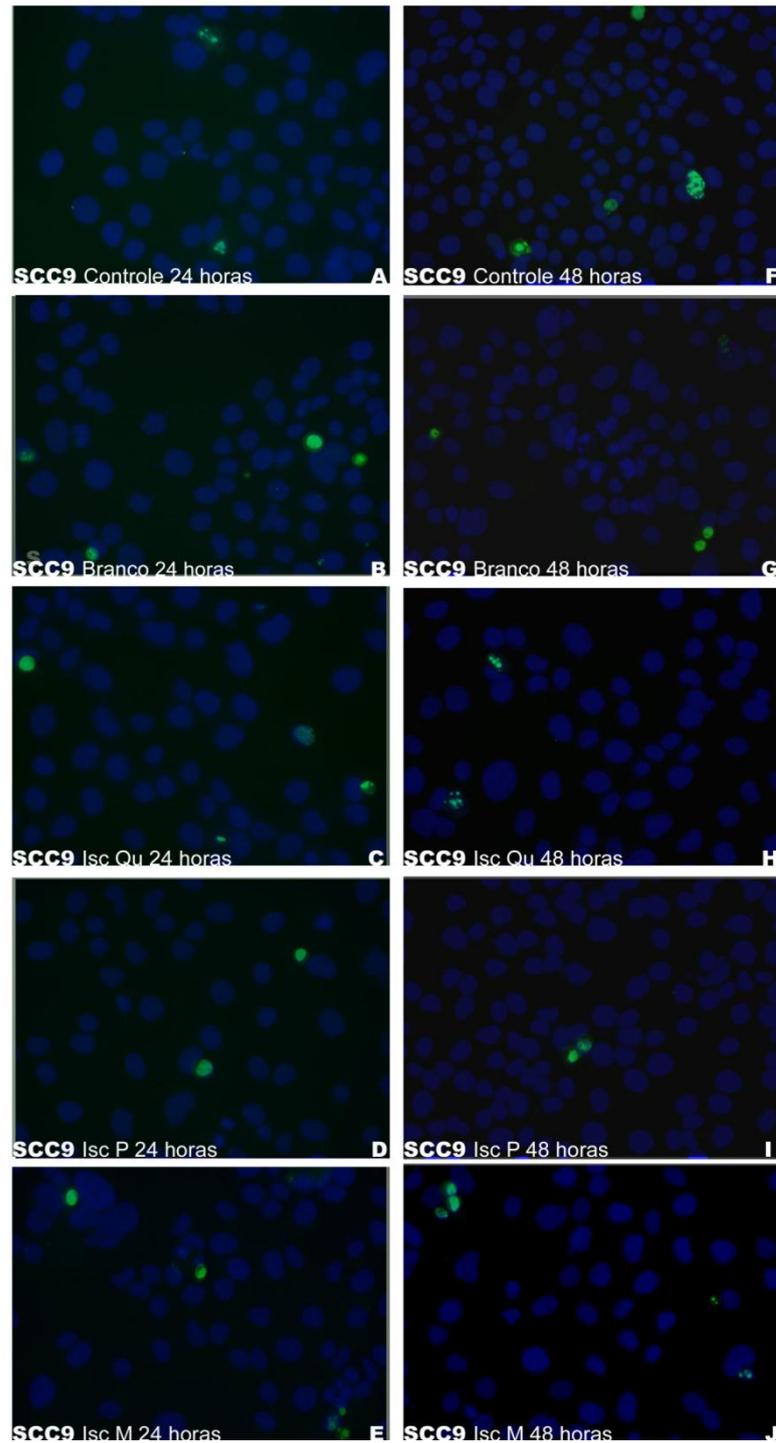


Figura 5.1 - Fotomicrografias das células da linhagem SCC9, após detecção de apoptose pelo método TUNEL. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x400)

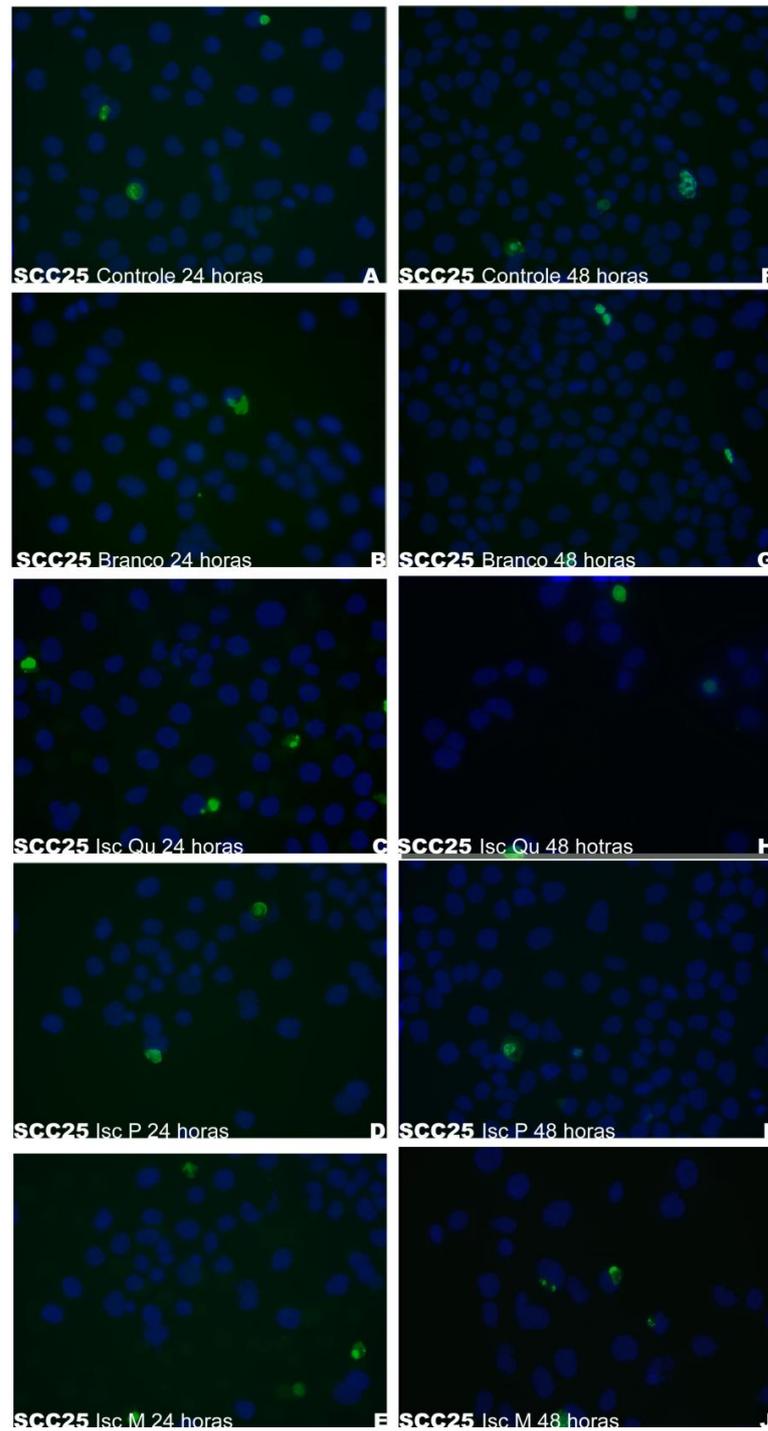


Figura 5.2 - Fotomicrografias das células da linhagem SCC25, após detecção de apoptose pelo método TUNEL. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x400)

Após as primeiras 24 horas de incubação, ao analisarmos os campos contendo as células de ambas as linhagens, visualmente não se detecta diferenças entre os mesmos (Figura 5.1 A, B, C, D e E e Figura 5.2 A, B, C, D e E). Porém, após 48 horas de incubação, é possível observar algumas diferenças nos campos contendo os fármacos Iscador Qu e Iscador M, (Figura 5.1 H e J e Figura 5.2 H e J). A quantidade de células totais, visualizadas pelos núcleos corados com DAPI, nesses campos é menor, principalmente no campo contendo as células da linhagem SCC25 (Figura 5.2 H e J). Esse efeito é ainda mais acentuado na presença do Iscador Qu (Figura 5.2 H). A quantidade de células apoptóticas em todos os campos é bastante semelhante, entretanto, quando avaliamos e comparamos a relação entre a quantidade total de células e a quantidade de células apoptóticas, esses resultados ganham outra dimensão. Ao observarmos os campos contendo o fármaco Iscador P (Figura 5.1 I e 5.2 I) e compararmos com o Controle e Branco (Figura 5.1 F e G e 5.2 F e G), notamos um aumento no volume dos núcleos. Os testes utilizando a metodologia do Tunel nos forneceram resultados qualitativos, confirmando a presença de células apoptóticas e ainda foi capaz de comprovar o efeito tempo dependente dos fármacos analisados.

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE APOPTOSE POR ANEXINA V FITC E IODETO DE PROPÍDEO

As análises realizadas com os reagentes Anexina e Iodeto de Própídeo tiveram por objetivo verificar quantitativamente as células que estavam viáveis, apoptóticas, em estágio avançado de apoptose (apoptose tardia) e em necrose, após o tempo de incubação de 24 e 48 horas com os fármacos Iscador Qu, P e M, comparando com os mesmos valores obtidos com as células dos nossos Controle e Branco (4.2.5).

A anexina se liga à fosfatidilserina, que é um componente interno da membrana plasmática, o qual se externaliza imediatamente após o evento apoptótico, como uma primeira forma de sinalização de morte celular programada. Na célula em necrose no momento que a membrana plasmática se torna permeável, o iodeto de propídeo, penetra na célula indo se ligar ao DNA fragmentado. Após as

análises desses resultados, obtivemos os valores, em porcentagem, apresentados nas Tabelas 5.7 a 5.16, e representados nos Gráficos 5.7 a 5.12.

Foi feita a comparação entre os dois tempos (24 e 48 horas) de incubação com os: Controle, Branco, Iscador Qu, P e M. Para isso foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, com o objetivo de verificar possíveis diferenças entre esses dois momentos analisados. Para a aplicação dos testes estatísticos, foi adotado o nível de significância de 5% (0,05) (4.2.5).

Nas tabelas de números 5.7 a 5.11 estão apresentados os resultados obtidos com as células da linhagem SCC9, após 24 e 48 horas de incubação com o Controle, Branco Iscador Qu, P e M. Os valores com significância estatística estão salientados em negrito.

Tabela 5.7 – Valores em porcentagens obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e posterior análise feita em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC9, após 24 e 48 horas de incubação com o Controle

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	91,53	2,24	89,10	93,50	90,55	92,00	92,75	0,049
	48H	3	77,57	2,35	75,70	80,20	76,25	76,80	78,50	
Células Apoptóticas	24H	3	3,90	1,90	1,80	5,50	3,10	4,40	4,95	0,049
	48H	3	13,93	1,16	12,70	15,00	13,40	14,10	14,55	
Cels Apop, Tardia	24H	3	2,63	0,38	2,20	2,90	2,50	2,80	2,85	0,049
	48H	3	7,27	1,27	6,30	8,70	6,55	6,80	7,75	
Necrose	24H	3	1,93	0,55	1,40	2,50	1,65	1,90	2,20	0,275
	48H	3	1,30	0,44	0,80	1,60	1,15	1,50	1,55	

Tabela 5.8 – Valores em porcentagem obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e posterior análise feita em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC9 após 24 e 48 horas de incubação com o Branco

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	92,30	0,30	92,00	92,60	92,15	92,30	92,45	0,049
	48H	3	78,27	2,41	75,50	79,90	77,45	79,40	79,65	
Células Apoptóticas	24H	3	2,83	0,06	2,80	2,90	2,80	2,80	2,85	0,046
	48H	3	11,47	1,76	10,40	13,50	10,45	10,50	12,00	
Cels Apop, Tardia	24H	3	2,93	0,51	2,50	3,50	2,65	2,80	3,15	0,049
	48H	3	9,60	0,46	9,10	10,00	9,40	9,70	9,85	
Necrose	24H	3	1,93	0,21	1,70	2,10	1,85	2,00	2,05	0,049
	48H	3	0,63	0,32	0,40	1,00	0,45	0,50	0,75	

Tabela 5.9 – Valores em porcentagem obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e posterior análise feita em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC9 após 24 e 48 horas de incubação com o Iscador Qu

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	81,90	1,10	80,80	83,00	81,35	81,90	82,45	0,049
	48H	3	57,27	1,00	56,50	58,40	56,70	56,90	57,65	
Células Apoptóticas	24H	3	12,77	0,71	12,00	13,40	12,45	12,90	13,15	0,049
	48H	3	20,50	1,15	19,60	21,80	19,85	20,10	20,95	
Cels Apop, Tardia	24H	3	3,50	0,61	3,10	4,20	3,15	3,20	3,70	0,049
	48H	3	20,97	0,90	20,40	22,00	20,45	20,50	21,25	
Necrose	24H	3	1,83	0,80	1,00	2,60	1,45	1,90	2,25	0,275
	48H	3	1,27	0,42	0,80	1,60	1,10	1,40	1,50	

Tabela 5.10 – Valores em porcentagem obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e posterior análise feita em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC9 após 24 e 48 horas de incubação com o Iscador P

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	90,53	0,81	89,60	91,10	90,25	90,90	91,00	0,049
	48H	3	80,30	0,89	79,30	81,00	79,95	80,60	80,80	
Células Apoptóticas	24H	3	4,80	0,20	4,60	5,00	4,70	4,80	4,90	0,049
	48H	3	9,30	3,08	7,00	12,80	7,55	8,10	10,45	
Cels Apop, Tardia	24H	3	2,70	0,17	2,60	2,90	2,60	2,60	2,75	0,046
	48H	3	8,07	3,42	4,20	10,70	6,75	9,30	10,00	
Necrose	24H	3	1,97	0,90	1,40	3,00	1,45	1,50	2,25	0,275
	48H	3	2,53	0,68	2,00	3,30	2,15	2,30	2,80	

Tabela 5.11 – Valores em porcentagem obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e posterior análise feita em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC9 após 24 e 48 horas de incubação com o Iscador M

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	87,77	2,21	85,70	90,10	86,60	87,50	88,80	0,049
	48H	3	60,27	7,18	54,80	68,40	56,20	57,60	63,00	
Células Apoptóticas	24H	3	8,20	0,53	7,60	8,60	8,00	8,40	8,50	0,049
	48H	3	17,63	5,67	11,40	22,50	15,20	19,00	20,75	
Cels Apop, Tardia	24H	3	2,63	1,29	1,20	3,70	2,10	3,00	3,35	0,049
	48H	3	19,13	4,04	16,70	23,80	16,80	16,90	20,35	
Necrose	24H	3	1,40	0,52	1,10	2,00	1,10	1,10	1,55	0,046
	48H	3	2,97	0,49	2,40	3,30	2,80	3,20	3,25	

Os conteúdos das Tabelas 5.7 a 5.11 estão representados graficamente. O Gráfico 5.10 corresponde aos resultados obtidos com as células da linhagem SCC9 após 24 horas de incubação com os controles e os fármacos, e o Gráfico 5.11 representa a mesma linhagem, nas mesmas condições, após 48 horas de incubação. A representação é referente à porcentagem da quantidade das células viáveis, apoptóticas, em apoptose tardia e necrose.

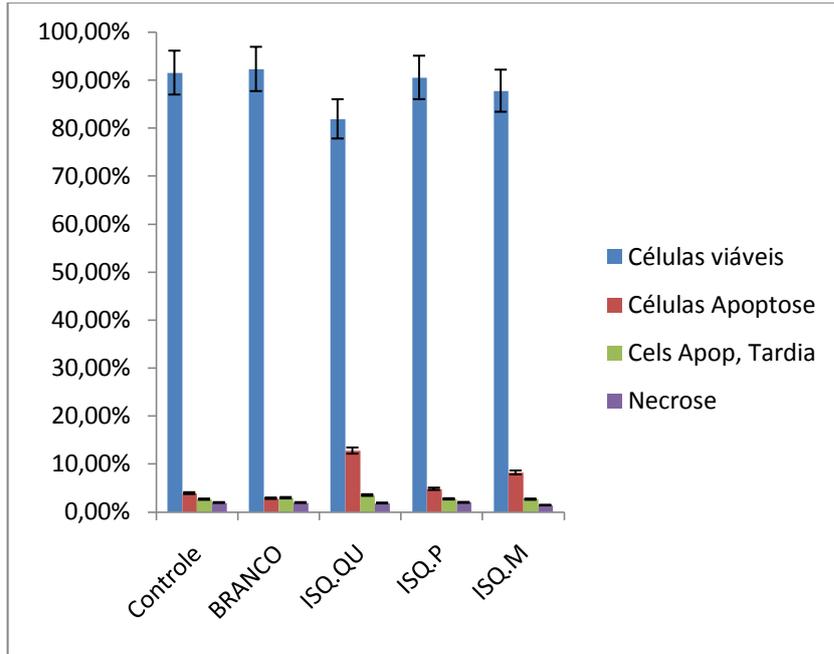


Gráfico 5.10 - Representação gráfica da porcentagem de células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia e necrose, da linhagem SCC9, após 24 horas de incubação com os controles e os fármacos analisados

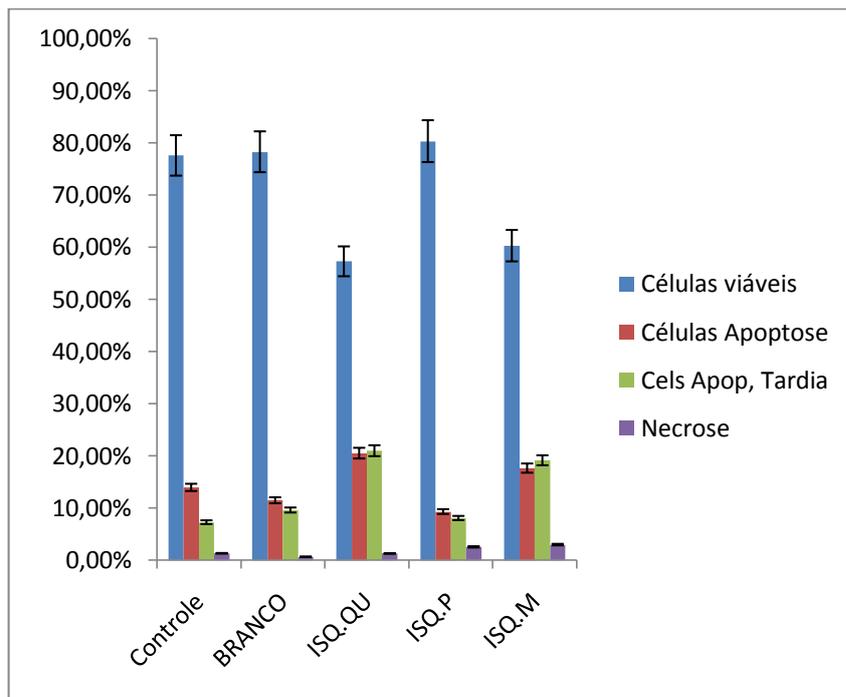


Gráfico 5.11 - Representação gráfica da porcentagem das células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia e necrose, da linhagem SCC9, após 48 horas de incubação com os controles e os fármacos analisados

Nas tabelas de números 5.12 a 5.16 estão apresentados os resultados obtidos com as células da linhagem SCC25, após 24 e 48 horas de incubação com o Controle, Branco, Iscador Qu, P e M. Os valores com significância estatística estão salientados em negrito.

Tabela 5.12 – Resultados obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e análises feitas em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC 25 após 24 e 48 horas de incubação com o Controle

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	93,80	1,82	92,70	95,90	92,75	92,80	94,35	0,658
	48H	3	93,00	1,11	92,00	94,20	92,40	92,80	93,50	
Células Apoptóticas	24H	3	1,83	0,76	1,30	2,70	1,40	1,50	2,10	0,049
	48H	3	3,73	0,65	3,10	4,40	3,40	3,70	4,05	
Cels Apop, Tardia	24H	3	2,03	0,64	1,30	2,50	1,80	2,30	2,40	0,827
	48H	3	2,00	0,82	1,10	2,70	1,65	2,20	2,45	
Necrose	24H	3	2,33	1,95	0,10	3,70	1,65	3,20	3,45	0,513
	48H	3	1,30	0,95	0,30	2,20	0,85	1,40	1,80	

Tabela 5.13 – Resultados obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e análises feitas em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC 25 após 24 e 48 horas de incubação com o Branco

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	95,27	1,31	93,80	96,30	94,75	95,70	96,00	0,127
	48H	3	93,40	1,35	92,30	94,90	92,65	93,00	93,95	
Células Apoptóticas	24H	3	2,07	0,70	1,40	2,80	1,70	2,00	2,40	0,077
	48H	3	3,07	0,38	2,80	3,50	2,85	2,90	3,20	
Cels Apop, Tardia	24H	3	1,57	0,21	1,40	1,80	1,45	1,50	1,65	0,513
	48H	3	2,17	0,85	1,20	2,80	1,85	2,50	2,65	
Necrose	24H	3	1,07	1,16	0,00	2,30	0,45	0,90	1,60	0,827
	48H	3	1,37	0,85	0,40	2,00	1,05	1,70	1,85	

Tabela 5.14 – Resultados obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e análises feitas em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC25 após 24 e 48 horas de incubação com o Iscador Qu

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	86,10	1,37	84,60	87,30	85,50	86,40	86,85	0,049
	48H	3	48,47	0,59	47,80	48,90	48,25	48,70	48,80	
Células Apoptóticas	24H	3	7,27	0,55	6,70	7,80	7,00	7,30	7,55	0,049
	48H	3	39,00	1,35	37,70	40,40	38,30	38,90	39,65	
Cels Apop, Tardia	24H	3	5,87	1,50	5,00	7,60	5,00	5,00	6,30	0,046
	48H	3	11,37	1,01	10,20	12,00	11,05	11,90	11,95	
Necrose	24H	3	0,80	0,20	0,60	1,00	0,70	0,80	0,90	0,513
	48H	3	1,17	0,59	0,50	1,60	0,95	1,40	1,50	

Tabela 5.15 – Resultados obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e análises feitas em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC25 após 24 e 48 horas de incubação com o Iscador P

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	93,30	0,20	93,10	93,50	93,20	93,30	93,40	0,049
	48H	3	89,40	2,44	86,60	91,10	88,55	90,50	90,80	
Células Apoptóticas	24H	3	2,67	2,11	1,40	5,10	1,45	1,50	3,30	0,127
	48H	3	5,00	1,65	3,10	6,10	4,45	5,80	5,95	
Cels Apop, Tardia	24H	3	2,50	1,01	1,60	3,60	1,95	2,30	2,95	0,127
	48H	3	4,30	1,28	3,20	5,70	3,60	4,00	4,85	
Necrose	24H	3	1,53	1,32	0,10	2,70	0,95	1,80	2,25	0,817
	48H	3	1,27	0,92	0,20	1,80	1,00	1,80	1,80	

Tabela 5.16 – Resultados obtidos após incubação com Anexina/Iodeto de Propídeo e análises feitas em citômetro de fluxo, das células da linhagem SCC25 após 24 e 48 horas de incubação com o Iscador M

	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
Células viáveis	24H	3	88,70	2,40	86,30	91,10	87,50	88,70	89,90	0,049
	48H	3	43,80	6,30	37,50	50,10	40,65	43,80	46,95	
Células Apoptóticas	24H	3	5,00	1,35	3,50	6,10	4,45	5,40	5,75	0,049
	48H	3	31,30	8,35	25,10	40,80	26,55	28,00	34,40	
Cels Apop, Tardia	24H	3	5,20	0,78	4,70	6,10	4,75	4,80	5,45	0,049
	48H	3	23,10	9,13	14,40	32,60	18,35	22,30	27,45	
Necrose	24H	3	1,10	0,46	0,60	1,50	0,90	1,20	1,35	0,275
	48H	3	1,80	0,75	1,00	2,50	1,45	1,90	2,20	

Os conteúdos das Tabelas 5.12 a 5.16 estão representados graficamente. O Gráfico 5.12 corresponde aos resultados obtidos com as células da linhagem SCC25 após de 24 horas de incubação com os controles e os fármacos, e o Gráfico 5.13 representa a mesma linhagem, nas mesmas condições, após 48 horas de incubação. A representação é referente à porcentagem da quantidade de células viáveis, apoptóticas, em apoptose tardia e necrose.

