

SILVIA TAVEIRA ELIAS

**EFEITO APOPTÓTICO DO EXTRATO BRUTO DE TABACO EM LINHAGEM
DE CARCINOMA ORAL HUMANO**

Brasília
Julho, 2009



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Laboratório de Farmacologia Molecular

SILVIA TAVEIRA ELIAS

**EFEITO APOPTÓTICO DO EXTRATO BRUTO DE TABACO EM LINHAGEM DE
CARCINOMA ORAL HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Barretto Motoyama
Co-orientadora: Prof^a.Dra. Eliete Neves da Silva

Brasília
Julho, 2009

SILVIA TAVEIRA ELIAS

EFEITO APOPTÓTICO DO EXTRATO BRUTO DE TABACO EM LINHAGEM DE
CARCINOMA ORAL HUMANO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 03 de agosto de 2009

BANCA EXAMINADORA

Andréa Barreto Motoyama – (presidente)
Universidade de Brasília

Nilce Santos Melo
Universidade de Brasília

Fábio Pittella Silva
Universidade de Brasília

Marie Togashi
Universidade de Brasília

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Norma, que são minha maior fonte de
inspiração e ao meu irmão, Carlos Eduardo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida a mim concedido, pelos dias vividos e por tudo que tenho construído.

Sou eternamente grata a minha família, principalmente aos meus pais e meu irmão que apesar de terem que abdicar da minha presença e convivência diária nunca deixaram de me incentivar na busca pela concretização de mais um sonho. Pelas palavras de incentivo e apoio incondicional e principalmente pelo amor dedicado a mim.

Agradeço também a profa. Andréa Barretto Motoyama pela paciência e dedicação. Por me ensinar a trabalhar em um laboratório científico e valorizar este trabalho.

Não poderia deixar de agradecer também a profa. Eliete Neves da Silva pelo aprendizado, apoio e dedicação e por ter participado da minha formação profissional desde os anos de iniciação científica. Por ser minha maior fonte de inspiração, minha grande mentora e mais do que isso, praticamente uma mãe nessa jornada que foi o mestrado.

Agradeço também aos grandes amigos que fiz aqui, Juana, Júlia, Rubens que sempre me ajudaram nos momentos difíceis, não só com palavras, mas principalmente com atitudes que me deram forças para seguir adiante com o meu trabalho.

Por último, mas não menos importante agradeço aos estagiários do Laboratório de Farmacologia Molecular, Igor, Elaine, e Layana pelas palavras sinceras e de conforto, ditas diariamente nas manhãs e tardes a qual passávamos no laboratório, dedicados a essa pesquisa.

RESUMO

O câncer é um problema mundial de saúde pública. Nas últimas décadas a incidência de câncer de cabeça e pescoço vem aumentando, sendo os países desenvolvidos os mais afetados. As terapias convencionais para este tipo de câncer, cirurgia e radioterapia, são agressivas e não aumentam de maneira considerável a qualidade e expectativa de vida dos pacientes. Nesse cenário, a descoberta de novas terapias é necessária. Esse trabalho tem como objetivo investigar o efeito citotóxico do extrato bruto de tabaco (EBT) e cinco frações provenientes dele (metanólica, neutra, carbônica, ácida e básica) em células de carcinoma oral humano. A exposição das células de câncer oral ao EBT induz a morte celular e diminui a viabilidade celular de maneira dose-dependente. Das frações testadas, apenas a neutra foi capaz de induzir uma significativa morte celular (acima de 50%) após 48 horas de tratamento. Ademais, fragmentação do DNA e ativação da caspase-3 indicam que a morte celular induzida por EBT e pela fração neutra tem natureza apoptótica. Os resultados mostram que apesar do tabaco ser um carcinógeno conhecido, possui inúmeros componentes indutores de tumor, ele também pode conter componentes capazes de induzir morte em células de câncer. Pelo fato da fração neutra ser capaz de também induzir morte celular, pode-se inferir que o componente apoptótico é apolar. Novos estudos são necessários para avaliar a estrutura química envolvida neste processo.

Palavras chaves: Câncer de boca, extrato bruto de tabaco, apoptose, caspase-3

ABSTRACT

Cancer is a public health problem worldwide. Incidences of head and neck cancer are increasing in the last decades, and the developed countries are the most affected. Current therapeutic options for this type of cancer are aggressive, including surgery and radiotherapy. In addition, they have not yet translated into an improvement of life quality or expectancy to patients. In this scenario, new therapeutics are urgently needed and actively sought after. The goal of this study was to investigate the cytotoxic effects of tobacco crude extract (TCE) and 5 fractions thereof (methanolic, neutral, carbonic, acid and basic) on a human oral squamous cell carcinoma. Exposure of oral cancer cells to TCE induced cell death and decreased cell viability in a dose-dependent manner. Out of the tested fractions, only the neutral one was able to induce significant cell death (over 50%) over the period of 48h. In addition, DNA laddering and caspase-3 activation indicate that the cell death processes induced by TCE and neutral fraction were apoptotic in nature. Our results indicate that although tobacco is a known carcinogen, possessing many tumor-initiating compounds, it could also contain compounds that are useful to induce apoptosis in cancer cells. Because the neutral fraction was also able to induce apoptosis, it is postulated that this putative compound is non-polar, although further investigation is needed to uncover its true nature and chemical structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ciclo celular.....	16
Figura 2: Representação esquemática da cascata das caspases.....	28
Figura 3: Teste de viabilidade celular.....	43
Figura 4: Avaliação do crescimento celular.....	44
Figura 5: Teste de citotoxicidade celular.....	45
Figura 6 A: Citotoxicidade das frações neutra e metanólica.....	47
Figura 6 B: Citotoxicidade das frações ácida e carbônica.....	48
Figura 7: WST	49
Figura 8: Curva dose-resposta extrato de tabaco.....	50
Figura 9: Curva dose-resposta fração neutra	51
Figura 10: Curva dose-resposta fração metanólica	52
Figura 11 : Avaliação de DNA fragmentado com EBT e suas frações..	53
Figura 12 : Western-blot (Caspase-3).....	55
Figura 13: Western-blot (PARP).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

EBT- Extrato bruto de tabaco

HPV – Papiloma vírus humano

EBV- Epstein-Barr Vírus

HBV- Vírus da hepatite B

TNM- Tumor, nódulos linfáticos, metástase

OSCC-3 – Carcinoma escamoso oral humano

OMS- Organização Mundial de Saúde

INCA- Instituto Nacional do Câncer

PCNA- Proliferador Celular e Antígeno Nuclear

5-FU- 5 fluorouracil

FdUMP.- 5-fluorodeoxiuridina monofosfato

5-FUTP- 5-fluorouridina trifosfato

Caco-2 - Células de adenocarcinoma

DU-145 - Células de câncer de próstata

KB - Carcinoma escamoso de boca

PACS- Proantocianidinas

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PAH- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

NNK e NNN- Nitrosaminas

nAChRs- Receptores acetilcolínicos nicotínicos

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

PBS- Tampão salino de fosfato

SDS- Sodium dodecylsulfate

SUMÁRIO

1 Introdução/Revisão de Literatura	12
1.1 Considerações gerais sobre o câncer de boca.....	14
1.2 Carcinogênese	15
1.3 Fatores de risco	17
1.3.1 Tabaco.....	18
1.3.2 Álcool	18
1.3.3 Vírus	19
1.3.4 Betel	20
1.3.5 Má nutrição e dieta	20
1.3.6 Profissão.....	21
1.4 Histórico familiar.....	21
1.5 Lesões cancerizáveis.....	22
1.5.1 Leucoplasia.....	23
1.5.2 Eritroplasia.....	23
1.5.3 Queilite actínica.....	24
1.6 Tratamento.....	24
1.6.1 5 Fluorouracil (5-FU)	25
1.6.2 Apoptose.....	26
1.7 Pesquisa Básica.....	28
2 Objetivos	32
3 Materiais e métodos	33
3.1 Cultura de Células.....	33
3.2 Extração e purificação do extrato e frações.....	34
3.3 Teste de viabilidade celular.....	34
3.4 Teste de citotoxicidade celular.....	35
3.5 Curva dose resposta	36
3.6 WST.....	37
3.7 Extração de DNA fragmentado	37
3.8 Western-blot	39
3.9 Análise estatística.....	41