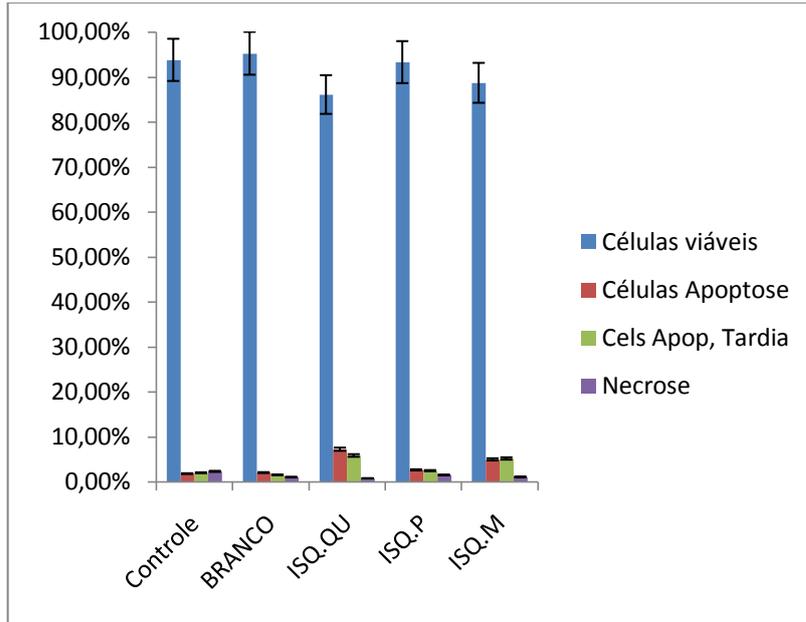


Gráfico 5.12 - Representação gráfica da porcentagem das células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia e necrose, da linhagem SCC25, após 24 horas de incubação com os controles e os fármacos analisados

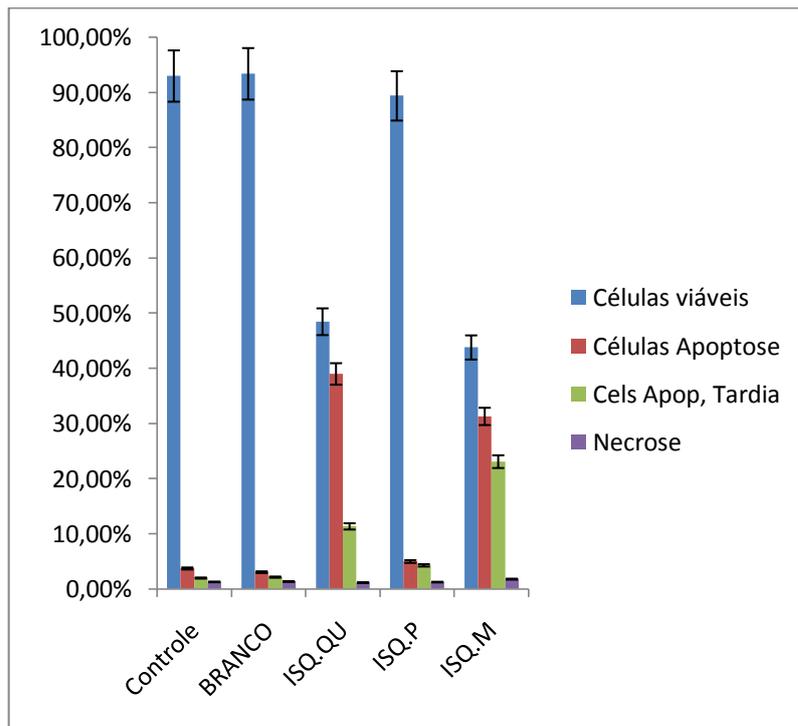


Gráfico 5.13 - Representação gráfica da porcentagem das células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia e necrose, da linhagem SCC25, após 48 horas de incubação com os controles e os fármacos analisados

5.4 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DOS GENES AKT1, AKT2, AKT3, PTEN E CICLINA D1

A expressão dos genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, foi avaliada por meio de qRT-PCR nas linhagens SCC9 e SCC25 tratadas com os fármacos Iscador Qu, Iscador P e Iscador M, além do Controle e Branco após 24 e 48 horas de incubação. Todas as amostras mostraram amplificação para o gene constitutivo GAPDH, utilizado como controle endógeno nas análises. Todas as amostras analisadas apresentaram apenas um pico específico de dissociação (pico único).

As amostras Controle de cada grupo experimental foram utilizadas como amostras calibradoras (controle normalizador) para todas as análises efetuadas.

As Tabelas 5.17 a 5.20 apresentam os valores (em Log₂) da expressão relativa para os genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1 nos dois tempos estudados. Esses resultados são também apresentados nos Gráficos 5.14 a 5.17. A expressão relativa foi calculada em função da expressão desses genes após incubação com o controle.

Tabela 5.17 - Expressão relativa para os genes: AKT1, AKT2, AKT3, PTEN E CICLINA D1 nas células da linhagem SCC9, após 24 horas de incubação com o Branco e os fármacos: Iscador Qu, P e M

SCC9 24 horas	Branco			Iscador Qu			Iscador P			Iscador M		
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	
AKT 1	-2,19	-2,85	0,47	-1,41	-1,63	0,15	-0,92	-1,18	0,18	1,02	0,39	0,45
AKT 2	-1,25	-2,55	0,92	-1,89	-1,18	0,50	-1,12	-1,78	0,47	-2,22	-1,53	0,49
AKT 3	-0,94	-4,48	2,50	-1,82	-1,89	0,05	-6,55	-2,71	2,71	-3,89	-8,12	2,99
PTEN	-0,98	-2,83	1,31	-0,43	-1,47	0,74	-5,05	-2,41	1,86	-3,15	-5,20	1,45
CICLINA D1	-1,37	-0,74	0,44	-1,80	-1,57	0,16	-3,70	-2,62	0,77	-0,71	-2,91	1,56

Tabela 5.18 - Expressão relativa para os genes: AKT1, AKT2, AKT3, PTEN E CICLINA D1, nas células da linhagem SCC9, após 48 horas de incubação com o Branco e os fármacos: Iscador Qu, P e M

SCC9 48 horas	Branco			Iscador Qu			Iscador P			Iscador M		
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	
AKT 1	0,94	1,17	0,16	-0,56	-1,20	0,45	-0,02	-0,20	0,12	2,49	1,77	0,51
AKT 2	0,73	2,37	1,16	-0,28	-0,07	0,15	-1,05	-0,95	0,07	1,75	1,14	0,42
AKT 3	0,27	-1,01	0,91	1,94	2,00	0,04	2,09	0,48	1,14	1,44	1,74	0,21
PTEN	-0,83	-0,24	0,41	0,98	0,68	0,21	0,44	-0,37	0,58	1,72	1,20	0,37
CICLINA D1	-0,52	-0,62	0,07	1,07	0,09	0,70	0,12	0,39	0,19	1,90	2,18	0,19

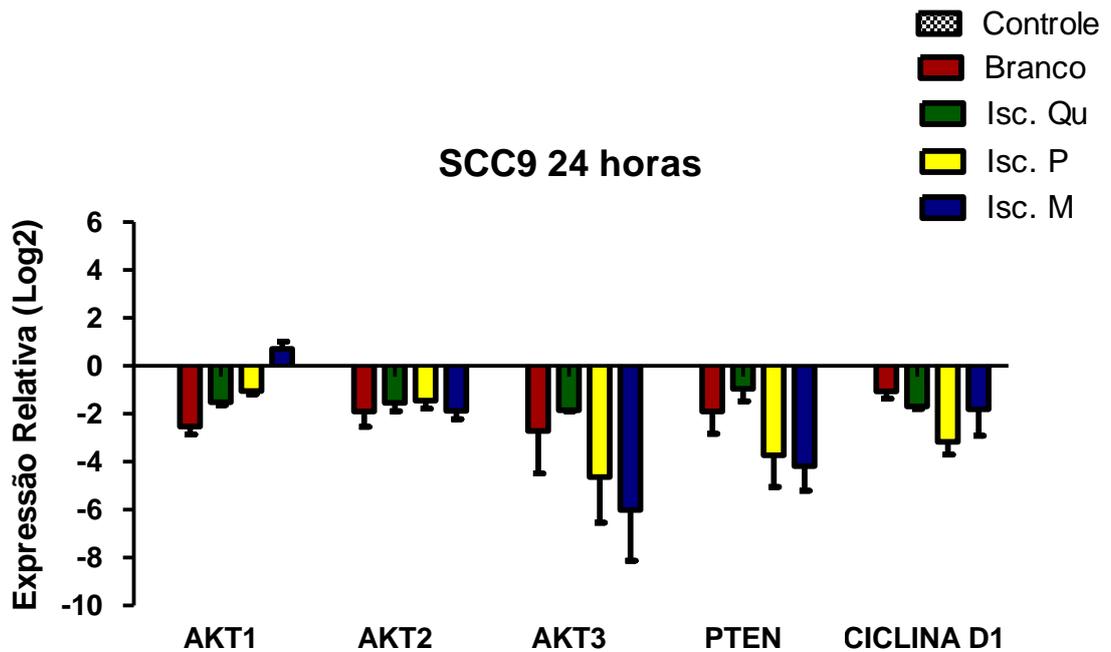


Gráfico 5.14 – Expressão relativa dos genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, em células da linhagem SCC9 após 24 horas de incubação com fármacos e controles

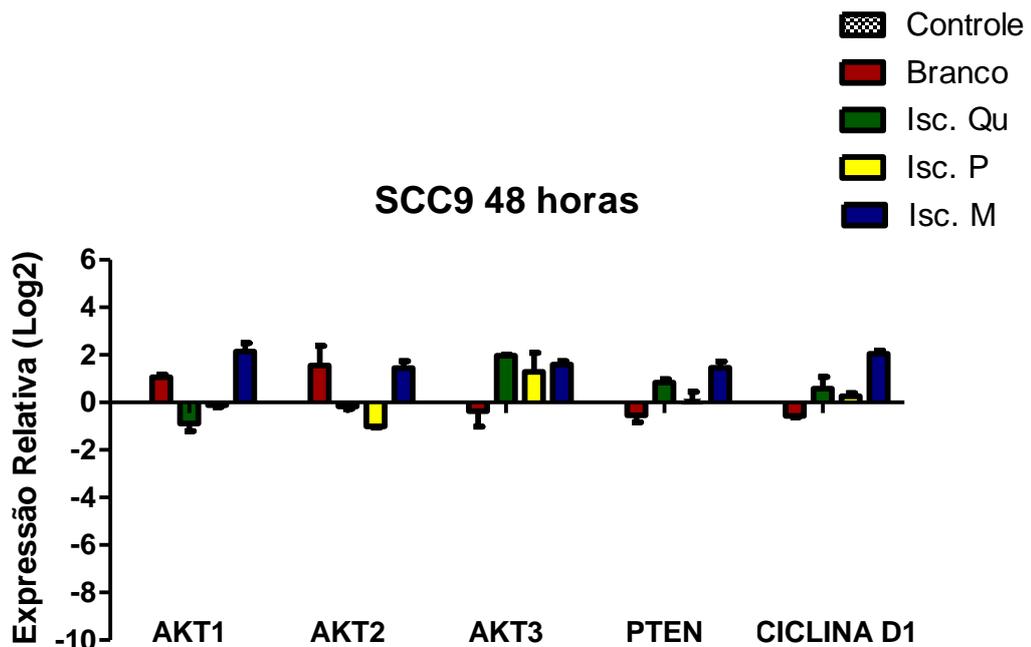


Gráfico 5.15 – Expressão relativa dos genes AKT1, AKT, AKT3, PTEN e CICLINA D1, em células da linhagem SCC9 após 48 horas de incubação com fármacos e controles

Tabela 5.19 - Expressão relativa para os genes: AKT1, AKT2, AKT3, PTEN E CICLINA D1, nas células da linhagem SCC25, após 24 horas de incubação com o Branco e os fármacos: Iscador Qu, P e M

SCC25 24 horas	Branco			Iscador Qu			Iscador P			Iscador M		
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	
AKT 1	0,49	0,42	0,05	1,19	1,30	0,08	0,16	0,98	0,58	1,69	2,40	0,51
AKT 2	1,76	0,68	0,76	0,57	2,42	0,31	0,57	0,65	0,05	2,78	2,19	0,42
AKT 3	2,45	2,50	0,04	0,30	2,83	1,79	-2,88	1,32	2,97	0,32	-1,63	1,38
PTEN	1,83	1,73	0,07	1,55	2,34	0,56	-1,92	1,51	2,42	0,93	-0,73	1,18
CICLINA D1	1,46	2,24	0,55	1,35	2,70	0,95	-0,98	1,52	1,77	2,39	1,02	0,97

Tabela 5.20 - Expressão relativa para os genes: AKT1, AKT2, AKT3, PTEN E CICLINA D1, nas células da linhagem SCC9, após 48 horas de incubação com o Branco e os fármacos: Iscador Qu, P e M

SCC25 48 horas	Branco			Iscador Qu			Iscador P			Iscador M		
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP	
AKT 1	0,50	-0,71	0,86	1,27	0,95	0,23	-2,57	-0,70	1,32	-2,25	-1,79	0,32
AKT 2	-1,62	-1,51	0,08	-0,31	0,03	0,24	-3,63	-1,50	1,51	-1,60	-3,30	1,21
AKT 3	-2,39	1,30	2,61	3,93	4,37	0,31	-2,30	1,29	2,54	0,53	0,66	0,09
PTEN	-1,64	0,59	1,58	2,92	0,31	1,85	-1,07	-0,57	0,35	-0,02	0,51	0,37
CICLINA D1	-0,29	0,08	0,26	1,14	0,08	0,75	-1,70	-1,03	0,47	0,52	0,20	0,22

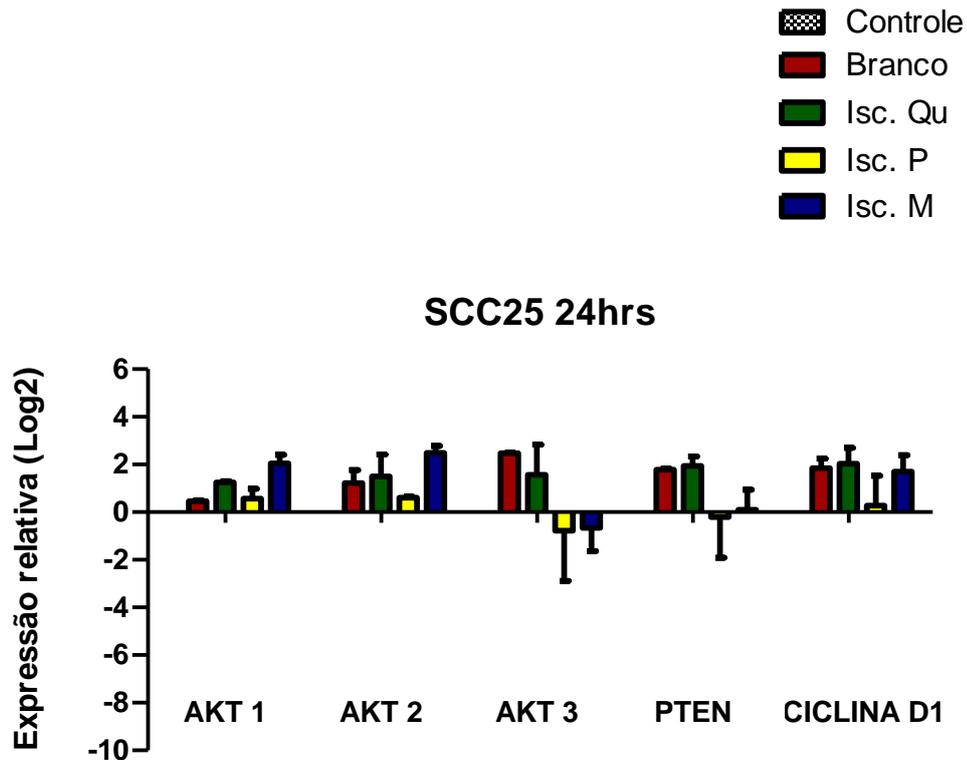


Gráfico 5.16 – Expressão relativa dos genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN E CICLINA D1 em células da linhagem SCC25 após 24 horas de incubação com fármacos e controles

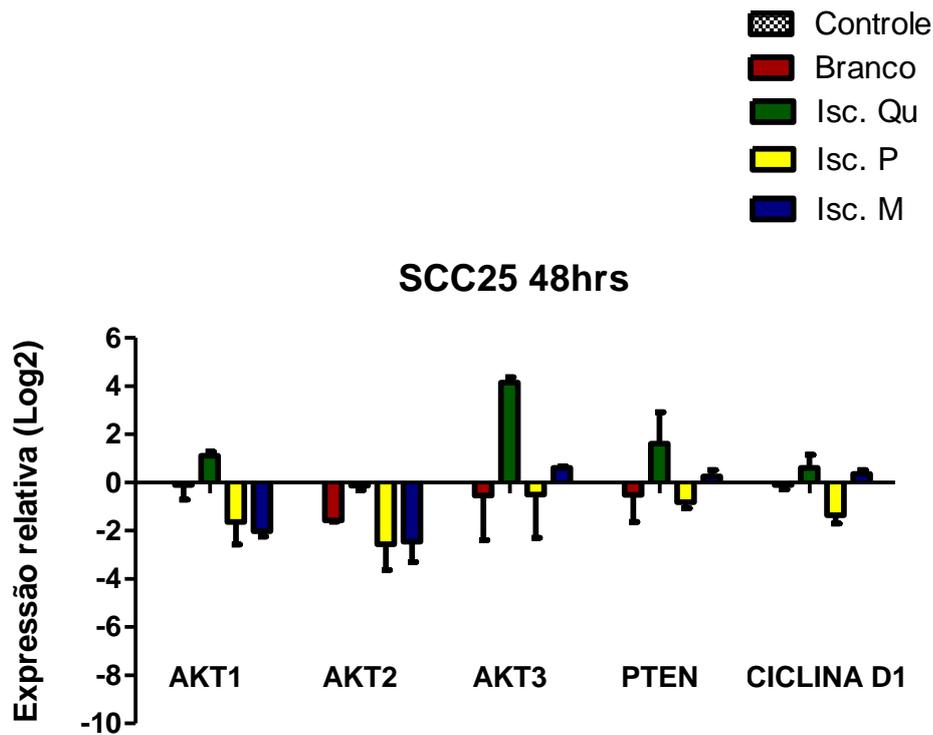


Gráfico 5.17 – Expressão relativa dos genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, em células da linhagem SCC25 após 48 horas de incubação com fármacos e controles

Para a análise de significância estatística dos dados acima, primeiramente aplicou-se a Análise de Variância Multivariada (APÊNDICE A) para a avaliação do efeito tempo, tipo de célula e fármacos sobre a expressão dos genes estudados. Foi encontrada interação estatisticamente significativa em todos os níveis abordados. Partiu-se então para o estudo do impacto de cada variável (fármaco, tempo e tipo de célula) na expressão desses genes.

Inicialmente foi verificado se o impacto do tratamento com fármacos, na expressão de cada um dos genes, era significativo . Para isso foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis. Nas Tabelas de 5.21 a 5.26 estão apresentados os resultados em função da linhagem e do tempo de tratamento. Na última coluna está descrito o valor de significância “p” das comparações analisadas. Os valores de $p=0.05$ estão destacados em negrito.

Tabela 5.21 – Comparação entre os fármacos nas células da linhagem SCC9 após 24 horas

Genes	Fármaco	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	BRANCO	4	0,189	0,093	0,109	0,322	0,119	0,163	0,285	0,022
	Isc.Qu	4	0,519	0,469	0,109	1,116	0,128	0,426	1,004	
	Isc.P	4	0,874	0,815	0,283	2,071	0,325	0,570	1,726	
	Isc.M	4	1,774	0,908	1,184	3,125	1,219	1,393	2,709	
AKT2	BRANCO	4	0,301	0,160	0,152	0,500	0,162	0,275	0,465	0,473
	Isc.Qu	4	0,389	0,238	0,219	0,740	0,230	0,298	0,638	
	Isc.P	4	0,514	0,252	0,209	0,746	0,259	0,551	0,733	
	Isc.M	4	0,291	0,126	0,192	0,476	0,205	0,249	0,421	
AKT3	BRANCO	4	0,295	0,313	0,035	0,696	0,041	0,224	0,620	0,134
	Isc.Qu	4	0,279	0,047	0,235	0,339	0,238	0,270	0,328	
	Isc.P	4	0,138	0,230	0,010	0,482	0,010	0,030	0,373	
	Isc.M	4	0,039	0,049	0,003	0,107	0,004	0,023	0,091	
PTEN	BRANCO	4	0,354	0,303	0,100	0,786	0,125	0,266	0,673	0,042
	Isc.Qu	4	0,553	0,223	0,305	0,746	0,334	0,580	0,744	
	Isc.P	4	0,125	0,133	0,016	0,316	0,026	0,084	0,265	
	Isc.M	4	0,089	0,107	0,021	0,248	0,025	0,043	0,199	
CICLINA D1	BRANCO	4	0,505	0,161	0,284	0,669	0,346	0,534	0,636	0,136
	Isc.Qu	4	0,328	0,124	0,219	0,480	0,223	0,307	0,455	
	Isc.P	4	0,173	0,183	0,037	0,437	0,043	0,109	0,367	
	Isc.M	4	0,381	0,286	0,088	0,701	0,116	0,368	0,660	

Como foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, ajustado pela Correção de Bonferroni, na tentativa de identificar quais os fármacos se diferenciam entre si, quando comparados em pares.

Como pode ser observado na Tabela 5.22 houve diferença de valores estatisticamente significantes para o gene AKT1 quando comparados Branco com Iscador P, Branco com Iscador M e Iscador Qu com Iscador M, e para o gene PTEN quando comparados Iscador Qu com Iscador P e Iscador Qu com Iscador M.