4 Resultados	42
4.1 Análise da viabilidade celular.....	42
4.2 Análise da citotoxicidade celular.....	44
4.3 Fracionamento do extrato e citotoxicidade das suas frações.....	46
4.4 WST.....	48
4.5 Curva dose resposta extrato bruto de tabaco.....	50
4.6 Curva dose resposta frações que apresentaram resultado.....	51
4.7 Fragmentação de DNA.....	52
4.8 Western-blot	53
5 Discussão	57
6 Conclusões	60
7 Referências Bibliográficas	61

1-INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço são uma importante causa de morte no mundo todo. Dentre todos os tipos, o carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna mais freqüente na boca, constituindo cerca de 90% dos casos (1). Quase sempre o câncer de boca é precedido por lesões cancerizáveis, que podem ou não se tornarem tumores malignos.

A etiologia do câncer de cabeça e pescoço é multifatorial. Fatores genéticos, ambientais, sociais e comportamentais podem estar envolvidos (2). O fumo, o álcool e a radiação solar são os fatores de risco com maior importância relacionados ao desenvolvimento do câncer de boca. Eles provocam inúmeras alterações genéticas e o acúmulo dessas alterações resulta no câncer. Alguns vírus como o HPV (Human Papilloma Virus), EBV (Epstein-Barr Virus) e HCV (Hepatitis C Virus) também estão relacionados às neoplasias de boca (2).

O tratamento do câncer de boca é bem agressivo e depende do tipo de lesão apresentada pelo paciente. Se o tumor for pequeno (menor que 2 cm de diâmetro) e tiver a classificação TNM (tumor, nódulos linfáticos e metástase) T1 N0 M0 a cirurgia é a primeira opção de tratamento, não sendo necessárias modalidades adicionais de terapia. Para estágios mais avançados da doença é necessária uma combinação de tratamentos como a radioterapia local, quimioterapia sistêmica e cirurgia para ressecção do tumor (3). Contudo, todas as modalidades de tratamento apresentam algum tipo de efeito adverso ou seqüela.

Apesar de todos os avanços tecnológicos, a expectativa de vida para os pacientes com câncer de boca não aumentou nas últimas décadas, sendo de 50 % após 5 anos (4). Os tratamentos atuais não são totalmente eficazes e ainda trazem aos pacientes desconforto temporário e até mesmo seqüelas permanentes. Por isso faz-se necessário o estudo de novas substâncias que possam resultar em uma resposta positiva e com menores efeitos colaterais ao paciente.

O conhecimento da biologia molecular e celular do câncer de boca já mostrou ser de grande importância. Recentemente vários trabalhos (5) vêm utilizando a cultura de células do carcinoma para o desenvolvimento de pesquisas. Através da

cultura das células podemos avaliar seus mecanismos de crescimento e diferenciação, e entender melhor as alterações moleculares que levam ao aparecimento e ao crescimento de tumores orais, bem como encontrar marcadores que possam servir de fatores prognósticos, a pesquisa utilizando a cultura de células provenientes da mucosa oral tem crescido bastante.

Além disso, a ação de novas substâncias podem ser testadas (2). Historicamente, pode-se citar o exemplo do taxol e da vincristina e vimblastina, derivados, respectivamente das espécies vegetais *Taxus brevifolia* e *Vinca rosea*. Nesse sentido, a atividade anti-neoplásica de extratos naturais é constantemente revista.

As potencialidades dos usos das plantas medicinais encontram-se longe de estar esgotadas. Novos conhecimentos certamente encontrarão, no reino vegetal, soluções, por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (6).