Tabela 5.22 Valores de p, na comparação dos pares de fármacos nas células da linhagem SCC9, após 24 horas de incubação, onde foram demonstrados valores de significância estatística ($\leq 0,005$) para o gene em questão

Genes	Pares dos Fármacos					
	BRANCO	BRANCO	BRANCO	IscQu	Isc. Qu	Isc. P
	x Isc.Qu	x Isc. P	x Isc. M	x Isc. P	x Isc.M	x Isc. M
AKT1	0,248	0,043	0,021	0,386	0,021	0,149
PTEN	0,386	0,149	0,083	0,043	0,021	0,564

(alfa de Bonferroni = 0,008512)

Tabela 5.23 – Comparação entre os fármacos nas células da linhagem SCC9 após 48 horas

Genes	Fármaco	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Median a	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	BRANCO	4	2,293	1,129	1,260	3,550	1,300	2,180	3,397	0,005
	Isc.Qu	4	0,594	0,328	0,408	1,084	0,411	0,442	0,928	
	Isc.P	4	0,941	0,187	0,682	1,107	0,746	0,988	1,090	
	Isc.M	4	4,726	2,192	2,809	7,883	3,123	4,105	6,949	
AKT2	BRANCO	4	3,820	2,198	0,648	5,690	1,550	4,470	5,439	0,045
	Isc.Qu	4	0,900	0,164	0,661	1,031	0,731	0,954	1,015	
	Isc.P	4	0,582	0,369	0,249	1,070	0,274	0,504	0,967	
	Isc.M	4	2,798	0,703	1,971	3,554	2,103	2,833	3,457	
AKT3	BRANCO	4	0,921	0,688	0,432	1,935	0,466	0,659	1,639	0,082
	Isc.Qu	4	4,534	2,647	1,918	7,681	2,146	4,269	7,187	
	Isc.P	4	2,954	2,174	1,267	6,008	1,335	2,271	5,256	
	Isc.M	4	3,490	2,293	1,658	6,785	1,810	2,758	5,901	
PTEN	BRANCO	4	0,863	0,560	0,221	1,423	0,310	0,903	1,375	0,063
	Isc.Qu	4	1,841	0,569	1,290	2,576	1,346	1,748	2,428	
	Isc.P	4	1,143	0,677	0,680	2,149	0,726	0,871	1,831	
	Isc.M	4	3,229	1,808	1,067	4,947	1,408	3,452	4,828	
CICLINA D1	BRANCO	4	0,678	0,110	0,582	0,831	0,591	0,650	0,794	0,006
	Isc.Qu	4	1,597	0,614	0,889	2,156	0,987	1,671	2,133	
	Isc.P	4	1,285	0,542	0,759	1,867	0,792	1,257	1,806	
	Isc.M	4	4,446	1,948	2,586	6,721	2,711	4,238	6,388	

Como foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, ajustado pela Correção de Bonferroni, na tentativa de identificar quais os fármacos se diferenciam entre si, quando comparados em pares.

Tabela 5.24 Valores de p, na comparação dos pares de fármacos nas células da linhagem SCC9 após 48 horas de incubação, onde foram demonstrados valores de significância estatística ($\leq 0,005$) para o gene em questão

Genes	Pares de Fármacos					
	BRANCO	BRANCO	BRANCO	IscQu	Isc. Qu	Isc. P
	x Isc.Qu	x Isc. P	x Isc. M	x Isc. P	x Isc.M	x Isc. M
AKT1	0,021	0,021	0,083	0,149	0,021	0,021
AKT2	0,248	0,083	0,248	0,248	0,021	0,021
CICLINA	0,021	0,043	0,021	0,386	0,021	0,021

(alfa de Bonferroni = 0,008512)

Como pode ser observado na Tabela 5.24 houve diferença de valores estatisticamente significantes para o gene AKT1 quando comparados Branco com Iscador Qu, Branco com Iscador P, Iscador Qu com Iscador M e Iscador P com Iscador M. Para o gene AKT2 quando comparados Iscador Qu com Iscador M e Iscador P com Iscador M. E para o gene CICLINA D1 quando comparados Branco com Iscador Qu, Branco com Iscador P, Branco com Iscador M, Iscador Qu com Iscador M e Iscador P com Iscador M.

Tabela 5.25 – Comparação entre os fármacos nas células da linhagem SCC25 após 24 horas

Genes	Fármaco	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	BRANCO	4	1,581	0,959	0,696	2,843	0,772	1,393	2,579	0,069
	Isc.Qu	4	2,531	1,065	1,526	3,970	1,639	2,315	3,640	
	Isc.P	4	1,411	0,666	0,763	2,141	0,807	1,371	2,057	
	Isc.M	4	4,654	2,494	2,000	7,839	2,393	4,388	7,180	
AKT2	BRANCO	4	2,633	1,398	1,053	4,458	1,404	2,511	3,984	0,089
	Isc.Qu	4	3,522	2,314	0,957	6,055	1,292	3,537	5,735	
	Isc.P	4	1,546	0,286	1,272	1,928	1,303	1,492	1,843	
	Isc.M	4	6,287	3,459	3,035	10,890	3,362	5,612	9,887	
AKT3	BRANCO	4	1,991	2,018	0,094	4,030	0,178	1,921	3,875	0,331
	Isc.Qu	4	4,487	4,463	1,082	10,698	1,163	3,083	9,214	
	Isc.P	4	1,344	1,362	0,063	2,720	0,120	1,297	2,616	
	Isc.M	4	0,799	0,587	0,310	1,529	0,317	0,679	1,402	
PTEN	BRANCO	4	3,487	0,667	2,707	4,055	2,819	3,593	4,049	0,089
	Isc.Qu	4	4,196	1,797	1,919	6,292	2,456	4,287	5,846	
	Isc.P	4	1,677	1,888	0,207	4,263	0,240	1,118	3,672	
	Isc.M	4	1,554	1,605	0,363	3,923	0,505	0,966	3,192	
CICLINA D1	BRANCO	4	4,232	2,223	1,291	5,998	1,901	4,820	5,976	0,343
	Isc.Qu	4	4,650	2,755	2,480	8,373	2,523	3,872	7,553	
	Isc.P	4	1,720	1,356	0,323	2,987	0,441	1,785	2,933	
	Isc.M	4	3,826	2,433	1,431	7,159	1,792	3,357	6,329	

Tabela 5.26 – Comparação entre os fármacos nas células da linhagem SCC25 após 48 horas

Genes	Fármaco	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	BRANCO	4	1,132	0,880	0,454	2,425	0,545	0,824	2,026	0,018
	Isc.Qu	4	2,173	0,298	1,802	2,453	1,868	2,218	2,433	
	Isc.P	4	0,406	0,312	0,165	0,826	0,166	0,317	0,735	
	Isc.M	4	0,303	0,220	0,126	0,595	0,130	0,246	0,534	
AKT2	BRANCO	4	0,349	0,098	0,230	0,461	0,253	0,352	0,441	0,036
	Isc.Qu	4	0,973	0,378	0,516	1,299	0,589	1,038	1,291	
	Isc.P	4	0,230	0,201	0,073	0,507	0,077	0,171	0,443	
	Isc.M	4	0,249	0,208	0,051	0,543	0,088	0,201	0,457	
AKT3	BRANCO	4	1,515	1,861	0,114	4,159	0,165	0,893	3,486	0,033
	Isc.Qu	4	19,056	8,592	10,984	30,341	11,738	17,449	27,980	
	Isc.P	4	1,325	1,304	0,193	2,624	0,198	1,242	2,535	
	Isc.M	4	1,842	1,311	0,696	3,645	0,792	1,513	3,221	
PTEN	BRANCO	4	0,960	0,779	0,200	1,963	0,279	0,839	1,762	0,287
	Isc.Qu	4	5,000	3,461	0,343	8,084	1,373	5,788	7,840	
	Isc.P	4	0,591	0,189	0,349	0,803	0,403	0,605	0,764	
	Isc.M	4	1,273	0,502	0,631	1,774	0,758	1,344	1,718	
CICLINA D1	BRANCO	4	1,014	0,477	0,546	1,587	0,586	0,962	1,494	0,035
	Isc.Qu	4	1,642	0,676	0,946	2,331	1,007	1,646	2,273	
	Isc.P	4	0,438	0,223	0,173	0,680	0,217	0,450	0,647	
	Isc.M	4	1,304	0,223	1,062	1,602	1,111	1,276	1,525	

Como foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, ajustado pela Correção de Bonferroni, na tentativa de identificar quais os fármacos se diferenciam entre si, quando comparados em pares.

Como pode ser observado na Tabela 5.27 houve diferença de valores estatisticamente significantes para o gene AKT1 quando comparados Branco com Iscador M, Iscador Qu com Iscador P, Iscador Qu com Iscador M e Iscador P com Iscador M. Para o gene AKT2 quando comparados Branco com Iscador Qu, Iscador Qu com Iscador P e Iscador Qu com Iscador M. Para o gene AKT3 quando comparados Branco com Iscador Qu, Iscador Qu com Iscador P e Iscador Qu com Iscador M. E para o gene CICLINA D1 quando comparados Iscador Qu com Iscador P e Iscador P com Iscador M.

Tabela 5.27 – Valores de p, na comparação dos pares de fármacos nas células da linhagem SCC25 após 48 horas de incubação, onde foram demonstrados valores de significância estatística ($\leq 0,005$) para o gene em questão

Genes	Par de Medicamentos					
	BRANCO	BRANCO	BRANCO	Isc.Qu	Isc.Qu	Isc.P
	x Isc.Qu	x Isc.P	x Isc.M	x Isc.P	x Isc.M	x Isc.M
AKT1	0,149	0,149	0,043	0,021	0,021	0,386
AKT2	0,021	0,386	0,248	0,021	0,043	> 0,999
AKT3	0,021	> 0,999	0,564	0,021	0,021	0,564
CICLINA	0,248	0,083	0,248	0,021	0,773	0,021

(alfa de Bonferroni = 0,008512)

Para a comparação do efeito “fármacos” sobre a expressão dos genes nos dois tempos aplicou-se o Teste de Mann-Whitney. Nas Tabelas de 5.28 a 5.35 estão apresentados os resultados do efeito fármaco com relação ao tempo de incubação (24 e 48 horas) sobre os cinco genes analisados (AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1). Na última coluna está descrito o valor de significância “p” das comparações analisadas.

Tabela 5.28 - Comparação do efeito do Branco sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC9

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	0,189	0,093	0,109	0,322	0,119	0,163	0,285	0,021
	48h	4	2,293	1,129	1,260	3,550	1,300	2,180	3,397	
AKT2	24h	4	0,301	0,160	0,152	0,500	0,162	0,275	0,465	0,021
	48h	4	3,820	2,198	0,648	5,690	1,550	4,470	5,439	
AKT3	24h	4	0,295	0,313	0,035	0,696	0,041	0,224	0,620	0,083
	48h	4	0,921	0,688	0,432	1,935	0,466	0,659	1,639	
PTEN	24h	4	0,354	0,303	0,100	0,786	0,125	0,266	0,673	0,149
	48h	4	0,863	0,560	0,221	1,423	0,310	0,903	1,375	
CICLINA D1	24h	4	0,505	0,161	0,284	0,669	0,346	0,534	0,636	0,083
	48h	4	0,678	0,110	0,582	0,831	0,591	0,650	0,794	

Tabela 5.29 - Comparação do efeito do fármaco Iscador Qu sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC9

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	0,519	0,469	0,109	1,116	0,128	0,426	1,004	0,773
	48h	4	0,594	0,328	0,408	1,084	0,411	0,442	0,928	
AKT2	24h	4	0,389	0,238	0,219	0,740	0,230	0,298	0,638	0,043
	48h	4	0,900	0,164	0,661	1,031	0,731	0,954	1,015	
AKT3	24h	4	0,279	0,047	0,235	0,339	0,238	0,270	0,328	0,021
	48h	4	4,534	2,647	1,918	7,681	2,146	4,269	7,187	
PTEN	24h	4	0,553	0,223	0,305	0,746	0,334	0,580	0,744	0,021
	48h	4	1,841	0,569	1,290	2,576	1,346	1,748	2,428	
CICLINA D1	24h	4	0,328	0,124	0,219	0,480	0,223	0,307	0,455	0,021
	48h	4	1,597	0,614	0,889	2,156	0,987	1,671	2,133	

Tabela 5.30 - Comparação do efeito do fármaco Iscador P sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC9

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	0,874	0,815	0,283	2,071	0,325	0,570	1,726	0,386
	48h	4	0,941	0,187	0,682	1,107	0,746	0,988	1,090	
AKT2	24h	4	0,514	0,252	0,209	0,746	0,259	0,551	0,733	> 0,999
	48h	4	0,582	0,369	0,249	1,070	0,274	0,504	0,967	
AKT3	24h	4	0,138	0,230	0,010	0,482	0,010	0,030	0,373	0,021
	48h	4	2,954	2,174	1,267	6,008	1,335	2,271	5,256	
PTEN	24h	4	0,125	0,133	0,016	0,316	0,026	0,084	0,265	0,021
	48h	4	1,143	0,677	0,680	2,149	0,726	0,871	1,831	
CICLINA D1	24h	4	0,173	0,183	0,037	0,437	0,043	0,109	0,367	0,021
	48h	4	1,285	0,542	0,759	1,867	0,792	1,257	1,806	

Tabela 5.31 - Comparação do efeito do fármaco Iscador M sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC9

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	1,774	0,908	1,184	3,125	1,219	1,393	2,709	0,043
	48h	4	4,726	2,192	2,809	7,883	3,123	4,105	6,949	
AKT2	24h	4	0,291	0,126	0,192	0,476	0,205	0,249	0,421	0,021
	48h	4	2,798	0,703	1,971	3,554	2,103	2,833	3,457	
AKT3	24h	4	0,039	0,049	0,003	0,107	0,004	0,023	0,091	0,021
	48h	4	3,490	2,293	1,658	6,785	1,810	2,758	5,901	
PTEN	24h	4	0,089	0,107	0,021	0,248	0,025	0,043	0,199	0,021
	48h	4	3,229	1,808	1,067	4,947	1,408	3,452	4,828	
CICLINA D1	24h	4	0,381	0,286	0,088	0,701	0,116	0,368	0,660	0,021
	48h	4	4,446	1,948	2,586	6,721	2,711	4,238	6,388	

Tabela 5.32 - Comparação do efeito do Branco sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC25

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	1,581	0,959	0,696	2,843	0,772	1,393	2,579	0,386
	48h	4	1,132	0,880	0,454	2,425	0,545	0,824	2,026	
AKT2	24h	4	2,633	1,398	1,053	4,458	1,404	2,511	3,984	0,021
	48h	4	0,349	0,098	0,230	0,461	0,253	0,352	0,441	
AKT3	24h	4	1,991	2,018	0,094	4,030	0,178	1,921	3,875	> 0,999
	48h	4	1,515	1,861	0,114	4,159	0,165	0,893	3,486	
PTEN	24h	4	3,487	0,667	2,707	4,055	2,819	3,593	4,049	0,021
	48h	4	0,960	0,779	0,200	1,963	0,279	0,839	1,762	
CICLINA D1	24h	4	4,232	2,223	1,291	5,998	1,901	4,820	5,976	0,043
	48h	4	1,014	0,477	0,546	1,587	0,586	0,962	1,494	

Tabela 5.33 - Comparação do efeito do fármaco Iscador Qu sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC25

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	2,531	1,065	1,526	3,970	1,639	2,315	3,640	0,773
	48h	4	2,173	0,298	1,802	2,453	1,868	2,218	2,433	
AKT2	24h	4	3,522	2,314	0,957	6,055	1,292	3,537	5,735	0,083
	48h	4	0,973	0,378	0,516	1,299	0,589	1,038	1,291	
AKT3	24h	4	4,487	4,463	1,082	10,698	1,163	3,083	9,214	0,021
	48h	4	19,056	8,592	10,984	30,341	11,738	17,449	27,980	
PTEN	24h	4	4,196	1,797	1,919	6,292	2,456	4,287	5,846	0,564
	48h	4	5,000	3,461	0,343	8,084	1,373	5,788	7,840	
CICLINA D1	24h	4	4,650	2,755	2,480	8,373	2,523	3,872	7,553	0,021
	48h	4	1,642	0,676	0,946	2,331	1,007	1,646	2,273	

Tabela 5.34 - Comparação do efeito do fármaco Iscador P sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC25

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	4,654	2,494	2,000	7,839	2,393	4,388	7,180	0,021
	48h	4	0,303	0,220	0,126	0,595	0,130	0,246	0,534	
AKT2	24h	4	6,287	3,459	3,035	10,890	3,362	5,612	9,887	0,021
	48h	4	0,249	0,208	0,051	0,543	0,088	0,201	0,457	
AKT3	24h	4	0,799	0,587	0,310	1,529	0,317	0,679	1,402	0,149
	48h	4	1,842	1,311	0,696	3,645	0,792	1,513	3,221	
PTEN	24h	4	1,554	1,605	0,363	3,923	0,505	0,966	3,192	0,564
	48h	4	1,273	0,502	0,631	1,774	0,758	1,344	1,718	
CICLINA D1	24h	4	3,826	2,433	1,431	7,159	1,792	3,357	6,329	0,043
	48h	4	1,304	0,223	1,062	1,602	1,111	1,276	1,525	

Tabela 5.35 - Comparação do efeito do fármaco Iscador M sobre os Genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CICLINA D1, nas células da linhagem SCC25

Genes	Tempo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Significância (p)
AKT1	24h	4	1,411	0,666	0,763	2,141	0,807	1,371	2,057	0,043
	48h	4	0,406	0,312	0,165	0,826	0,166	0,317	0,735	
AKT2	24h	4	1,546	0,286	1,272	1,928	1,303	1,492	1,843	0,021
	48h	4	0,230	0,201	0,073	0,507	0,077	0,171	0,443	
AKT3	24h	4	1,344	1,362	0,063	2,720	0,120	1,297	2,616	0,773
	48h	4	1,325	1,304	0,193	2,624	0,198	1,242	2,535	
PTEN	24h	4	1,677	1,888	0,207	4,263	0,240	1,118	3,672	> 0,999
	48h	4	0,591	0,189	0,349	0,803	0,403	0,605	0,764	
CICLINA D1	24h	4	1,720	1,356	0,323	2,987	0,441	1,785	2,933	0,149
	48h	4	0,438	0,223	0,173	0,680	0,217	0,450	0,647	

Nas análises apresentadas acima se observou que o tempo de exposição apresentou impacto significativo na expressão dos genes estudados, mas esse resultado não foi uniforme, variando em função da linhagem estudada, do fármaco e do gene.

5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células de ambas as linhagens (SCC9 e SCC25), foram analisadas pelo método de imunofluorescência após incubação com os anticorpos: pAkt, PTEN e Ciclina D1 (4.2.7). Antes dos testes com os anticorpos mencionados, essas células foram incubadas com o Controle, Branco e os três fármacos analisados (Iscador Qu, P e M), durante 24 e 48 horas, respectivamente. Os resultados estão apresentados nas Figuras: 5.3, 5.5 e 5.7 para a linhagem SCC9 e 5.4, 5.6 e 5.8 para a linhagem SCC25.

A marcação para o anticorpo pAkt, nas células da linhagem SCC9, após 24 horas de incubação com os controles e os fármacos analisados (Figura 5.3), exibe localização nuclear. Nas células do Controle e Branco (Figura 5.3 A, B), a marcação se mostrou mais dispersa e uniforme por todo o núcleo e discretamente pelo citoplasma. A marcação permanece nuclear para as células incubadas com o Iscador Qu (Figura 5.3 C), onde quase não se observa qualquer marcação citoplasmática. Nas células incubadas com o Iscador P e M (Figura 5.3 D, E) a marcação se dá exclusivamente no núcleo. Após 48 horas as células do Controle e Branco (Figura 5.3 F, G), a marcação anteriormente nuclear e dispersa pelo citoplasma, agora se mostra quase que exclusivamente no núcleo, enquanto que as células incubadas com o Iscador Qu (Figura 5.3 H) exibem marcação nuclear igualmente de forma dispersa. Entretanto as células incubadas com os fármacos Iscador P e M (Figura 5.3 I, J), além da marcação nuclear, as mesmas exibem marcação citoplasmática dispersa, sendo discretamente mais acentuada nas células incubadas com o Iscador P (Figura 5.3 I).

Nas células da linhagem SCC25 a marcação com o anticorpo pAkt, após 24 horas de incubação, se mostrou nuclear para as células do Controle e Branco (Figura 5.4 A, B). As células incubadas com o Iscador Qu (Figura 5.4 C), além dos núcleos marcados de forma homogênea e bem definidos, exibem uma marcação em formato de rede, envolvendo-os. Essa marcação, agora com menor intensidade, pode ser evidenciada nas células incubadas com o Iscador P e M (Figura 5.4 D, E). Após 48 horas de incubação, a marcação se revelou exclusivamente nuclear, para as células contidas no Controle e Branco (Figura 5.4 F, G). Para as células incubadas com o fármaco Iscador Qu (Figura 5.4 H), foi possível observar o mesmo formato de rede na marcação nuclear. Esse mesmo padrão de marcação, desta vez

menos intenso, se repete nas células incubadas com o Iscador P e M (Figura 5.4 I, J), sendo que nas células incubadas com o Iscador M (Figura 5.4 J), essa marcação nuclear exhibe aspecto aglutinado. Em ambos os campos observa-se ainda o padrão de rede, visualizado anteriormente.

Em muitos campos de ambas as linhagens, a marcação nuclear se mostra ora de forma mais dispersa e homogênea, ora de aspecto aglutinado.

A marcação para o anticorpo PTEN nas células da linhagem SCC9, após 24 horas de incubação com os controles (Controle e Branco) está localizada no núcleo e citoplasma (Figura 5.5 A, B), enquanto que nos campos contendo as células incubadas com os três fármacos a localização, também nuclear, exhibe uma intensidade discretamente superior, quando comparada à localização citoplasmática (Figura 5.5 C, D, E). Após 48 horas de incubação as células de ambos os controles (Figura 5.5 F, G), exibem exclusão da marcação nuclear de PTEN, restando apenas a marcação citoplasmática para essas células. Entretanto, as células incubadas com os fármacos Iscador Qu e M, continuam a exhibir intensa marcação da localização nuclear de PTEN, além de positividade citoplasmática, ainda mais evidenciada nas células do campo do Iscador M (Figura 5.5 H, J). Nas células incubadas com o Iscador P, quando comparadas com as células incubadas com os fármacos anteriormente mencionados, além da localização citoplasmática, a marcação nuclear agora, exhibe um padrão de intensidade bem menor (Figura 5.5 I).

Nas células da linhagem SCC25/24 horas (Figura 5.6), a marcação de PTEN revelou o mesmo padrão de marcação (localização, aspecto e intensidade), exibidos nas células da linhagem SCC9 sob as mesmas condições (Figura 5.6 A, B, C, D, E). Após 48 horas de incubação, a marcação de PTEN apresentou pouca alteração dos padrões após 24 horas, ou seja, a localização nuclear exhibe o mesmo aspecto observado anteriormente e a marcação citoplasmática adquiriu um aspecto ligeiramente mais acentuado nos campos contendo os fármacos (Figura 5.6 F, G, H, I, J).

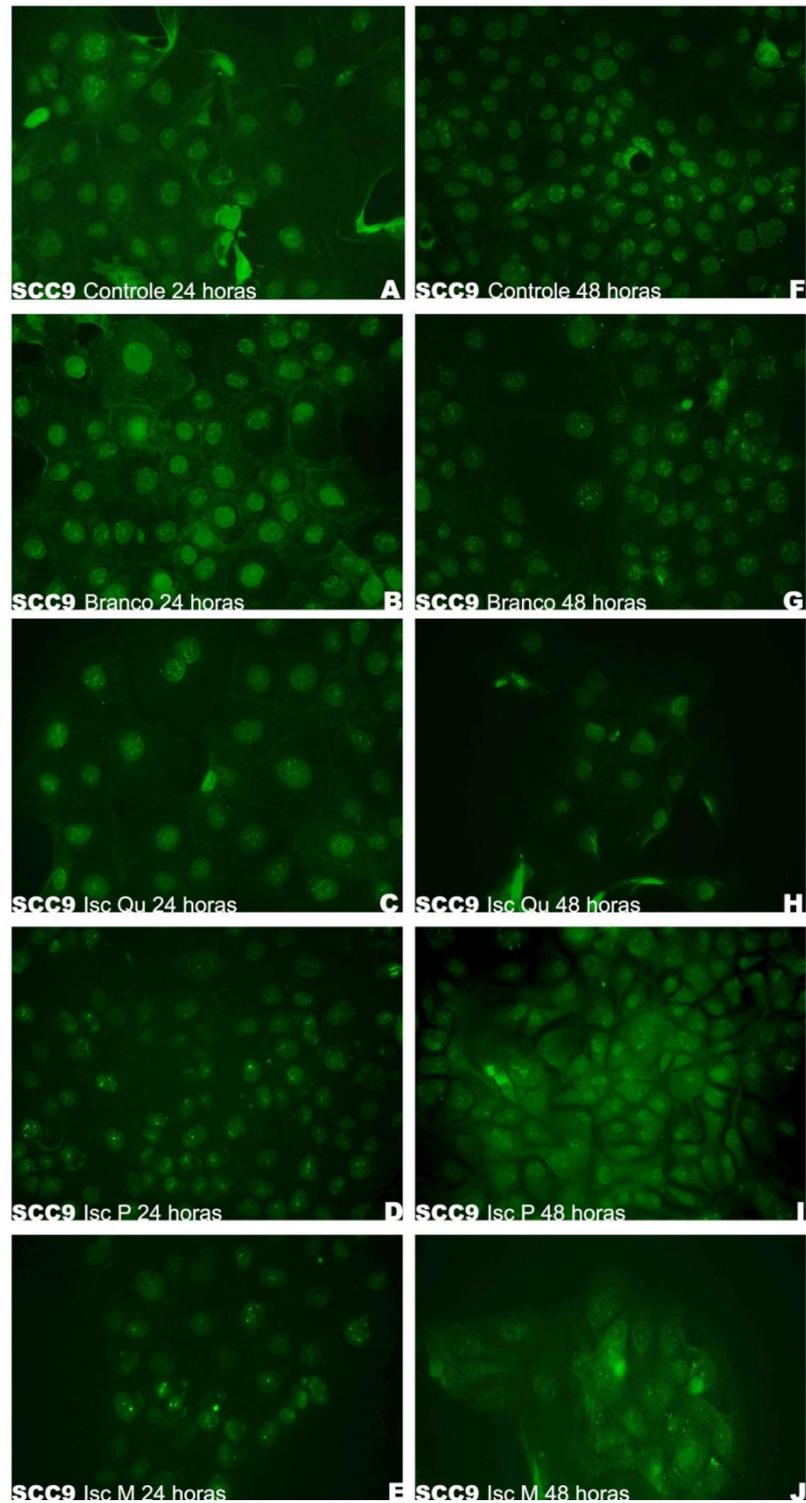


Figura 5.3: Fotomicrografia das células da linhagem SCC9, após imuno marcação com pAkt. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x400)

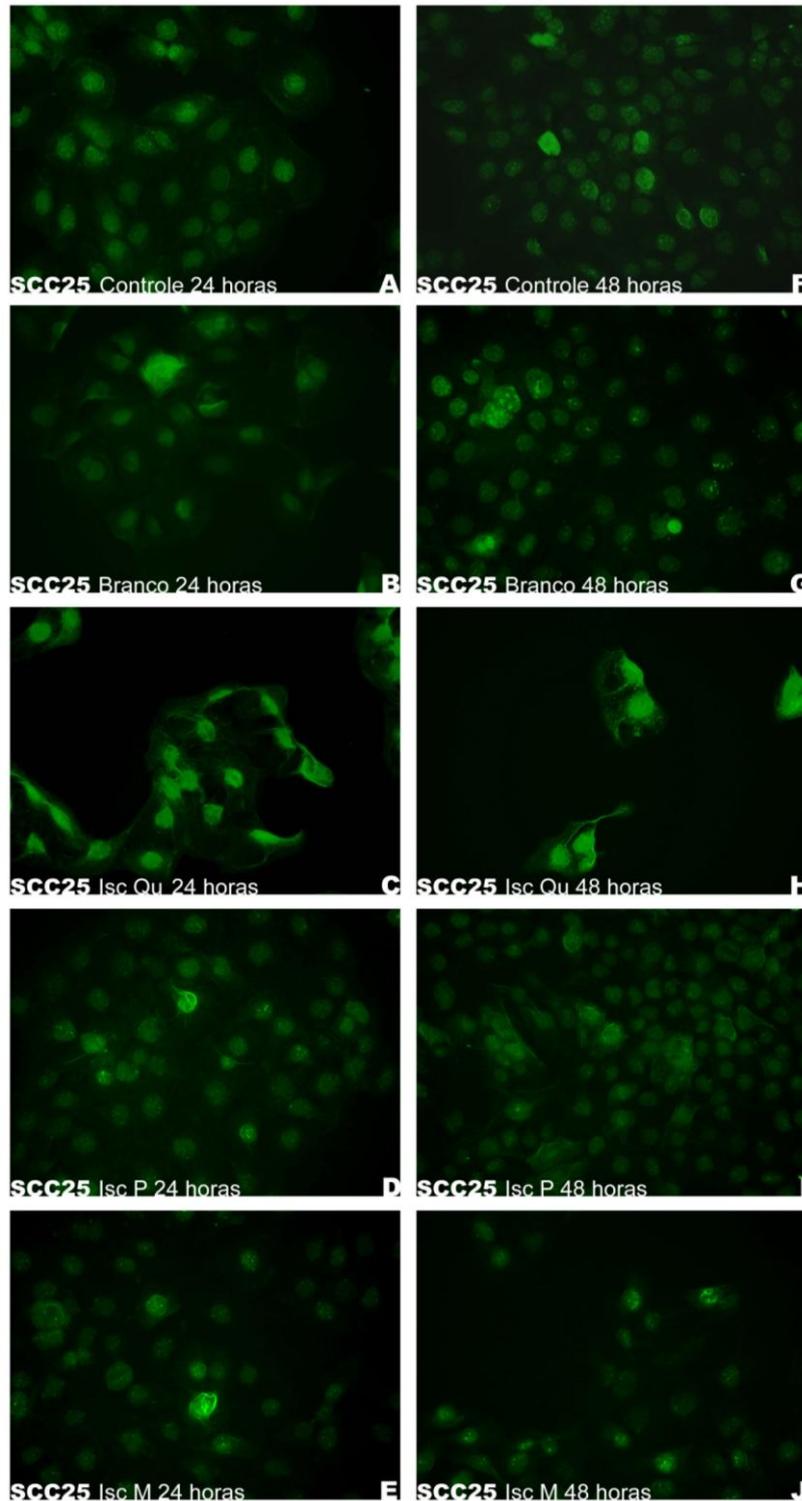


Figura 5.4 - Fotomicrografia das células da linhagem SCC25, após imuno marcação com pAkt. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x400)

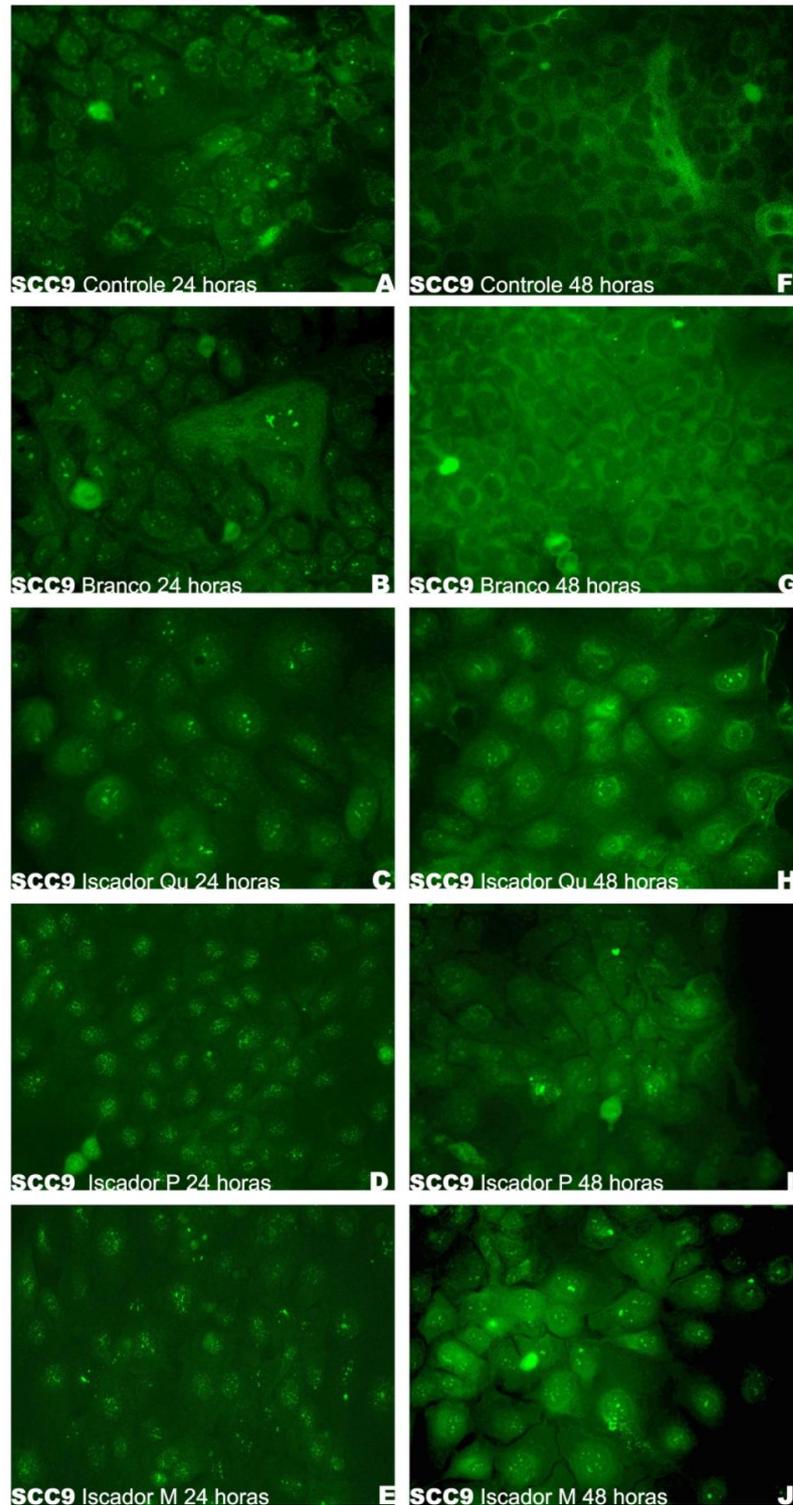


Figura 5.5 - Fotomicrografia das células da linhagem SCC9, após imuno marcação com PTEN. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x400)

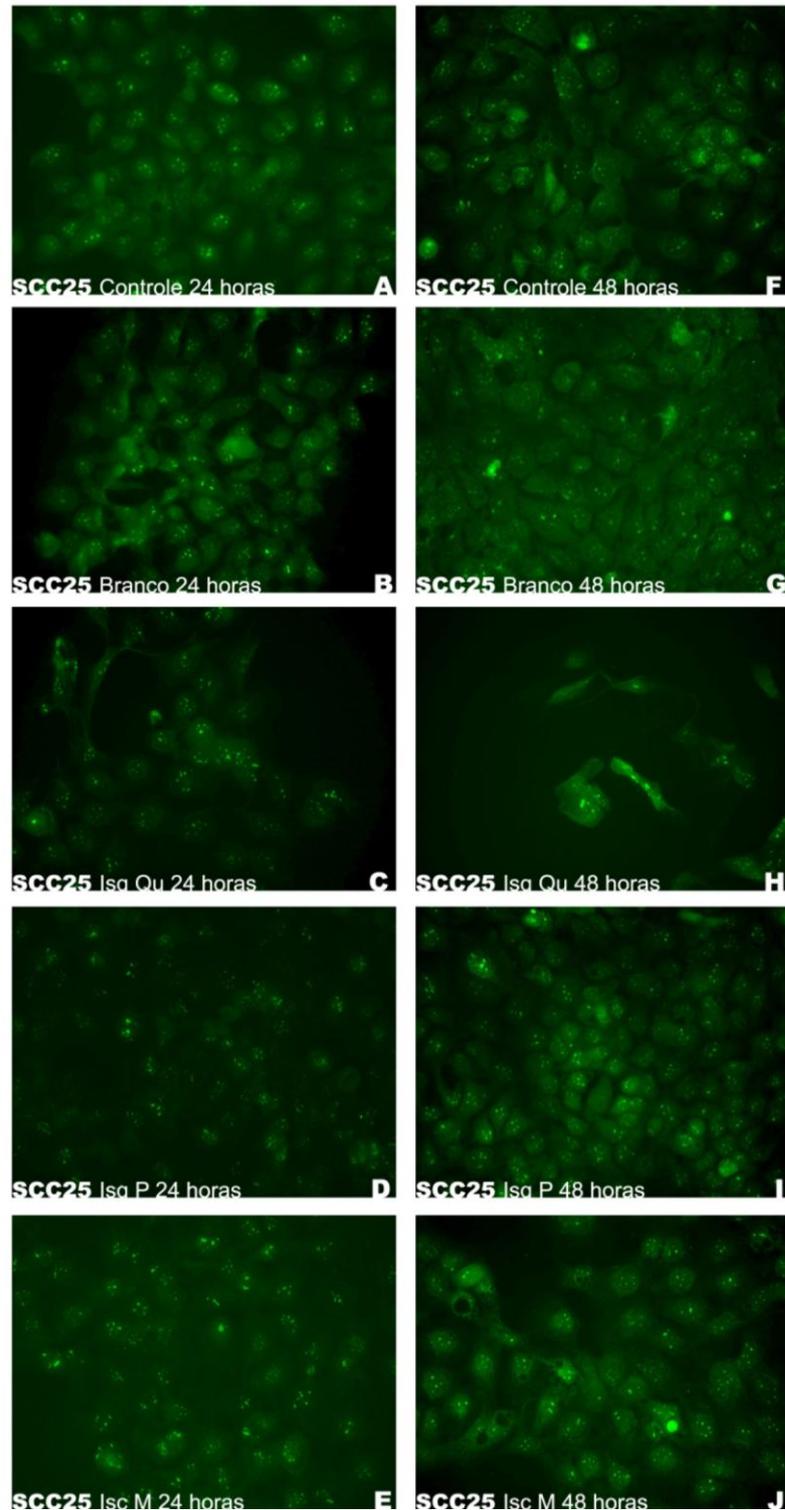


Figura 5.6 - Fotomicrografia das células da linhagem SCC25, após imuno marcação com PTEN. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x400)

A marcação para a Ciclina D1 nas células da linhagem SCC9, após 24 horas de incubação (Figura 5.7 A, B, C, D, E), está localizada no núcleo e não apresentou diferença entre o Controle, Branco e Iscador Qu (Figura 5.7 A, B, C) onde essa marcação se mostra uniformemente difusa. Entretanto, foi possível observar que nas células incubadas com o Iscador P e o Iscador M (Figura 5.7 D, E) essa marcação além de nuclear, se mostra de forma mais aglutinada. Após 48 horas, os núcleos dessas células, incubadas com o Controle, Branco e Iscador Qu (Figura 5.7 F, G, H) não apresentaram diferenças no aspecto, onde é possível visualizar nitidamente o contorno nuclear, principalmente nas células incubadas com o Iscador Qu (Figura 5.7 H). Nas células incubadas com o Iscador P e o Iscador M (Figura 5.7 I, J), além da marcação nuclear, ainda de aspecto aglutinado, nota-se também uma marcação citoplasmática.

Nas células da linhagem SCC25, após 24 horas de incubação com o Controle, Branco e os respectivos fármacos (Figura 5.8 A, B, C, D, E), a marcação com a Ciclina D1 não exibiu diferença de aspecto. Em todos os campos observa-se um aspecto de aglutinação.

Após 48 horas de incubação, foi possível observar uma dispersão desta marcação nuclear, adquirindo uma distribuição mais difusa. Entretanto nas células contendo o Iscador Qu, é um pouco mais evidente o predomínio do aspecto aglutinado de marcação, observado em todas as células após 24 horas (Figura 5.8 H), quando comparado com os outros campos. Em todos os campos agora, além da positividade nuclear, observa-se também a positividade citoplasmática da Ciclina D1 (Figura 5.8 F, G, H, I, J).

Nota-se que em todos os testes de imunofluorescência realizados, após 48 horas de incubação com os fármacos testados, a quantidade de células contidas nos campos do Iscador Qu (Figura 5.3 H, 5.4 H, 5.5 H, 5.6 H, 5.7 H, 5.8 H) e mais discretamente nos campos do Iscador M (Figura 5.3 J, 5.4 J, 5.5 J, 5.6 J, 5.7 J, 5.8 J) é menor quando comparada com os demais campos. Essa observação é feita para as células de ambas as linhagens.

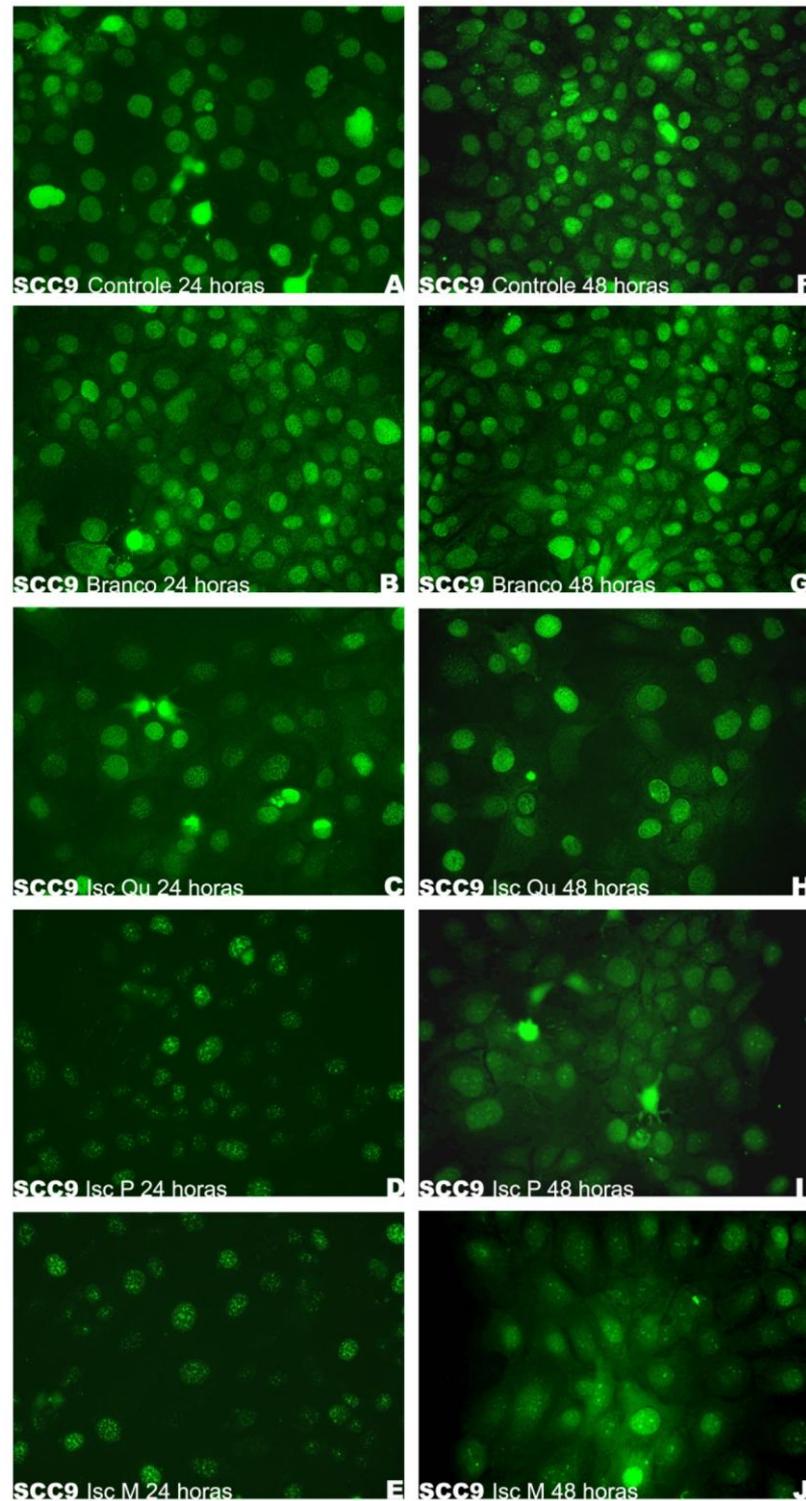


Figura 5.7 - Fotomicrografia das células da linhagem SCC9, após imuno marcação com Ciclina D1. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x 400)

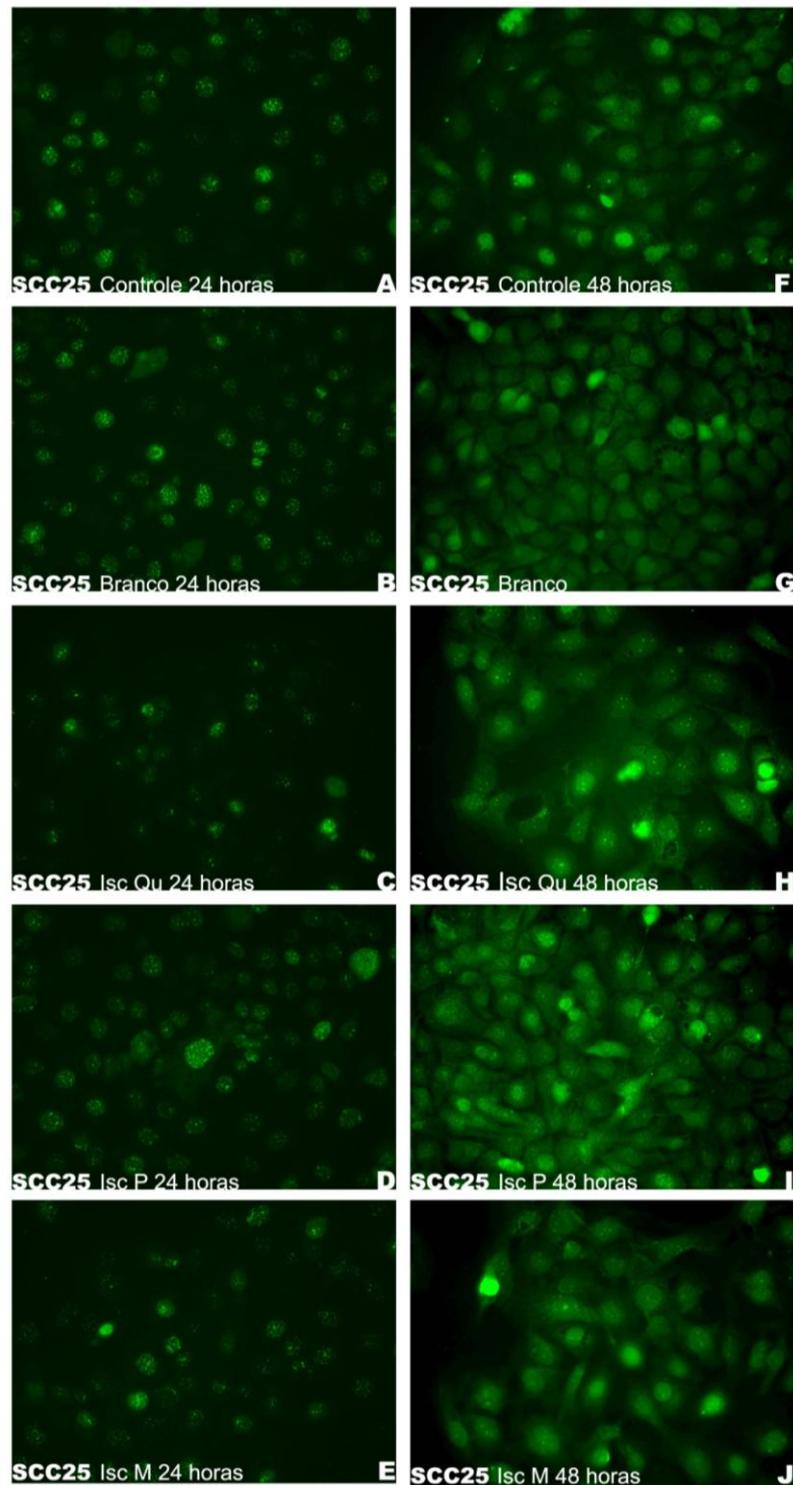


Figura 5.8 - Fotomicrografia das células da linhagem SCC25, após imuno marcação com Ciclina D1. A e B - Controle e Branco, após 24 horas de incubação. C - Iscador Qu após 24 horas de incubação. D - Iscador P após 24 horas de incubação. E - Iscador M após 24 horas de incubação. F e G - Controle e Branco após 48 horas de incubação. H - Iscador Qu após 48 horas de incubação. I - Iscador P após 48 horas de incubação. J - Iscador M após 48 horas de incubação. (x400)

5.6 WESTERN BLOTTING

As análises quantitativas das proteínas estudadas: pAkt, PTEN e Ciclina D1 nas células das linhagens SCC9 e SCC25, após 24 e 48 horas de incubação com o Controle, Branco, Iscador Qu, Iscador P e Iscador M, foram analisadas pela técnica de Western Blott (4.2.7), onde foram revelados diferentes níveis de expressão dessas proteínas. Na Figura 5.9 podem ser observadas as bandas formadas pelas proteínas expressas nas células da linhagem SCC9. Os níveis de expressão da proteína pAkt nas primeiras 24 horas não mostram diferenças marcantes. Ao observarmos atentamente podemos notar uma discreta diminuição em seus níveis, nas células incubadas com os fármacos Iscador Qu e Iscador M. Entretanto, ao observarmos esses níveis após 48 horas notamos uma diminuição da expressão nas células incubadas com os fármacos Iscador Qu e M, sendo essa diminuição mais acentuada no Iscador Qu. Esses níveis aparecem bem mais expressos nas células do Controle, Branco e Iscador P.

Ao observarmos agora, os níveis de expressão da proteína pAkt nas células da linhagem SCC25, notamos que nas primeiras 24 horas os níveis de expressão do Controle e Branco estão discretamente mais acentuados. Ao observarmos esses mesmos níveis após 48 horas de incubação, podemos notar que essa expressão diminuiu nas células incubadas com o Iscador Qu e a diminuição foi ainda mais acentuada em presença do Iscador M, enquanto que nas células incubadas com o Controle e Branco, esses níveis de expressão se mostram bem mais acentuados, ao passo que com o Iscador P houve uma discreta diminuição.

A expressão da proteína PTEN nas células da linhagem SCC9 após 24 horas de incubação com os fármacos analisados e ambos os controles, não apresentou qualquer diferença em seus níveis. Esses mesmos resultados foram constatados após 48 horas de incubação, com exceção das células incubadas com o fármaco Iscador Qu, onde é possível observar uma discreta diminuição dessa expressão. Nas células da linhagem SCC25 os níveis de expressão da proteína PTEN se mostraram sem alteração, tanto após 24 horas, quanto após 48 horas de incubação.

Ao analisarmos os níveis de expressão da proteína Ciclina D1 nas linhagens celulares testadas, verificamos algumas diferenças dessas expressões em resposta aos fármacos testados.

Nas células da linhagem SCC9 após 24 horas de incubação com os fármacos testados, observamos que a banda formada pelo Iscador Qu se encontra representada por apenas uma leve sombra, quase que imperceptível, enquanto que a banda formada pelo Iscador M não está presente (Figura 5.9). Em contrapartida, após 48 horas de incubação, a banda que estava bastante fraca, entretanto ainda presente, agora se encontra totalmente ausente, e a banda que não era possível de ser observada nas 24 horas anteriores, agora se encontra presente, ainda que bastante fraca (Figura 5.10). Os níveis de expressão das bandas formadas pelas células incubadas com o Controle, Branco e Iscador P, tanto nas 24 horas, quanto nas 48 horas não mostram qualquer tipo de alteração de expressão, quando comparadas entre si.

Nas células pertencentes à linhagem SCC25 observamos que obtivemos quase que os mesmos resultados obtidos com as células da linhagem SCC9, ou seja, não se nota qualquer diferença na expressão das proteínas do Controle, Branco e Iscador P, tanto após 24 horas, quanto após as 48 horas de incubação. Todavia, quando comparamos as expressões das células incubadas com os fármacos Iscador Qu e Iscador M, notamos que nas primeiras 24 horas ambas as bandas se encontram ausentes, e após 48 horas, observamos uma leve expressão da banda formada com as células do Iscador Qu, representada por um leve sombreado.

Abaixo de cada banda formada por cada proteína estudada, temos a expressão da proteína β -actina, utilizada como controle positivo da reação (Figuras 5.9 e 5.10).

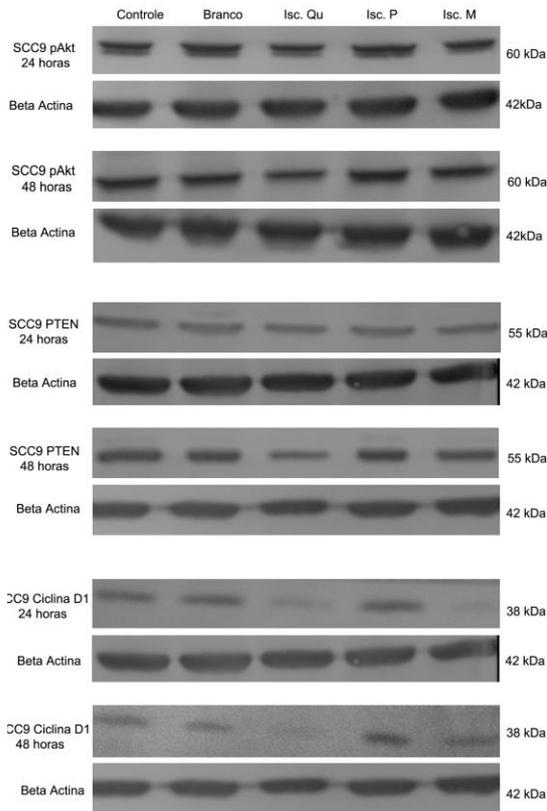


Figura 5.9 - Imagens das bandas formadas pela expressão das proteínas analisadas pAkt, PTEN e Ciclina D1 das células SCC9 na presença do Controle, Branco e dos fármacos: Iscador Qu, P e M. A proteína β -actina foi utilizada como controle positivo da reação

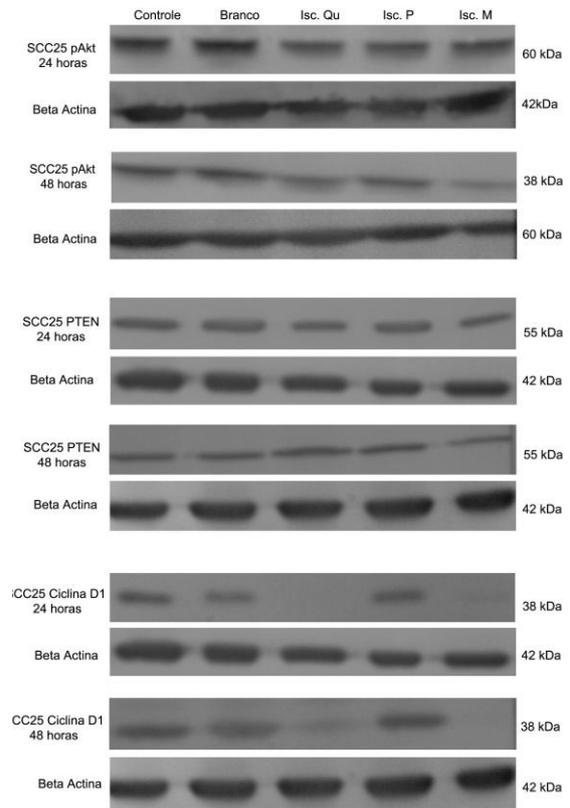


Figura 5.10 - Imagens das bandas formadas pela expressão das proteínas analisadas pAkt, PTEN e Ciclina D1 das células SCC25 na presença do Controle, Branco e dos fármacos: Iscador Qu, P e M. A proteína β -actina foi utilizada como controle positivo da reação

6 DISCUSSÃO

Atualmente, o câncer de boca tem sido considerado um problema muito sério e crescente em grande parte do planeta, mantendo sua incidência, ainda, bastante elevada⁷. Só no Brasil, as estimativas de novos casos de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço para o ano de 2010, distribuídos entre os estados, totalizaram 14.120²⁶.

Os tumores de boca e de orofaringe agrupados, se tornaram mundialmente a sexta neoplasia mais comum, além de ser causa de morbidade e de mortalidade^{3,4}.

O câncer de boca é considerado uma doença letal em até mais dos 50% dos casos diagnosticados anualmente^{4, 29, 30, 32}. Isso é amplamente refletido pelo simples fato de que na maioria dos casos o diagnóstico só é feito quando esses casos já se encontram em estados avançados^{4, 27, 28}.

As complicações^{66, 67} e os impactos⁶⁸ decorrentes dos diversos tipos de terapias utilizadas para os tratamentos dos carcinomas orais^{30, 64, 65}, continuam proporcionando resultados insatisfatórios em termos da qualidade de vida^{66,67}. Embora alguns desses efeitos negativos já estejam relativamente controlados outros, entretanto, permanecem produzindo desde as mais brandas às mais severas alterações^{68, 69, 70}. Isso faz com que o sobrevivente de um carcinoma oral permaneça com uma qualidade de vida pobre, mesmo após o término do tratamento²⁹.

Na busca constante de alternativas e novas formas terapêuticas para o tratamento dessas neoplasias, este trabalho teve por objetivo, avaliar nas células de duas linhagens preestabelecidas de carcinoma epidermoide de língua (4.1), o potencial da ação do extrato fermentado de *Viscum album* (VA), provenientes de três tipos de árvores hospedeiras (4.1). A utilização do extrato de VA data dos tempos antigos como Omnia sanans (panacéia) pelos celtas. Hipócrates, no século IV a.C., indicou-o para condições clínicas específicas, como epilepsia e hipertensão arterial²⁶⁰. Embora fosse um medicamento conhecido de longa data, com diversas indicações populares na Europa e na Ásia, sua primeira indicação para o tratamento complementar do câncer foi dada em 1917 por Rudolf Steiner (PhD) juntamente com a médica Dra Wegman, quando os primeiros pacientes com carcinoma receberam

preparados injetáveis do extrato de VA desenvolvidos em Zurique (Suíça)^{261, 262, 263}. A primeira publicação sobre o VA foi feita por Kaelin em 1933²⁶⁴.

Em nosso primeiro experimento, a ação de VA foi verificada por meio do teste de viabilidade celular, feito com MTS (5.1), em que foi estabelecido o potencial inibidor deste fármaco nas células de carcinoma testadas. Na literatura, até o presente momento, nada havia que confirmasse o seu efeito em células de carcinoma epidermoide de boca. O VA mostrou ser tempo dependente, podendo ser constatado pelos valores apresentados nas Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 para as células da linhagem SCC9 e 5.4, 5.5 e 5.6 para as células da linhagem SCC25, representados nos gráficos 5.1, 5.2 e 5.3 para a linhagem SCC9 e 5.4, 5.5 e 5.6 para a linhagem SCC25.

Nas primeiras 24 horas, em presença do fármaco Iscador Qu Spezial, não foi constatado um potencial de inibição capaz de atingir 50% das células (Tabelas 5.1 e 5.4 e Gráficos 5.1 e 5.4), todavia, após 48 horas em contato com este fármaco, os resultados mostraram que algumas concentrações foram capazes de inibir 50% da proliferação celular e conseqüentemente provocar a morte das mesmas "IC₅₀" (Tabelas 5.2 e 5.5 e Gráficos 5.2 e 5.5). Quando o tempo foi estendido para 72 horas, os valores dessas concentrações diminuíram, comprovando a ação tempo dependente do Iscador Qu (Tabelas 5.3 e 5.6 e Gráficos 5.3 e 5.6). Desta forma optou-se por escolher a IC₅₀ correspondente a 48 horas, pois segundo o protocolo de utilização desses medicamentos, as ampolas dos extratos de VA costumam ser aplicadas de forma subcutânea, de duas a três vezes por semana²⁶⁵. A concentração escolhida foi de 0,3 mg/mL, pois além de ser um valor estatisticamente significativo (p=0,011), essa concentração ficou dentro da margem de 50%. O desvio padrão gerado pela triplicata dos experimentos, comprova que pequenas diferenças dessa concentração não teria sido suficiente para influenciar o resultado final, tanto para as células da linhagem SCC9 como para as células da linhagem SCC25.

Para esse teste foi utilizado apenas o VA proveniente do Carvalho, Iscador Qu Spezial, por ser a formulação que contém a maior concentração de lectinas e viscotoxinas (Tabela 4.1), entre as três espécies testadas. Como mencionado no início do trabalho, em todos os testes realizados com o Iscador Qu, foi utilizada a formulação Qu Spezial, que significa, com padronização do marcador biológico (lectina). As linhagens celulares testadas, SCC9 e SCC25, apresentaram

comportamento semelhante frente ao medicamento, entretanto, as células da linhagem SCC9 exibiram um perfil ligeiramente mais resistente ao medicamento, quando comparadas às células da linhagem SCC25. Essa mesma concentração foi utilizada para os outros fármacos testados respectivamente, Iscador P e Iscador M. Por serem testes comparativos, as concentrações utilizadas deveriam seguir os mesmos protocolos para todos os fármacos e para ambas as linhagens. No Branco, como um segundo tipo de controle, foi utilizado apenas o veículo (solução fisiológica), isento de princípio ativo.

Os nossos resultados corroboram com os resultados obtidos em testes de viabilidade e citotoxicidade realizados com células originárias de meduloblastoma infantil²¹⁶, carcinoma de bexiga²¹⁷, carcinoma ductal e adenocarcinoma de mama²¹⁵, entre outros^{265, 266, 267, 268}. O efeito inibidor do Iscador Qu sobre as células tumorais de carcinoma de língua estaria muito provavelmente relacionado à ação citotóxica de seus principais componentes ativos, viscotoxinas e lectinas (Tabela 4.1)^{269, 270}.

No teste realizado pelo método Tunel, a apoptose é visualizada pelas células de coloração verde fluorescente, enquanto que as células viáveis se encontram com seus núcleos azuis, pelo efeito do DAPI, composto utilizado no meio de montagem. Desta maneira, é possível observar que após 24 horas em contato com os fármacos: Iscador Qu, Iscador P e Iscador M, e os controles (Controle e Branco), as células não apresentaram padrões marcantes de alteração em ambas as linhagens celulares (Figuras 5.1 e 5.2). Em todos os campos é possível observar a presença de poucas células em apoptose. Devemos nos lembrar que as células de ambas as linhagens possuem inibição de contato, portanto há presença de algumas figuras apoptóticas independente do efeito do fármaco. Ao observarmos essas células após 48 horas em contato com os respectivos fármacos, notamos pelos núcleos corados com DAPI, uma variação na quantidade de células entre os campos analisados. A quantidade de células totais em presença dos fármacos Iscador Qu e Iscador M é menor (Figura 5.1 H e J e Figura 5.2 H e J), quando comparada com os campos contendo o Controle, Branco e Iscador P, em ambas as linhagens celulares (Figura 5.1 F, G e I e Figura 5.2 F, G e I). Essa diferença é ainda mais acentuada nas células da linhagem SCC25 (Figura 5.2 H e J) o que parece não acontecer com as células da linhagem SCC9 (Figura 5.1 H e J), pois como já mencionado anteriormente, essas células exibem um perfil mais resistente, quando comparadas

à linhagem SCC25. O efeito que os fármacos exercem sobre cada tipo de célula pode ser diferente²¹⁶. Ao observarmos atentamente esses dois campos, notamos que a quantidade de células presentes no campo 5.2 H ainda é menor do que no campo 5.2 J. Esses resultados confirmam que o Iscador Qu, quando comparado com os outros dois fármacos testados Iscador P e Iscador M, muito provavelmente por possuir a maior quantidade de lectinas e viscotoxinas (Tabela 4.1), demonstrou possuir o efeito mais citotóxico e conseqüentemente o maior potencial de destruição das células^{211, 215, 216, 217}. É possível visualizar que existem células em apoptose em todos os campos, porém nos campos com menor quantidade de núcleos viáveis, notamos a mesma quantidade de células em apoptose. Desta forma, ao compararmos a relação entre o total de células viáveis e quantidade de células apoptóticas, torna-se aceitável e admissível que nos campos contendo os fármacos Iscador Qu e M, houve maior quantidade de células apoptóticas, embora o método utilizado para a obtenção desses resultados (Tunel), não seja um teste de análise quantitativa. Ainda, por meio dessas mesmas análises, observamos uma diferença na morfológica nas células de ambas as linhagens presentes nos campos contendo o fármaco Iscador P após 48 horas de incubação. A quantidade total de células está semelhante à quantidade do Controle e Branco, porém essas células possuem um aumento volumétrico (5.1 G e 5.2 G), indicando um estágio de diferenciação mais avançado²⁷¹, o que significa positividade nos resultados. Mais uma vez podemos observar, com base nesses resultados, que a quantidade de lectinas e viscotoxinas presentes nesses três fármacos possui atividades citotóxicas distintas para cada linhagem celular analisada^{242, 252}.

Para a análise quantitativa de apoptose, foi utilizada a técnica de Anexina e Iodeto de Propídeo, onde posteriormente foi realizada a leitura em um citômetro de fluxo (4.2.5). Os resultados obtidos foram capazes de demonstrar que o Iscador Qu Spezial e o Iscador M atuaram positivamente sobre as células de carcinoma de língua, no que se refere à ação citotóxica, inibindo a proliferação celular e provocando maior quantidade de apoptose e apoptose tardia dessas células, quando comparadas ao Controle, Branco e Iscador P. Ao analisarmos ambas as linhagens, observamos que as células de cada linhagem possuem comportamento e morfologia distintas. As células da linhagem SCC9 crescem normalmente agrupadas, formando grumos, aderidas umas às outras, tornando-se bastante difícil separá-las

completamente, por mais que a tentativa de ressuspensão do botão celular, formado por elas no fundo do tubo de centrífuga, seja feita. O mesmo não acontece com as células da linhagem SCC25. A morfologia das mesmas também merece atenção especial, pois as SCC9 se apresentam mais heterogêneas, de tamanhos diferentes, enquanto que as SCC25 se mostram com aspecto mais homogêneo. Seria em vão aguardar o momento de confluência das SCC9, pois as mesmas, quando se proliferam formam grumos, enquanto que os espaços entre esses grumos formados, dificilmente irá ser preenchido. Como as mesmas possuem inibição de contato, a quantidade de mitose diminui e as células começam a morrer. O meio de cultura contido na garrafa é rapidamente metabolizado, adquirindo coloração amarelada, ao mesmo tempo em que essas células liberam grande quantidade de “debris”, tornando o meio com aspecto “sujo”. Essa observação é bastante compreensível, uma vez que, com a inibição de contato e o aumento da quantidade de morte, as mesmas se soltam e são ressuspensas no meio de cultura contido na garrafa. Esse tipo de comportamento quase não é observado nas células da linhagem SCC25. Verificando a morfologia celular, com o auxílio do citômetro de fluxo utilizado em nossas análises, foi possível verificar que as SCC9 possuem um perfil granuloso, observação não verificada nas células da linhagem SCC25. Diante desta minuciosa observação, presume-se o comportamento diferente entre as células de cada linhagem, como verificado. Nos resultados dos testes quantitativos de apoptose, realizados com Anexina/Iodeto de Propídio, pode-se verificar que os índices de apoptose foram mais elevados para as células da linhagem SCC25, como observado e mencionado, nos testes de viabilidade celular (MTS). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos nos trabalhos de Eggenschwiler²¹⁵, Bussing^{272, 273}, Urech²¹⁷ e Zuzak²¹⁶ e colaboradores. Eggenschwiler ainda cita que tipos celulares diferentes, provenientes de tumores de mesma natureza, respondem de maneira diferente à ação dos extratos de VA. As células podem responder de maneira positiva aos preparados de VA ou ainda podem demonstrar resistência à ação dos mesmos²¹⁵. A autora (Eggenschwiler), assim como os demais autores citados acima, ainda conclui em seus trabalhos que a ação citotóxica de VA não depende somente do tipo celular e da concentração utilizada, mas também da composição do extrato, o qual pode ser influenciado pela localização geográfica, tipo de árvore hospedeira ou ainda o processo de manufatura dos preparos. Essas

conclusões corroboram com os resultados obtidos em nossos experimentos. Os valores de significância estatística obtidos pelas porcentagens das células viáveis, em apoptose, apoptose tardia ou necrose, obtidas por meio de nossas análises, apresentaram alguns valores, que foram de $p=0,046$ à $p=0,049$ (Tabelas 5.7 a 5.16). As comparações para as análises estatísticas foram feitas entre os tempos de incubação dessas células (24 e 48 horas). Nas células da linhagem SCC9, observamos que houve significância estatística dos valores em quase todas as comparações, desde o controle até os fármacos. Podemos ainda observar que não houve valores de significância nas células em necrose, com apenas duas exceções, que foram as células incubadas com Branco e Iscador M. Lembrando que a linhagem SCC9 possui, por si, um padrão diferente, quando comparada às células da linhagem SCC25. Esses achados, apesar da característica desse perfil celular, corroboram com os resultados dos trabalhos de Zuzak²¹⁶, onde o autor, ao analisar células de meduloblastoma, detecta uma porcentagem de células em necrose, além das células em apoptose. Ao analisarmos as células da linhagem SCC25, observamos que, apesar dessas células possuírem uma maior sensibilidade à ação dos fármacos, as mesmas mantiveram um padrão de resposta mais coerente e uniforme, além das observações feitas em outros tipos de análises, esse comportamento foi revelado nos resultados das análises estatísticas. Em nenhuma condição foram observados valores de significância estatística para os índices de necrose. Os resultados demonstraram, mais uma vez, que os fármacos Iscador Qu e M, exercem maior potencial citotóxico para as células analisadas das linhagens de carcinoma epidermoide de língua (SCC9 e SCC25). Uma observação a ser considerada, é que os experimentos “in vitro” podem apresentar variações, por parte do comportamento celular, em decorrência de uma pequena variação de tempo decorrido entre a preparação das amostras até o momento de leitura das análises. Algumas pequenas variações não são impossíveis de estar sujeitas a acontecer, mesmo realizando todas as análises em triplicata.

Após constatar o efeito apoptótico pelos dois métodos reportados anteriormente, Tunel e Anexina (5.2 e 5.3), passamos a analisar o efeito que o VA exerceu sobre uma das vias de sinalização mais estudadas e superexpressas no carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. A via de sinalização de AKT^{77, 78}, a qual pode ser bloqueada pela ação do supressor tumoral PTEN^{109, 110, 111, 112} e

consequentemente impedir a ativação da Ciclina D1^{166, 167, 168}. Para isso foram realizadas análises quantitativas de expressão dos genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e Ciclina D1 por meio de análises por qRT-PCR (5.4).

O gene GAPDH, eleito como controle endógeno, se mostrou adequado, exibindo picos únicos e constantes de amplificação. Esse gene é frequentemente utilizado em estudos moleculares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, como controle endógeno²⁷⁴.

Primeiramente nas Tabelas 5.17 e 5.18 estão contidos os diferentes valores das expressões dos genes analisados: AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e Ciclina D1, para as células da linhagem SCC9 e nas Tabelas 5.19 e 5.20 para as células da linhagem SCC25. Esses valores resultaram após 24 e 48 horas, respectivamente, de incubação com o Controle, Branco e os fármacos: Iscador Qu, P e M. Nos gráficos representativos (5.14 a 5.17), esses valores podem ser visualizados, onde observamos claramente os diferentes níveis de expressão dos genes analisados, nas condições e tempos avaliados. As duas linhagens exibem comportamentos distintos, previamente descritos e avaliados pelos experimentos anteriores. Esses genes, com exceção do PTEN^{110, 113}, são super expressos em células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, além de se mostrarem amplificados e mutados, como no caso de AKT2^{103, 104, 105, 106}.

A Análise de Variância Multivariada (APÊNDICE A) representa o passo inicial para as análises estatísticas posteriores. Quando não consta qualquer valor de significância estatística nesse tipo de análise, as análises estatísticas que seriam realizadas posteriormente não terão significado. Nossos resultados apontaram para valores de interação estatisticamente significantes. Desta forma, prosseguiu-se com as análises para os cinco genes AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e Ciclina D1, comparando a ação dos fármacos e os dois tempos de incubação com os fármacos e o Branco (24 e 48 horas). A análise foi realizada utilizando o Teste de Mann-Whitney (5.4).

Como verificado anteriormente, pelos testes de Viabilidade Celular, Tunel e Anexina, as células foram cultivadas nas mesmas condições e as análises prosseguiram nos dois tempos determinados, 24 e 48 horas. Pelo efeito apoptótico comprovado até o presente momento, poderíamos verificar, por meio das análises de qRT-PCR, que possivelmente os fármacos estariam agindo nos genes descritos

envolvidos na via de sinalização (PI3K/AKT/PTEN/Ciclina D1). Até o momento foi possível concluir que as células provenientes de linhagens celulares diferentes, derivadas do mesmo tipo de tumor, como no caso do carcinoma epidermoide de língua, onde a diferença está na idade do paciente, se comportam de maneiras distintas, como observado nos resultados dos experimentos anteriores, em que a SCC9 demonstrou possuir um perfil mais resistente, quando comparada à SCC25. Essa observação é válida e corrobora com nossos achados, frente às respostas fornecidas em outros estudos anteriores utilizando extratos de VA^{211, 215, 216, 217}. Em nossas análises, foram observados diferentes níveis de amplificação para os genes estudados. Essa variação foi visível em cada uma das linhagens celulares, além da variação exercida entre os tempos de incubação com os fármacos. Como já apresentado no capítulo dos resultados, os dados mostrados pelas análises quantitativas de expressão gênica não estão em concordância com os resultados quantitativos das expressões das proteínas (Western Blotting 5.6). Isso se deve ao fato de que possivelmente houve a transcrição do gene, entretanto, não houve a tradução. A expressão do gene nem sempre está relacionada à ativação de seu produto.

As análises estatísticas realizadas com relação ao tempo de tratamento mostraram resultados de significância estatística quando todos os tratamentos são comparados juntos, com relação ao impacto causado nos genes AKT1 ($p=0,022$) e PTEN ($p=0,042$) (Tabela 5.21) nas células da linhagem SCC9 após 24 horas de incubação com os fármacos e os controles. Sendo assim, após a comparação dos fármacos e Branco, feita em pares, foi observado valores significantes quando comparados Branco com Iscador P ($p=0,043$), Branco com Iscador M ($p=0,021$) e Iscador Qu com M ($p=0,021$), para o gene AKT1, e Iscador Qu com P ($p=0,043$) e Iscador Qu com M ($p=0,021$) para o gene PTEN (Tabela 5.22).

Nas células da linhagem SCC9 após 48 horas de incubação, após comparação de todos os tratamentos juntos, houve valores de significância estatística para os genes AKT1 ($p=0,005$), AKT2 ($p=0,045$) e Ciclina D1 ($p=0,006$) (Tabela 5.23). Após a comparação dos fármacos em pares, os valores de significância estatística foram para o gene AKT1, quando se comparou Branco com Iscador Qu ($p=0,021$), Branco com Iscador P ($p=0,021$), Iscador Qu com M ($p=0,021$) e Iscador P com M ($p=0,021$). Para o gene AKT2 esses valores foram de

significância estatística quando foi comparado Iscador Qu com M ($p=0,021$) e Iscador P com M ($p=0,021$), e para o gene Ciclina D1 quando comparados Branco com Iscador Qu ($p=0,021$), Branco com Iscador ($p=0,043$), Branco com Iscador M ($p=0,021$), Iscador Qu com P ($p=0,021$) e Iscador P com M ($p=0,021$) (Tabela 5.24). Nenhum valor de significância estatística foi observado nas células da linhagem SCC25 após 24 horas de incubação (Tabela 5.25), entretanto após 48 horas de incubação os valores apresentados mostraram significância estatística para os genes AKT1 ($p=0,018$), AKT2 ($p=0,036$), AKT3 ($p=0,033$) e Ciclina D1 ($p=0,035$) (Tabela 5.26). Quando comparados os tratamentos em pares, foi verificado que valores de significância estatística para o gene AKT1, comparando Branco com Iscador M ($p=0,043$), Iscador Qu com P e Iscador Qu com M ($p=0,021$). Para o gene AKT2 Branco com Iscador Qu e Iscador Qu com P ($p=0,021$) e Iscador Qu com M ($p=0,043$). Para o gene AKT3 Branco com Iscador Qu, Iscador Qu com P e Iscador Qu com M ($p=0,021$). Finalmente para o gene Ciclina D1 quando comparados Iscador Qu com P ($p=0,021$) (Tabela 5.27).

As análises estatísticas, comparando os intervalos de tempo, mostraram valores de significância estatística quando as células da linhagem SCC9, incubadas com o Branco, exibiram valores de amplificação gênica para AKT1 e AKT2 ($p=0,021$) (Tabela 5.28), quando incubadas com Iscador Qu para AKT2 ($p=0,043$), AKT3, PTEN e Ciclina D1 ($p=0,021$) (Tabela 5.29), quando incubadas com Iscador P para AKT3, PTEN e Ciclina ($p=0,021$) (Tabela 5.30), e quando incubadas com Iscador M para AKT1 ($p=0,043$), AKT2, AKT3, PTEN e Ciclina ($p=0,021$) (Tabela 5.31). E as mesmas comparações feitas agora para as células da linhagem SCC25 incubadas com o Branco exibiram valores de amplificação gênica para AKT2 e PTEN ($p=0,021$), Ciclina D1 ($p=0,043$) (Tabela 5.32), quando incubadas com Iscador Qu para AKT3 e Ciclina D1 ($p=0,021$) (Tabela 5.33), quando incubadas com Iscador P para AKT1, AKT2 ($p=0,021$) e Ciclina D1 ($p=0,043$) (Tabela 5.34) e quando incubadas com Iscador M para AKT1 ($p=0,043$) e AKT2 ($p=0,021$) (Tabela 5.35). Essas análises comprovaram que essas células tiveram algum efeito ao nível de amplificação dos genes analisados, quando incubadas com os fármacos e o branco durante 24 e 48 horas. Uma resposta ao stress sofrido por parte das células, durante o tempo de incubação poderia ter desencadeado um aumento dessas expressões. A super expressão, por parte de alguns desses genes não foi suficiente para que as

células deixassem de responder ao efeito apoptótico exercido pelos fármacos Iscador Qu e M, os quais demonstraram possuir maior atividade citotóxica sobre essas células. Essas amplificações não afetaram a expressão das proteínas. A amplificação do gene da Ciclina D1 é comprovada pelas análises quantitativas, enquanto que nos níveis de sua proteína houve uma diminuição. Os níveis de expressão de PTEN, onde seria esperado um aumento ainda mais expressivo, mostraram valores significantes para as células SCC9 incubadas com Iscador Qu e M e nas células SCC25 na presença do Branco. Verificando os níveis de expressão de sua proteína observamos que, de uma maneira discreta, houve uma diminuição desse nível, quando as células da SCC9 foram incubadas com o Iscador Qu. Essas observações nos levam a crer que outras vias de sinalização foram responsáveis pela inibição da proliferação dessas células^{275, 276}. Ainda podemos acrescentar que nos tumores de cabeça e pescoço a amplificação gênica da Ciclina D1 varia entre 17 a 55% dos casos²⁷⁷. A incidência da superexpressão da Ciclina D1 na ausência da amplificação foi observada em etapas primárias^{278, 279}. Isso indica que outras vias estão envolvidas na superregulação do gene da Ciclina D1. Uma das vias que exerce progressão do ciclo celular e efeito antiapoptótico é a via das STATs¹⁸⁵. Nos estudos desenvolvidos por Eggenschwiler e colaboradores²¹⁵, em que se verificou a amplificação gênica por meio de análises por microarray, as linhagens celulares analisadas mostraram respostas diferentes frente aos efeitos dos fármacos analisados, além de expressões diferentes de vários genes analisados. Ainda um fato interessante foi que essas respostas pareciam estar relacionadas à quantidade de lectinas contida nos fármacos. Na presença de um dos fármacos que mostrava possuir a menor quantidade desse componente, duas das linhagens celulares analisadas revelaram os maiores níveis de expressão de genes presentes nas vias de sinalização ligadas ao citoesqueleto²¹⁵.

No âmbito das proteínas, as vias estudadas são vias quinase fosforiladas, e devemos nos ater que nas análises de expressão gênica foram estudadas as três isoformas de AKT (AKT1, AKT2 e AKT3), enquanto que nos estudo das proteínas foi observado o comportamento de AKT total fosforilada. As três formas de AKT são ativadas por mecanismos similares. Enquanto AKT1 e AKT2 são expressas por ubiquitinação, a AKT3 é expressa de forma restrita⁹⁴. AKT2 está relacionada com o metabolismo de insulina, desta maneira a sua ausência além de desenvolver uma

resistência à insulina e um fenótipo de diabetes, não é compensada pelas isoformas AKT1 e AKT3^{87, 100}.

Nas análises apresentadas, ainda foi possível observar que quando as comparações eram feitas com as incubações em pares, alguns valores se mostravam estatisticamente significantes, comprovando com isso que os fármacos agem de forma diferente para cada linhagem, assim, provocando expressões distintas para cada gene analisado. Outra observação foi que o tempo de exposição apresentou impacto significativo na expressão dos genes estudados, todavia esse resultado não foi uniforme, variando, como relatado até o presente momento, em função da linhagem estudada, do fármaco e do gene. Outra observação a ser feita quanto à expressão gênica relatada nos estudos de Eggenschwiler (2006) é que os fármacos Iscador Qu e Iscador M afetaram genes de defesa imune e genes de respostas ao stress²¹⁵.

Após as análises quantitativas da expressão gênica, foi verificada a localização celular das proteínas produzidas por esses genes (5.5).

Primeiramente foi verificada a localização da proteína fosforilada pAkt. Segundo estudos desenvolvidos por Wang e Brattain⁹⁰ a localização celular da pAkt pode depender do contexto e da linhagem celular, ou ainda, essa translocação pode ser ativada por outras proteínas que participam normalmente desse trajeto⁹⁰.

As células de ambas as linhagens (SCC9 e SCC25), após 24 e 48 horas de incubação, obtiveram marcação nuclear positiva para a pAkt, variando os níveis de intensidade e a forma de expressão. Ora a marcação se mostrava mais acentuada, ora mais difusa, homogênea e em menor intensidade (Figuras 5.3, 5.4). Ao que tudo indica, em comparação com os dois tipos de controle, essa variação foi decorrente da resposta celular à ação dos fármacos. A literatura ainda relata que depois de pAkt ativada na membrana plasmática, a mesma pode ser translocada tanto para o citoplasma, quanto para o núcleo, podendo desta forma fosforilar diferentes tipos de substratos, como por exemplo IKK α , o qual é encontrado no citoplasma. Entretanto os substratos nucleares de pAkt ainda não foram totalmente elucidados^{280, 281, 282}. Ainda segundo Cichy (1998), pAkt nuclear pode estar evluido com a proteína ligada ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFBP1)²⁸³.

Nos campos contendo os controles (Controle e Branco) em ambas as linhagens celulares, a marcação foi uniforme, e ainda foi possível observar uma

discreta marcação citoplasmática, mais acentuada ainda nas células incubadas com o Branco (Figuras 5.3 A, B, F, G e 5.4. A, B, F, G). Após as 48 horas, a marcação agora exclusivamente nuclear, exibe um aspecto de aglutinação, provavelmente demonstrando uma maior concentração (Figuras 5.3 F, G e 5.4. F, G). Essas células, fazendo parte do controle, estão incubadas em condições ideais de cultivo. Acredita-se que a marcação nuclear da Akt fosforilada pode estar relacionada à sua ativação por mecanismos ainda não totalmente elucidados e que os mesmos podem ser decorrentes do próprio microambiente, os quais podem ser responsáveis por essa sua translocação⁹⁰. O padrão de marcação difere com relação ao tipo do fármaco e à linhagem celular. Observando os campos contendo as células incubadas com Iscador Qu após 24 horas, as SCC9 exibem um aspecto discretamente aglutinado, enquanto que as células da linhagem SCC25 exibem uma marcação nuclear de forma mais difusa e bem definida, ao mesmo tempo em que assumem um aspecto de rede envolvendo esses núcleos (Figura 5.3 C e 5.4 C). Após 48 horas de incubação as células da linhagem SCC9 deixam de apresentar a marcação nuclear de aspecto aglutinado e assumem um padrão difuso, enquanto que as células da linhagem SCC25 apresentam o mesmo padrão revelado após 24 horas de incubação (Figuras 5.3 H e 5.4 H). As células da linhagem SCC9 incubadas com os fármacos Iscador P e M, após 24 horas de incubação exibem a mesma localização e aspecto de quando incubadas com o fármaco Iscador Qu (Figura 5.3 D, E). Quando as células das duas linhagens são comparadas nas condições descritas anteriormente, notamos nas células da SCC25 o aspecto aglutinado, agora com menor intensidade e ainda algumas células mostrando o mesmo padrão de rede, exibido nas células da mesma linhagem após a incubação com o Iscador Qu (Figura 5.4 D, E). Após 48 horas de incubação com os fármacos Iscador P e M, diferenças marcantes entre as duas linhagens celulares são observadas. Nas células da linhagem SCC9, além da marcação nuclear e citoplasmática nítida e difusa, principalmente no campo contendo o Iscador P, é possível observar ao mesmo tempo, o aspecto aglutinado nos núcleos dessas células (Figura 5.3 I, J), enquanto que nas células da linhagem SCC25, a marcação além de exclusivamente nuclear, agora em menor intensidade no campo contendo o Iscador P, observa-se o mesmo aspecto de rede, anteriormente observado (Figura 5.4 I). No campo contendo o Iscador M a marcação nuclear, assim como o aspecto aglutinado, são mais

acentuados em comparação com o Iscador P. Em algumas células, o mesmo aspecto de rede presente no campo do Iscador P, entretanto esse efeito não é tão nítido pela menor quantidade celular neste campo (Figura 5.4 I, J). Todas essas observações corroboram com as observações feitas por Wang e Brattain, referentes à Akt fosforilada (pAkt)⁹⁰. A presença, localização e forma de expressão referentes à essa proteína, podem adquirir um comportamento diferente em linhagens distintas. Quando PIP3 recruta as proteínas quinases Akt e PDK1 para a membrana plasmática, a Akt será fosforilada, dessa forma, conseqüentemente ativada, ela poderá atuar tanto no citoplasma^{79, 82, 84, 86, 87}, quanto no núcleo⁹⁰. O formato em rede observado em alguns campos, parece estar relacionado à sua localização na membrana plasmática. O efeito dos fármacos testados exibiu um padrão de comportamento diferente. Como já anteriormente mencionado, observado nos experimentos anteriores (Teste de Viabilidade Celular 5.1 e Anexina/ Iodeto de Propídeo 5.3) as células da linhagem SCC9 possuem um comportamento mais resistente quando comparadas às células da linhagem SCC25. A localização e forma de expressão da proteína pAkt demonstraram padrões diferentes para ambas as linhagens. pAkt está presente no núcleo, todavia, somente as células da linhagem SCC25 exibiram a expressão em formato de rede. Essa forma de expressão pode estar vinculada a um padrão celular menos agressivo. Um dos componentes tóxicos contido no VA, as viscotoxinas, (2.5.1), comprovaram interagir com moléculas como as membranas fosfolipídicas²³¹, ao mesmo tempo em que interagem com as biomembranas, por possuir afinidade pela fosfatidilserina fosfolipídica ácida da membrana plasmática²³², se ligando paralelamente à superfície da mesma²³³. Lembrando que as células tumorais expressam sete a oito vezes mais FFA (fosfatidilserina fosfolipídica ácida) do que células não-tumorais²⁸⁴.

Além das viscotoxinas contidas nas formulações do Iscador, temos ainda o efeito das lectinas, as quais possuem propriedades de ligação específica da toxina com o receptor de superfície da célula neoplásica²³⁷.

Como já mostrado nos experimentos anteriores (Teste de Viabilidade Celular 5.1, apenas com Iscador Qu, e Anexina/Iodeto de Propídeo 5.3) as formas do VA testadas possuem níveis distintos de citotoxicidade, assim, as diferentes formas de expressão e localização de pAkt podem estar associadas aos diferentes níveis de resposta ao stress provocado pelo efeito tóxico do fármaco. Ao

compararmos todos os controles (Controle e Branco), em ambas as linhagens, notamos um comportamento semelhante, lembrando que as células contidas nesses campos estão incubadas em condições ideais de cultivo.

Ao compararmos as células de ambas as linhagens celulares após 24 horas de incubação com os controles e os fármacos observou-se que a marcação de PTEN exhibe padrão semelhante para as duas linhagens, ou seja, positividade para núcleo e citoplasma. Entretanto a marcação nuclear se mostra discretamente mais intensa, enquanto que a citoplasmática exhibe uma intensidade menor, nas células contendo os fármacos (Figura 5.5 e 5.6 A, B, C, D, E). A localização nuclear de PTEN é justificada pelo seu papel na manutenção da integridade cromossômica e no reparo do DNA^{141, 148, 159}. Uma hipotética ação desses fármacos é promover a manutenção nuclear de PTEN, pois PTEN nuclear está protegido da degradação citoplasmática pelo proteossoma e ainda torna-se capaz de antagonizar Akt e provocar a apoptose¹⁴⁸.

Interessantemente, após 48 horas de incubação, as células dos campos Controle e Branco na linhagem SCC9, apontam para a exclusão da positividade nuclear de PTEN, restando apenas a marcação citoplasmática. Isso pode ser justificado pelas conclusões de trabalhos que sugeriram que as malignidades possam estar associadas à translocação de PTEN do núcleo para o citoplasma^{153, 154, 156}. No campo contendo o Iscador Qu, os núcleos e o citoplasma mostram positividade para a marcação, entretanto a marcação no citoplasma se mostra mais discreta (Figura 5.5 H). Essa observação pode reafirmar a hipótese anteriormente mencionada. Ao contrário, no campo contendo o Iscador P, quase não se evidencia positividade nuclear para PTEN, sendo portanto a mesma visualizada no citoplasma (Figura 5.5 I). No campo do Iscador M, houve um aumento da marcação positiva de PTEN, tanto no núcleo, quanto no citoplasma (Figura 5.5 J). Nas células da linhagem SCC25, após 48 horas de incubação com os controles e fármacos, pouca alteração para a marcação de PTEN pode ser observada, quando comparada com os padrões exibidos após 24 horas. Essa observação é válida tanto para a localização como pelo aspecto da marcação. Observa-se apenas uma intensidade maior da positividade citoplasmática nos campos contendo os fármacos (Figura 5.6 F, G, H, I, J). PTEN no citoplasma também possui sua função, pois foi considerado o

primeiro sítio para elucidar sua função de supressor tumoral, a qual foi demonstrada pela habilidade no bloqueio da sinalização da quinase PI3K^{151,152}.

A Ciclina D1 após 24 horas de incubação nas células da linhagem SCC9 (Figura 5.7 A, B, C, D, E) exibe duas formas de expressão de marcação. Ao observarmos atentamente, notamos que nos campos do Controle, o Branco e o Iscador Qu (Figura 5.7 A, B, C) a marcação se mostra com aspecto pulverizado e exclusivamente nuclear, e o mesmo padrão se repete após 48 horas. Quando observamos os campos contendo os fármacos Iscador P e M (Figura 5.7 D, E) notamos um aspecto mais aglutinado, e após 48 horas essa marcação agora se mostra também no citoplasma, além de nuclear. Baldin e colaboradores (1993) esclarecem que a expressão da Ciclina D1 foi detectada primeiramente no núcleo, entretanto, quando as células entram na fase S do ciclo celular, esses níveis de expressão aumentam no citoplasma e diminuem no núcleo²⁸⁵, esta seria uma hipótese para esclarecer as diferentes localizações da Ciclina D1 encontradas nas células estudadas. Ainda podemos acrescentar que, sob condições normais, a Ciclina D1 está localizada no núcleo na fase G1 e é fosforilada, ubiquitinizada e transportada para o citoplasma na fase S^{285, 286}.

Nas células da linhagem SCC25, após 24 horas de incubação, diferentemente das células da linhagem SCC9, aqui todos os campos exibiram o mesmo padrão de marcação, ou seja, com aspecto aglutinado (Figura 5.8 A, B, C, D, E).

Após 48 horas todos os campos mostram positividade nuclear e citoplasmática para Ciclina D1 (Figura 5.8 F, G, H, I, J), entretanto é mais evidente o aspecto aglutinado de marcação para as células contendo o Iscador Qu (Figura 5.8 H) quando comparada com as células dos demais campos.

O aspecto aglutinado de marcação pode ser explicado pela alteração da estrutura da cromatina, a qual mantém a repressão transcricional dos genes da fase S durante o início da fase G1, então esses promotores são acessados somente na transição da fase G1/S²⁸⁷.

No geral, algumas formas de marcação dos anticorpos estudados, exibiram aspecto aglutinado. Isso ficou mais evidente nos campos contendo os fármacos, quando comparados com os controles. Esse efeito pode ser por parte,

atribuído ao efeito de ligação da cadeia B da lectina, contida no VA, que quando se liga à superfície celular causa aglutinação “in vitro”²²⁴.

Como já esperado, o efeito apoptótico dos fármacos analisados comprovado pelos resultados dos testes anteriores, aqui mais uma vez, foi possível observar que nos campos contendo os fármacos Iscador Qu e M, após 48 horas de incubação, a quantidade de células foi menor quando comparada com os demais campos. Observação válida para ambas as linhagens.

Prosseguindo com os experimentos, foram analisadas quantitativamente, por meio da técnica de Western Blot, as proteínas pAkt, PTEN e Ciclina D1, expressas nas células das linhagens de carcinoma epidermoide de língua, SCC9 e SCC25, após incubação com os três fármacos analisados e os controles (4.2.7).

A proteína Akt é super expressa em vários tipos de tumores malignos^{75,77} incluindo os carcinomas de cabeça e pescoço^{77, 78}. Em nossos experimentos foi observado que os níveis de expressão nos controles (Controle e Branco) são semelhantes em ambas as linhagens. Na presença dos fármacos, principalmente Iscador Qu e M, houve a diminuição da expressão da proteína pAkt (Akt fosforilada) Figura 5.9 e 5.10. Como já comprovado pelos experimentos anteriores, esses fármacos são tempo dependentes, atuando de maneira positiva após 48 horas de incubação. Sendo pAkt uma proteína que age diretamente na progressão do ciclo celular, sobrevivência e proliferação^{79, 80, 82, 84, 86, 87} os resultados comprovaram a capacidade desses fármacos em diminuir os níveis de expressão desta proteína. Corroborando com os resultados até o momento descritos, Iscador Qu e M demonstraram possuir maior potencial em provocar a morte celular^{215, 216, 217}.

PTEN como supressor tumoral se encontra frequentemente alterado em vários tipos de tumores¹¹⁰ além de estar subregulado em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço¹¹³. Os níveis de expressão após as análises quantitativas para esta proteína não se mostraram aumentados, ao contrário, as bandas formadas pelas células da linhagem SCC9 após 48 horas de incubação com Iscador Qu e mais discretamente com Iscador M, apontou para uma diminuição dessa expressão. Embora os resultados obtidos pela técnica da imunofluorescência tenham comprovado positividade para a sua localização e forma de expressão, após a incubação com os fármacos, as análises quantitativas não foram capazes de demonstrar aumento de sua atividade. Provavelmente a apoptose desencadeada

pela ação citotóxica dos fármacos, pode ter sido provocada pela inibição de outras vias de sinalização alteradas nos carcinomas, tais como, EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK²⁸⁷, ou ainda o complexo de NF-kB com STAT3, que podem levar a um aumento ainda mais significativo do potencial proliferativo, por meio da expressão de genes como c-myc e Ciclina D1²⁸⁶.

A atuação da Ciclina D1 é muito bem regulada, além de ser fator de crescimento dependente²⁹⁰. O mesmo é válido quando se trata de ativação transcricional, expressão de proteína e localização celular. A proteína aparece no início da fase G1, antes da Ciclina E, é rapidamente induzida por meio do estímulo mitogênico e seu declínio se dá igualmente de forma rápida, quando esses fatores são removidos^{288, 289, 290, 293}. Diversos fatores de transcrição como as proteínas STAT^{291, 292}, NF-kB²⁹³, Egr-1²⁹⁴, CREB²⁹⁵ e receptores nucleares²⁹⁶ foram encontrados na transativação dos promotores da Ciclina D. O acúmulo da Ciclina D1 se dá de uma forma bastante modesta, pelo fato da mesma sofrer ubiquitinação e ainda ter uma transição rápida, a qual acontece em torno de 20 minutos. Estudos revelaram que as ciclinas podem possuir outros papéis que não sejam necessariamente relacionados às funções do ciclo celular²⁹⁶. Comparando os níveis de expressão desse gene, analisados pela análise quantitativa de expressão gênica (5.4) podemos concluir que em condições de incubação com os fármacos Iscador Qu e M, os quais demonstraram maior atividade citotóxica para essas células, um acúmulo da proteína da Ciclina D1 pode ter sido alvo para desencadear um rápido processo de ubiquitinação, levando à degradação.

Os níveis de expressão da proteína Ciclina D1, após os diferentes tempos de incubação com os fármacos, revelaram em algumas situações uma diminuição acentuada, ou até mesmo, ausência dessa expressão, em presença dos fármacos Iscador Qu e M (Figura 5.9 e 5.10). Esses resultados corroboram com os resultados de estudos anteriores de Sauter e colaboradores (1999), em que foi demonstrado que o silenciamento da Ciclina D1 também possui um efeito na indução à apoptose em células de várias linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, pele e cérvix²⁹⁶.

Em algumas situações foi possível encontrar uma relação entre a localização citoplasmática da Ciclina D1 e a diminuição ou ausência dos níveis de expressão, mostrados por meio da técnica de Western Blot, principalmente após 48

horas (Iscador M). Uma hipótese afirmativa para esses achados é que tanto o Iscador Qu, quanto o Iscador M, ambos tendo demonstrado capacidade em atuar diretamente sobre os níveis de expressão da Ciclina D1, estejam inibindo outras vias mitogênicas de sinalização.

7 CONCLUSÃO

O teste de viabilidade celular, utilizando apenas o fármaco Iscador Qu, nos forneceu a concentração ($IC_{50} = 0,3$ mg) utilizada em todos os experimentos subsequentes, com as demais formulações Iscador P e M.

Concluimos que os extratos fermentados de *Viscum album* utilizados (Iscador Qu Spezial e Iscador M), foram capazes de provocar a inibição da proliferação das células das linhagens de carcinoma epidermoide de língua (SCC9 e SCC25), por meio de ação citotóxica. O fármaco Iscador P demonstrou fraca ação citotóxica nas células das linhagens analisadas. Essa atuação pode ser quase comparada aos controles.

As células da linhagem SCC9 se mostraram mais resistentes à ação dos fármacos quando comparadas às células da linhagem SCC25.

Ainda foi possível verificar que as células morreram por apoptose, e os níveis de necrose apresentados se compararam aos níveis obtidos com os controles.

Os níveis de expressão dos genes analisados: AKT1, AKT2, AKT3, PTEN e CiclinaD1, das células das linhagens SCC9 e SCC25, não apresentaram consistência e uniformidade.

Os resultados obtidos com os níveis de expressão das proteínas analisadas: pAkt, PTEN e Ciclina D1 confirmou a atuação dos fármacos Iscador Qu Spezial e Iscador M, na inibição da expressão da Ciclina D1 e mais discretamente na inibição dos níveis de pAkt.

REFERÊNCIAS¹

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8-29.
2. Warnakulasuriya S: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16. Review.
3. Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:2871–5.
4. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Opinion – profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:127-35.
5. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology.* 2007;43:523–34.
6. Kuropkat C, Venkatesan TK, Caldarelli DD, Panje WR, Hutchinson J, Preiler JS et al. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx.* 2002;29:165–74.
7. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999;49:8–31.
8. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral & maxillofacial pathology.* 2nd ed. Phila., PA: Saunders. 2002;337-69.
9. Swango PA. Cancers of the oral cavity and pharynx in the United States: An epidemiologic overview. *J Public Health Dent.* 1996;56:309-18.
10. Robinson KL, Macfarlane GJ. Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing? *Oral Oncol.* 2003;39:31–6.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

11. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010;20:2-9.
12. Lunde MLS, Warnakulasuriya S, Sand L, Hirsch JM, Vasstrand NE, Ibrahim SO. Gene Expression Analysis by cDNA Microarray in Oral Cancers from Two Western Populations. *Anticancer Research.* 2010;30:1083-92.
13. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001;94:153–6.
14. Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. Role of areca nut in betel quid associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol.* 2001;37:477–92.
15. Gupta PC, Warnakulasuriya S. Global epidemiology of areca nut usage. *Addict Biol.* 2002;7:77–83.
16. Zhang X, Reichart PA. A review of betel quid chewing, oral cancer and precancer in Mainland China. *Oral Oncol.* 2007;43:424–30.
17. National Cancer Control Programme Sri Lanka. Cancer Incidence Data: Sri Lanka Year 2001-2005. NCCP: Colombo 7th Publication 2007.
18. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, Mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer-Base No. 5, version 2.0. Lyon: IARC Press; 2004.
19. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:10–30.
20. Weber RSD. Head and neck cancer. In: Saunders, DS, editor. *Sabiston textbook of surgery*, 16th ed. Philadelphia: Saunders, 2001.
21. Burzynski NJ, Firriolo FJ, Butters JM, Sorrell CL. Evaluation of oral cancer screening. *J Cancer Educ.* 1997;12:95–9.

22. The Swedish Cancer Society, www.cancerfonden.se Site acessado em 22 de julho de 2010.

23. Llewellyn C, Johnson N, Warnakulasuriya K: Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: A case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med*. 2004;33:525-32.

24. Hindle I, Downer MC, Moles DR, Speight PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Oral Oncol*. 2000;36:328-33.

25. Warnakulasuriya S, Mak V, Moller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol*. 2006;43:982-6.

26. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Estimativa de incidência de câncer para 2009/2010 no Brasil. [documento eletrônico]. Ministério da Saúde. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>. Site acessado em 18/07/2010.

27. Epstein JB, Stevenson-Moore P. Benzydamine hydrochloride in prevention and management of pain in oral mucositis associated with radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1986;62:145-8.

28. Silverman S Jr, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data—1973 to 1985. *J Am Dent Assoc*. 1990;120:495-9.

29. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncology*. 2010;46:407-10.

30. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc*. 82:878, 2007. Erratum in: *Mayo Clin Proc*. 2007;82:1017.

31. Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival Analysis and Risk Factors for Recurrence in Oral Squamous Cell Carcinoma: Does Surgical Salvage Affect Outcome? *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68:1270-5.

32. Brandwein-Gensler M, Smith RV, Wang B, Penner C, Theilken A, Broughel D et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(5):676-88.

33. de Jong RJB, Hermans J, Molenaar J, Briaire JJ, le Cessie S. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head Neck*. 2001;23:718-24.

34. Eckardt A, Barth EL, Kokemueller H, Wegener G. Recurrent carcinoma of the head and neck: treatment strategies and survival analysis in a 20-year period. *Oral Oncol*. 2004;40:427-32.

35. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol*. 2007;43(6):523–34.

36. Chi AC. Epithelial pathology – lip vermilion carcinoma. In: *Oral and Maxillofacial Pathology* (Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE, eds), 3rd edn. Philadelphia: Saunders, 2009; 414–15.

37. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK (eds). Neoplasms – lip carcinoma. In: *Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations*. St Louis: Elsevier 2008; 52–3.

38. Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol*. 1998;16:330–7.

39. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982–1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91:622– 35.

40. Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S et al. Genetic progression model for head and neck cancer; implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996;56:2488–92.

41. Toner M, O'Regan EM. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in the Young: A Spectrum or a Distinct Group? Part 1 M. *Head and Neck Pathol*. 2009;3:246–8.

42. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(10):777–89.

43. Rahman M, Sakamoto J, Fukui T. Calculation of population attributable risk for bidi smoking and oral cancer in south Asia. *Prev Med*. 2005;40(5):510–4.

44. Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, Vaccarella S, Herrero R, Nandakumar A et al. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paanchewing and oral hygiene. *Int J Cancer*. 2002;98(3):440–5.
45. Room R, Babor T, Rehm J. Alcohol and public health. *Lancet*. 2005;365(9458):519-30.
46. World Health Organization, Food and Agriculture Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva: WHO; 2002.
47. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food Nutrition. Physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. Washington: AICR; 2007.
48. Parkin DM, Bray F. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 2006;24(Suppl 3):S11–25.
49. Subapriya R, Thangavelu A, Mathavan B, Ramachandran CR, Nagini S. Assessment of risk factors for oral squamous cell carcinoma in Chidambaram, Southern India: a case–control study. *Eur J Cancer Prev*. 2007;16(3):251–6.
50. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(3):1801–10.
51. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(1):93–00.
52. Branka Popovic´, BiljanaJekic´, IvanaNovakovic´, Lukovic´L, Konstantinovic´V, Babic´M et al. in: Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac.Surg*. 2010;39:9:909-15.
doi:10.1016/j.ijom.2010.05.007, available online at <http://www.sciencedirect.com>
53. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-31.

54. Weinberg RA . Tumor suppressor genes. *Science*. 1991;254:1138-46.
55. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
56. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*. 2007;6:2332–8.
57. Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*. 2005;15:494–01.
58. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23–8.
59. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:973–8.
60. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105-11.
61. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW et al. Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449:557–63.
62. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana- Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121:335–48.
63. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796:11–8.
64. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):301–8.
65. Gold KA, Lee H-Y, Kim ES. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2009;115:5:922-35 Review.

66. Corvo R. Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol: J Eur Soc Therap Radiol Oncol*. 2007;85(1):156–70.
67. Bernier J. Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation. *Semin Rad Oncol*. 2009;19:3–10.
68. Bomeli SR, Desai SC, Johnson JT, Walvekar RR. Management of salivary flow in head and neck cancer patients – a systematic review. *Oral Oncol*. 2008; 44:1000–8.
69. Elting LS, Keefe DM, Sonis ST, Garden AS, Spijkervet FK, Barasch A et al. Patient reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy. *Cancer*. 2008;113:2704–13.
70. Brosky M. The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia. *J Support Oncol*. 2007;5(5):215–25.
71. Bellm LA, Epstein JB, Rose-Ped A, Martin P, Fuchs HJ. Patient reports of complications of bone marrow transplantation. *Support Care Cancer*. 2000;8(1):33–9.
72. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol*. 2003;66(3):253–62.
73. Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 1: Pathogenesis and prophylaxis of mucositis. *Head Neck*. 2003;25(12):1057–70.
74. Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004;20(1):11–5.
75. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res*. 2005;94:29–86.
76. Staal SP. Molecular-Cloning of the Akt Oncogene and Its Human Homologs Akt1 and Akt2 - Amplification of Akt1 in a Primary Human Gastric Adenocarcinoma. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 1987;84:5034-7.

77. Cicenas J. The potential role of Akt phosphorylation in human cancers. *Int J Biol Marker*. 2008;23(1):1–9.
78. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):324–34.
79. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 2004;29:233–42.
80. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005;24:7455–64.
81. Segrelles C, Moral M, Lara MF, Ruiz S, Santos M, Leis H et al. Molecular determinants of Akt-induced keratinocyte transformation. *Oncogene*. 2006;25:1174–85.
82. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3KAkt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003;4:257–62.
83. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7:606–19.
84. Meier R, Hemmings BA. Regulation of protein kinase B. *J Recept Signal Transduct Res*. 1999;19:121–8.
85. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296 (5573):1655–7.
86. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489–501.
87. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(20):10983–5.
88. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL et al. Involvement of PI3K/AKT pathway in cell cycle progression, apoptosis, and

neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003;17(3): 590-603.

89. PI3K/Akt Signaling. [citado em 17 de setembro de 2010]. Disponível em: <http://www.cellsignal.com/pathway/Akt-signaling.jsp>.

90. Wang KA, Brattain MG. AKT can be activated in the nucleus. *Cell Signal*. 2006; 18(10):1722-31. Epub 2006 Feb 28.

91. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1697:3–16.

92. Murthy SS, Tosolini A, Taguchi T, Testa JR. Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;88,38–40.

93. Testa JR, Bellacosa A. Membrane translocation and activation of the Akt kinase in growth factor-stimulated hematopoietic cells. *Leukemia Res*. 1997;21:1027-31.

94. Dummler B, Hemmings BA. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 2):231–5.

95. Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther* 2004;3:268–75.

96. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D, Hemmings BA. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans*. 2004;32:350–4.

97. Segrelles C, Ruiz S, Perez P, Murga C, Santos M, Budunova IV et al. Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene*. 2002;21:53–64.

98. Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Martinez-Palacio J, Lara MF, Paramio JM. Akt mediates an angiogenic switch in transformed keratinocytes. *Carcinogenesis* 2004;25: 1137–47.

99. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 2001;15:2203–8.
100. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 2001;292:1728–31.
101. Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 2003;17,1352–65.
102. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL et al. Akt1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol.* 2001;159(2):431–7
103. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3K/Akt/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2005;114(2):242–8.
104. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK et al. Amplification of Akt2 in human pancreatic cells and inhibition of Akt2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(8):3636–41.
105. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA et al. Molecular alterations of the Akt2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer.* 1995;64(4):280–5.
106. Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT et al. Akt proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2002;23(1):201–5.
107. Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, Roth RA. Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(3):906–10.

108. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ et al. Upregulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgenindependent prostate cancer lines. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21528–32.
109. Li J, Simpson L, Takahashi M, Miliarese C, Myers MP, Tonks N et al. The Pten/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the Akt/protein kinase B oncogene. *Cancer Res.* 1997;58:5667-72.
110. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 1997;57:2124-9.
111. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI. PTEN, a putative tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275:1943-7.
112. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH et al: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997;15:356-362.
113. Kurasawa Y, Shiiba M, Nakamura M, Fushimi K, Ishigami T, Bukawa H et al. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008;19(6):1429-34.
114. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* 1999;99(3):323–34.
115. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH et al. PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual- specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:9052–7.
116. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,- trisphosphate and Akt/ protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(11):6199–204.
117. Dahia PL. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7(2):115–29.

118. Downes CP, Bennett D, McConnachie G, Leslie NR, Pass I, MacPhee C et al. Antagonism of PI 3-kinasedependent signalling pathways by the tumour suppressor protein, PTEN. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(Pt 6):846–51.
119. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:13513-8.
120. Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1820-8.
121. Hlobilkova A, Guldborg P, Thullberg M, Zeuthen J, Lukas J, Bartek J. Cell cycle arrest by the PTEN tumor suppressor is target cell specific and may require protein phosphatase activity. *Exp Cell Res.* 2000;256:571-7.
122. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784(1):150–8.
123. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell.* 2000;100:387-90.
124. Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H et al. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor AKT/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Human Molecular Genetics.* 1999;8: 185-93.
125. Okumura K, Mendoza M, Bachoo RM, DePinho RA, Cavenee WK, Furnari FB. PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26562–8.
126. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,- trisphosphate and Akt/ protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(11):6199–204.
127. Downes CP, Bennett D, McConnachie G, Leslie NR, Pass I, MacPhee et al. Antagonism of PI 3-kinasedependent signalling pathways by the tumour suppressor protein, PTEN. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(Pt 6):846–51.

128. Gan YA, Zhang S. PTEN/AKT pathway involved in histone deacetylases inhibitor induced cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncology*. 2009;45(10):e150–4.
129. Backman SA, Stambolic V, Suzuki A, Haight J, Elia A, Pretorius J et al. Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte–Duclos disease. *Nat Genet*. 2001;29:396–403.
130. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998;95:29–39.
131. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998;280:1614–7.
132. Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zhens Y et al. Genetic deletion of the Pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr Biol*. 2000;10:401–4.
133. Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol*. 1998;143:1375–83.
134. Li J, Simpson L, Takahashi M, Miliareis C, Myers MP, Tonks N et al. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Res*. 1998;58:5667–72.
135. Weng L, Brown J, Eng C. PTEN induces apoptosis and cell cycle rrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independentpat hways. *Hum Mol Genet*. 2001a;10:237–42.
136. Weng LP, Smith WM, Brown JL, Eng C. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum Mol Genet*. 2001b;10:605–16.
137. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:4240–5.

138. Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet.* 2002;70: 829–44.
139. Georgescu MM, Kirsch KH, Kaloudis P, Yang H, Pavletich NP, Hanafusa H. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res.* 2000;60:7033–8.
140. Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:7491–6.
141. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell.* 2007;128:157–70.
142. Georgescu MM, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H. The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:10182–7.
143. Fanning AS, Anderson JM. Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:432–9.
144. Lee JO, Yang H, Georgescu MM et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* 1999;99:323–34.
145. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat.* 2003;22: 183–198.
146. Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet.* 2002;70: 829–844.
147. Puc J, Parsons R. PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. *Cell Cycle.* 2005;4:927–9.
148. Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell.* 2007;128: 141–156.
149. Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell.* 2007;128:129–139.

150. Baker SJ. PTEN enters the nuclear age. *Cell*. 2007;128:25–8.
151. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:184–92.
152. Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15:171–6.
153. Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 2002;99:63–7.
154. Perren A, Komminoth P, Saremaslani P, Matter C, Feurer S, Lees JA et al. Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am J Pathol*. 2000;157:1097–103.
155. Sano T, Lin H, Chen X, Langford LA, Koul D, Bondy ML et al. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res*. 1999;59:1820–4.
156. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U et al. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol*. 2000;156:1693–1700.
157. Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, Mitra P, Poluha W, Lambert S et al. A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci*. 2000;20:1404–13.
158. Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res*. 2003;63:282–6.
159. Okumura K, Zhao M, DePinho RA, Furnari FB, Cavenee WK. PTEN: a novel anti-oncogenic function independent of phosphatase activity. *Cell Cycle*. 2005;4:540–2.
160. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*. 2003;3:117–130.

161. Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science*. 2004 303: 1179–1181.
162. Liu JL, Sheng X, Hortobagyi ZK, Mao Z, Gallick GE, Yung WK. Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. *Mol Cell Biol*. 2005b;25:6211–6224.
163. Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner. *Cancer Res*. 2006;66:736–742.
164. Leslie NR, Yang X, Downes CP, Weijer CJ. PtdIns(3,4,5)P(3)-dependent and -independent roles for PTEN in the control of cell migration. *Curr Biol*. 2007;17:115–125.
165. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*. 2008;27: 5443–53. Review.
166. Motokura T, Arnold A. Cyclins and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1155:63-78.
167. Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1994;74:152-8.
168. el-Naggar AK, Steck K, Batsakis JG. Heterogeneity of the proliferative fraction and cyclin D1/CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytometry*. 1995;21:47-51.
169. Smith BD, Haffy BG. Molecular Markers as Prognostic Factors for Local Recurrence and Radioresistance in Head And Neck Squamous Cell Carcinoma. *Radiation Oncology Investigations*. 1999;7:125–44
170. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*. 1991;350(6318):512-5
171. Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect*. 2000-2001;96:73-92

172. Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. *Science*. 1998;280(5366):1035-6.
173. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the Cell Cycle and Apoptosis. *Eur J Cancer*. 1999;35(4):5319. Review.
174. Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*. 1995;25;82(4):621-30.
175. Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante As et al. Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene*. 1993;8:3447-57.
176. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF et al. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev*. 1993;7:1559-71.
177. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Möhle-Steilein U, Tian J et al. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*. 1999; 13(5):607-19.
178. Hochhauser D, Schnieders B, Ercikan-Abali E, Gorlick R, Muise-Helmericks R, Li WW et al. Effect of cyclin D1 overexpression on drug sensitivity in a human fibrosarcoma cell line. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1269-75.
179. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;18;91(2):709-13.
180. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. 1994;79:551–5.
181. Kamer AR, Krebs L, Hoghooghi SA, Liebow C. Proliferative and apoptotic responses in cancers with special reference to oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):58-78. Review.
182. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer cell*. 2003;3:185–97.

183. Driscoll B, Buckley S, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D. Abrogation of cyclin D1 expression predisposes lung cancer cells to serum deprivation-induced apoptosis. *Am J Physiol.* 1999;276:L679–87.
184. Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(8):602-12.
185. Nakashima T, Clayman GL. Antisense inhibition of cyclin D1 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126:957–61.
186. Kornmann M, Arber N, Korc M. Inhibition of basal and mitogenstimulated pancreatic cancer cell growth by cyclin D1 antisense is associated with loss of tumorigenicity and potentiation of cytotoxicity to cisplatin. *J Clin Invest.* 1998;101:344–52.
187. Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 1995;55:975-8.
188. Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer.* 1996;78:390-5.
189. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 1989;246:603-8.
190. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 1993;73:1059-65.
191. Reed SI. Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* 1997;29:7-23.
192. Cann KL, Hicks GG. Absence of an immediate G1/S checkpoint in primary MEFs following gamma-irradiation identifies a novel checkpoint switch. *Cell Cycle.* 2006;5:1823–30.
193. Higo M, Uzawa K, Kouzu Y, Bukawa H, Nimura Y, Seki N et al. Identification of candidate radioresistant genes in human squamous cell carcinoma cells through gene expression analysis using DNA microarrays. *Oncol Rep.* 2005;14:1293–8.

194. La Thangue NB. DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:443-50.
195. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993;366:704–7.
196. Wolter F, Akoglu B, Clausnitzer A, Stein J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr.* 2001;131:2197–203.
197. Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol.* 1998;18:753–61
198. Stepanova L, Finegold M, Demayo F, Schmidt EV, Harper JW. The Oncoprotein Kinase Chaperone *CDC37* Functions as an Oncogene in Mice and Collaborates with Both c-myc and Cyclin D1 in Transformation of Multiple Tissues. *Mol Cell Biol* 2000;20:12:4462–73.
199. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potent effector of TGFbeta- induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994;371:257–61.
200. Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005;41:105–16
201. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature.* 1994;368:753–6.
202. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994;264:436–40.
203. El-Naggar AK, Lai S, Clayman G, Lee JK, Luna MA, Goepfert H et al. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol.* 1997;151:1767-74.

204. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Rusin MR, Demetrick DJ, Serrano M et al. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:11045-9.

205. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin- Cdk protein kinase activity, is related to p21. Cell. 1994;78:67-74.

206. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Persons R, Trent JM et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell. 1993;75:817-25.

207. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell. 1993;75:805-16.

208. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev. 1994;8:9-22.

209. [http:// www-bcf.usc.edu/~forsburg/cclecture.html](http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/cclecture.html). Acessado em 25 de setembro de 2010

210. <http://www.anvisa.gov.br> Site acessado em 27 de setembro de 2010

211. Goedings P. Über die bildung von *Viscum Album L.* Element der Naturwissenschaft. 1997;67(2):1-23.

212. Molassiotis A, Scott JA, Kearney N, Pud D, Magri M, Selvekerova S et al. Complementary and alternative medicine use in breast cancer patients in Europe. Support Care Cancer 2006;14(3):260-7.

213. Schumacher K, Schneider B, Reich G, Stiefel T, Stoll G, Bock PR et al. Influence of postoperative complementary treatment with lectin-standardized mistletoe extract on breast cancer patients. A controlled epidemiological multicentric retrolective cohort study. Anticancer Res. 2003;23(6D):5081-7.

214. Semiglazov VF, Stepula VV, Dudov A, Schnitker J, Mengs U. Quality of life is improved in breast cancer patients by Standardised Mistletoe Extract PS76A2 during chemotherapy and followup: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial. Anticancer Res. 2006;26(2B):1519-1529.

215. Eggenschwiler J, Patrignani A, Wagner U, Rehrauer H, Schlapbach R, Rist L et al. Gene expression profiles of different breast cancer cells compared with their responsiveness to fermented mistletoe (*Viscum album L.*) extracts Iscador from oak (*Quercus*), pine (*Pinus*), white fir (*Abies*) and apple tree (*Malus*) in vitro. *Arzneimittelforschung*. 2006;56(6A):483-96.
216. Zuzak TJ, Rist L, Eggenschwiler J, Grotzer MA, Viviani A. Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (mistletoe) preparations. *Anticancer Res*. 2006;26:3485-92.
217. Urech K, Buessing A, Thalmann G, Schaefermeyer H, Heusser P. Antiproliferative effects of mistletoe (*Viscum album L.*) extract in urinary bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 2006;26(4B):3049-55.
218. Pryme IF, Bardocz S, Pusztai A, Ewen SW. Suppression of growth of tumour cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins. *Histol Histopathol*. 2006; 21(3):285-99.
219. Elluru SR, Van Huyen JPD, Delignat S, Prost F, Heude D, Kazatchkine M et al. Antiangiogenic Properties of *Viscum Album* Extracts Are Associated with Endothelial Cytotoxicity. *Anticancer Res*. 2009;29:2945-50.
220. Hostanska K, Vuong V, Rocha S, Soengas MS, Glanzmann C, Saller R et al. Recombinant mistletoe lectin induces p53- independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1785-92.
221. Schoffski P, Riggert S, Fumoleau P, Campone M, Bolte , Marreau S et al. Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumine) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Ann Oncol*. 2004;15(12):1816-24.
222. Edlund U; Hensel A; Fröse D; Pfüller U; Scheffler A. Polysaccharides from fresh *Viscum album L.* berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I. *Arzneimittelforschung*. 2000; 50(7):645-51.
223. Romagnoli S, Fogolari F, Catalano M, Zetta L, Schaller G, Urech K et al. NMR solution structure of viscotoxin C1 from *Viscum album* species *Coloratum ohwi*: toward a structure-function analysis of viscotoxins. *Biochemistry*. 2003;42(43):12503-10.

224. Franz H, Ziska P, Kindt A. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem J.* 1981;195:481-4.
225. Eifler R, Pfueller K, Goeckeritz D, Pfueller U. Improved procedures for isolation of mistletoe lectins and their subunits: lectin pattern of the European mistletoe, in: J. Basu M, Kundu P. Chakrabarti (Eds.), *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, v9, Wiley Eastern, India. 1993;144–51.
226. Orrù S, Scaloni A, Giannattasio M, Urech K, Pucci P, Schaller G. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. *Biol Chem.* 1997;378:(9):989-96.
227. Schaller G, Urech K, Giannattasio M. Cytotoxicity of Different Viscotoxins and Extracts from the European Subspecies of *Viscum album* L. *Phytother Res.* 1996;10:473 —7.
228. Bohlmann H, Apel K. Thionins *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1991;42:227-40.
229. Huges P, Dennis E, Whitecross M, Llewellyn D, Gage P. The cytotoxic plant protein, α -purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *J Biol Chem.* 2000;275, 823-7.
230. Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW, Broekaert WF. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins, *J. Biol. Chem.* 1996;271:15018-25.
231. Romagnoli S, Ugolini R, Fogolari F, Schaller G, Urech K, Giannattasio M et al NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L. *Biochem J.* 2000;350,569-77.
232. Coulon A, Berkane E, Sautereau AM, Urech K, Rouge P, Lopez A. Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich peptide: viscotoxin A3. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1559:145-59.
233. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion, and destabilization of phospholipid bilayer membranes by R-helical antimicrobial and cell nonselective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462:55-70.

234. Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-Vogel EM, Epand RF, Epand RM. Toward a structurefunction analysis of bovine lactoferricin and related tryptophanand arginine-containing peptides. *Biochem Cell Biol.* 2002;80:49-63.
235. Franz H, Ziska P, Kindt A. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L*). *Biochem J.* 1981;95:481–4.
236. Endo Y, Tsurugi K, Franz H. The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein, *FEBS Lett.* 2 1988;378– 80.
237. Soler MH, Stoeva S, Schwamborn C, Wilhelm S, Stiefel T, Voelter W. Complete amino acid sequence of the A-chain of mistletoe lectin I. *FEBS Lett.* 1996;399:153–7.
238. Vervecken W, Kleff S, Pfüller U, Büssing A. Induction of apoptosis by mistletoe lectin 1 and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32:317-26.
239. Soler MH, Stoeva S, Voelter W. Complete amino acid sequence of the B-chain of mistletoe lectin I. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246:596–601.
240. Hajto T, Hostanska K, Saller R. Mistletoe therapy from the pharmacologic perspective. *Forsch Komplementarmed.* 1999;6(4):186-94.
241. Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ. Increased secretion of tumor necrosis factor- α , interleukin-1, and interleukin-6 by human mononuclear cells exposed to b-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 1990;50:3322–6.
242. Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P, Anton R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* 1996;109:33–8.
243. Stein GM, Berg PA. Mistletoe extract-induced effects on immunocompetent cells: in vitro studies. *Anticancer Drugs.* 1997;8:S39–S42.
244. Vehmeyer K, Hajto T, Hostanska K, Könemann S, Löser H, Saller R et al. Lectin-induced increase in clonogenic growth of haematopoietic progenitor cells. *Eur J Haematol.* 1998;60(1):16-20.

245. Dietrich JB, Ribereau-Gayon G, Jung ML, Franz H, Beck JP, Anton R. Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album L.*) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. *Anti-Cancer Drugs*. 1992;3:507–11.
246. Kopp J, Korner IJ, Pfuller U, Gockeritz W, Eifler R, Pfuller K et al. Toxicity of mistletoe lectins I, II and III on normal and malignant cells, in: E. Van Driessche, H. Franz, S. Beeckmans (Eds.). *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, v8, Textop, Hellerup, Denmark. 1993:41–7.
247. Pfueller U. Toxic and immunostimulating effects of mistletoe and related toxic lectins, in: S. Bardocz, E. Gelencser, A. Pusztai (Eds.), *Proceedings of the second scientific workshop of COST 98, Budapest, vol. 1*, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg. 1996; p-46.
248. Heiny BM, Beuth J. Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces β -endorphin release and immunopotentialiation in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 1994;14:1339–42.
249. Falconer J, Chan EC, Madsen G, Thomson M, Davies J, Smith R. Secretion of β -endorphin into the maternal circulation by uteroplacental tissues in response to hypoglycaemic stress. *J Endocrinol*. 1998;118:5–8.
250. Kim MS; So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK et al. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album var. coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen Pharmacol*. 2000;34:5,349-55.
251. Frantz M; Jung ML; Ribereau-Gayon G; Anton R. Modulation of mistletoe (*Viscum album L.*) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum lycoproteins. *Arzneimittelforschung*. 2000; 50:5,471-8.
252. Ribereau Gayon G, Jung ML, Frantz M, Anton R. Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album L.* extracts or mistletoe lectins. *Anticancer Drugs*. 1997; 8:1:S3-8.
253. Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis. *Cancer Res*. 1999;59:2083–90.

254. Freshney, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. (149-177) 4th ed. United States of America: Willey-Liss, 2000. cap.11
255. Borefreund E, Puerner JA. "A Simple Quantitative Procedure using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assay (HTD/NR-90)", J Tissue Cult Methods. 1985;9:1,7-9.
256. Bartrop JA, Owen TC., Cory AH, Cory JG. "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, Inner Salt (MTS) and Related Analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reducing to Purple water-soluble Formazans as cell-viability Indicators", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1991;1:611-4.
257. Rosner B. Fundamentals of Biostatistics, 2nd Ed., Boston: Duxbury Press;1986.
258. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;1:29(9):e45
259. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:9:4350-4.
260. Ghelman, R. *Viscum album*: um fototerápico promissor para o câncer. Arte Med. Ampl. Ano XXII, Nº 3 e 4 Primavera/Verão;2002
261. Wegman I. Die ersten Krebsbehandlungen mit *Viscum album*. Beitr. Erw. Heilk. 1987;40:233.
262. Steiner R. Dreizehnter Vortrag, Dornach, 31 December 1916. In: Steiner R. Zeitgeschichtliche Betrachtungen (GA 173), Rudolf Steiner Nachlassverwaltung, Dornach (1978).
263. Steiner R. Dreizehnter Vortrag, Dornach, 2 April 1920. In: Steiner R. Geisteswissenschaft und Medizin (GA 312), 4th ed., pp 210-227, Rudolf Steiner Nachlassverwaltung, Dornach 1961.
264. Kaelin W. Die *Viscum*behandlung des Karzinoms. Hippokrates Z. prakt. Heilkunde. 1933;4:325.

265. Matthes H, Friedel WE, Bock PR, Zänker KS. Molecular Mistletoe Therapy: Friend or Foe in Established Anti-Tumor Protocols? A Multicenter, Controlled, Retrospective Pharmaco-Epidemiological Study in Pancreas Cancer. *Curr Mol Med.* 2010;10:430-9.
266. Kelter G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 26 human tumor cell lines by Mistletoe (*Viscum album L.*) Extracts Iscador in vitro. *Arzneimittelforschung.* 2006 Jun;56(6A):435-40.
267. Urech K, Schaller G, Ziska P, Giannattasio M. Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumor cells in culture. *Phytoth Res.* 1995;9:49-55.
268. Pfeiffer E. Eine qualitative Chromatographische Methode zur Bestimmung biologischer Werte. In: *Lebendige Erde.* 1960; Heft 5.
269. Kovacs E, Link S, Toffol-Schmidt U Cytostatic and cytotoxic effects of mistletoe (*Viscum album L.*) quercus extract Iscador *Arzneimittelforschung.* 2006;56(6A):467-73.
270. Sabová L, Pilátová M, Szilagyí K, Sabo R, Mojzís J. Cytotoxic effect of mistletoe (*Viscum album L.*) extract on Jurkat cells and its interaction with doxorubicin. *Phytother Res.* 2010;24(3):365-8
271. Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985;82:5390-4.
272. Bussing A, Suzart K, Bergmann J, Pfuller U, Schietzel M, Schweizer K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett.* 1996;99:1:59-72.
273. Bussing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album L.* extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res.* 1999;19(1A):23-8.
274. Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Shillito E, Kellman RM, Ensley JF et al. Gene expression profiles in squamous cell carcinomas of the oral cavity: use of laser capture microdissection for the construction and analysis of stage-specific cDNA libraries. *Oral Oncol.* 2000;36:474-83.

275. Arvind R, Shimamoto H, Momose F, Amagasa T, Omura K, Tsuchida N. A mutation in the common docking domain of ERK2 in a human cancer cell line, which was associated with its constitutive phosphorylation. *Int J Oncol* 2005;27:1499–504.
276. Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 2006;6:8,602-12.
277. Rousseau A, Lim MS, Lin Z, Jordan RC. *Oral Oncol.* 2001;37(3):268–75.
278. Miyamoto R, Uzawa N, Nagaoka S, Nakakuki K, Hirata Y, Amagasa T. *Cancer.* 2002;95(10):2152–9.
279. Goto H, Kawano K, Kobayashi I, Sakai H, Yanagisawa S. *Oral Oncol.*2002; 38(6):549–56.
280. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31515-24.
281. Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation and nuclear translocation of protein kinase β . *J Biol Chem.* 1997;272(48):30491-7.
282. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002;14(5):381-95.
283. Cichy SB, Uddin S, Danilkovich A, Guo S, Klippel A, Unterman TG. Protein kinase/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein- 1 gene expression through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem.* 1998;273:6482-7.
284. Coulon A, Mosbah A, Lopez A, Sautereau AM, Schaller G, Urech K et al. Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):71-8.
285. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993; 7(5):812-21.

286. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1997;11:957-72.
287. Arvind R, Shimamoto H, Momose F, Amagasa T, Omura K, Tsuchida N. A mutation in the common docking domain of ERK2 in a human cancer cell line, which was associated with its constitutive phosphorylation. *Int J Oncol.* 2005;27(6):1499-504
288. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Review Gene.* 2002;299:35-55.
289. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato J, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ. *Genes Dev.* 1993;7:1559-71
290. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell.* 1991;65:701-13.
291. Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C et al. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J.* 1999;18:1367-77.
292. Bromberg J, Wrzeszczynska M, Devgan G, Zhao Y, Pestell R, Albanese C et al. Stat-3 as an oncogene. *Cell.* 1999;98:295-303.
293. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19:8:5785-99.
294. Yan YX, Nakagawa H, Lee MH, Rustgi AK. Transforming growth factor-alpha enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D1 promoter. *J Biol Chem.* 1997;272:33181-90.
295. Lee RJ, Albanese C, Stenger RJ, Watanabe G, Inghirami G, Haines GK 3rd et al. pp60 (v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element-binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1999;274:7341-50.

296. Sauter ER, Nesbit M, Litwin S, Klein-Szanto AJ, Cheffetz S, Herlyn M. Antisense cyclin D1 induces apoptosis and tumor shrinkage in human squamous carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59:4876–81.

APÊNDICE A - Estudo do efeito de tempo, tipo celular e fármaco, para as variáveis de genes

Aplicação da *Análise de Variância Multivariada*, com o objetivo de verificar o grau dos efeitos das variáveis-controle sobre as variáveis de genes:

Efeito	Estatística	Valor	F	Significância (p)
TEMPO	Pillai's Trace	0,421	6,387	0,000
	Wilks' Lambda	0,579	6,387	0,000
	Hotelling's Trace	0,726	6,387	0,000
	Roy's Largest Root	0,726	6,387	0,000
FÁRMACO	Pillai's Trace	1,345	7,475	0,000
	Wilks' Lambda	0,118	9,507	0,000
	Hotelling's Trace	3,786	10,770	0,000
	Roy's Largest Root	2,341	21,537	0,000
TIPO CELULAR	Pillai's Trace	0,667	17,632	0,000
	Wilks' Lambda	0,333	17,632	0,000
	Hotelling's Trace	2,004	17,632	0,000
	Roy's Largest Root	2,004	17,632	0,000
TEMPO X FÁRMACO	Pillai's Trace	0,769	3,169	0,000
	Wilks' Lambda	0,371	3,509	0,000
	Hotelling's Trace	1,325	3,768	0,000
	Roy's Largest Root	0,953	8,768	0,000
TEMPO X TIPO CELULAR	Pillai's Trace	0,845	47,932	0,000
	Wilks' Lambda	0,155	47,932	0,000
	Hotelling's Trace	5,447	47,932	0,000
	Roy's Largest Root	5,447	47,932	0,000
FÁRMACO X TIPO CELULAR	Pillai's Trace	0,917	4,052	0,000
	Wilks' Lambda	0,250	5,302	0,000
	Hotelling's Trace	2,355	6,699	0,000
	Roy's Largest Root	2,057	18,924	0,000
TEMPO X FÁRMACO X TIPO CELULAR	Pillai's Trace	0,883	3,835	0,000
	Wilks' Lambda	0,285	4,685	0,000
	Hotelling's Trace	1,940	5,518	0,000
	Roy's Largest Root	1,593	14,654	0,000

CONTINUAÇÃO

Fonte de Variação	Variável Dependente	Soma de Quadrados do Tipo III	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Significância (p)
Intercepto	AKT1	170,30	1	170,30	154,25	0,000
	AKT2	161,07	1	161,07	102,10	0,000
	AKT3	506,43	1	506,43	65,08	0,000
	PTEN	181,39	1	181,39	106,59	0,000
	CICLINA D1	199,09	1	199,09	123,91	0,000
TEMPO	AKT1	0,23	1	0,23	0,21	0,647
	AKT2	7,79	1	7,79	4,94	0,031
	AKT3	172,46	1	172,46	22,16	0,000
	PTEN	2,05	1	2,05	1,21	0,278
	CICLINA D1	2,91	1	2,91	1,81	0,185
FÁRMACO	AKT1	34,96	3	11,65	10,55	0,000
	AKT2	23,71	3	7,90	5,01	0,004
	AKT3	391,14	3	130,38	16,76	0,000
	PTEN	35,30	3	11,77	6,92	0,001
	CICLINA D1	21,98	3	7,33	4,56	0,007
TIPO CELULAR	AKT1	1,30	1	1,30	1,18	0,283
	AKT2	9,59	1	9,59	6,08	0,017
	AKT3	97,11	1	97,11	12,48	0,001
	PTEN	27,79	1	27,79	16,33	0,000
	CICLINA D1	22,25	1	22,25	13,85	0,001
TEMPO X FÁRMACO	AKT1	5,42	3	1,81	1,64	0,193
	AKT2	11,92	3	3,97	2,52	0,069
	AKT3	209,94	3	69,98	8,99	0,000
	PTEN	14,58	3	4,86	2,86	0,047
	CICLINA D1	11,80	3	3,93	2,45	0,075
TEMPO X TIPO CELULAR	AKT1	32,28	1	32,28	29,23	0,000
	AKT2	88,27	1	88,27	55,95	0,000
	AKT3	3,94	1	3,94	0,51	0,480
	PTEN	20,45	1	20,45	12,02	0,001
	CICLINA D1	69,28	1	69,28	43,12	0,000
FÁRMACO X TIPO CELULAR	AKT1	14,03	3	4,68	4,23	0,010
	AKT2	14,32	3	4,78	3,03	0,038
	AKT3	259,90	3	86,63	11,13	0,000
	PTEN	30,17	3	10,06	5,91	0,002
	CICLINA D1	13,91	3	4,64	2,89	0,045
TEMPO X FÁRMACO X TIPO CELULAR	AKT1	28,92	3	9,64	8,73	0,000
	AKT2	29,69	3	9,90	6,27	0,001
	AKT3	117,49	3	39,16	5,03	0,004
	PTEN	5,13	3	1,71	1,01	0,399
	CICLINA D1	9,61	3	3,20	1,99	0,127

ANEXO A - Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 194385
Protocolo 122/2008

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Ação do Viscum álbum em cultivo celular de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Maria Fátima Guarizo Klingbeil, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Décio dos Santos Pinto Júnior.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de junho de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Sáilles Oliveira"
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - Telef./FAX (0XX11) 3091-7857