Com o objetivo de testar a existência de compostos ativos tóxicos às células malignas da boca, foram utilizados o extrato bruto de tabaco e frações específicas do mesmo. O uso de tais frações permite separar compostos pela polaridade e solubilidade. Como modelo experimental foram utilizadas células da linhagem OSCC-3 (oral squamous cell cancer), originária de carcinoma espinocelular oral humano. O tipo de morte celular ocasionada pelos compostos também foi investigada. O extrato bruto e a fração neutra resultaram em mais de 85% de morte celular. Estudos sobre as caspases demonstraram que a mesma ocorria por vias apoptóticas.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CÂNCER DE BOCA

O câncer é, conhecidamente, um problema de saúde pública mundial. Segundos dados da OMS (Organização Mundial de Saúde) em 2005, mais de 7 milhões e 600 mil mortes foram provocadas por essa doença, e projeta-se, para os próximos anos, um aumento nesses números. A previsão para 2015 é que haja aproximadamente 9 milhões de mortes em todo o mundo devido ao câncer (7) . Nos países em desenvolvimento esses dados estatísticos são ainda mais alarmantes. Ainda segundo a OMS no ano de 2005 mais de 14% de mortes no Brasil foram provocadas pelo câncer.

Dentre os vários tipos existentes de câncer, o de boca deve ser destacado pelo número crescente de casos. Diferentemente do outros tipos, o câncer de boca tem maior incidência nos países desenvolvidos quando comparados aos países em desenvolvimento (8). No Brasil, excluindo o câncer de pele, o câncer de boca e faringe representa a quinta incidência de câncer entre os homens e a sétima entre as mulheres (9). As estimativas indicam que em 2008 houve aproximadamente 14.160 novos casos de câncer de cavidade oral sendo 10.380 em homens e 3.780 em mulheres (10). A incidência de câncer de boca no Brasil é de 2% de todos os tipos de carcinoma, uma das mais altas do mundo e significativa na América Latina (11).

Estudos epidemiológicos demonstram que a incidência de câncer de boca não é igual para todas as regiões do país. As regiões sudeste e sul apresentam os maiores índices de casos enquanto as demais regiões, centro-oeste, norte e nordeste apresentam índices menores (9). Provavelmente isso ocorre pela subnotificação de casos nas regiões mais pobres do país. Outro fator que pode explicar essa diferença na incidência são os fatores de risco como o uso de tabaco (12, 13,14).

Quando se fala em câncer de boca, na maioria das vezes estamos nos referindo ao carcinoma de células escamosas (espinocelular ou epidermóide), que é

a origem de mais de 90% de todas as manifestações malignas nessa região (15). Clinicamente, esse carcinoma pode se apresentar como uma massa exófitica, ou até mesmo ter um crescimento endófitico que se caracteriza por uma depressão ou área ulcerada de bordas entumecidas. Histologicamente pode-se notar ilhas e cordões invasivos de células epiteliais escamosas malignas, angiogênese, desmoplasia, aumento da relação núcleo-citoplasma e presença de pérolas de queratina.

A dor não é um indicador real se a lesão é ou não maligna (16). O local mais comum para o aparecimento do carcinoma intra oral é a língua, que corresponde a mais de 40% dos casos, que acometem frequentemente a borda lateral posterior e o ventre da língua. O assoalho de boca é o segundo local com maior incidência. Os locais que raramente apresentam essa patologia são gengiva, mucosa labial e palato duro (17).

1.2 CARCINOGENESE

A alta incidência do câncer nos permite inferir que o seu desenvolvimento está correlacionado a uma alteração no processo natural do corpo. O crescimento maligno está diretamente associado ao estágio final do câncer, é claramente a corrupção do mesmo mecanismo proliferativo que deu origem a trilhões de células que formaram organismo a partir de um zigoto único. A descrição concisa do câncer é: uma proliferação celular imprópria. Se em uma célula particular, no seu processo de divisão, uma transição após a outra é feita de maneira imprópria, sem nenhum tipo de repressão, o ciclo celular continua a progredir ininterruptamente, e uma massa celular é formada – o tumor. Essa é a relação básica entre o ciclo celular e o câncer (18). Outro modelo de cancerização foi proposto por Hanahan e Weinberg, para quem as células cancerígenas apresentam defeitos nos ciclos regulatórios de proliferação e homeostase encontrados nas células normais. Seis alterações essenciais são encontradas na fisiologia celular das células com crescimento maligno, sendo elas: sinais de crescimento auto-suficiente; insensibilidade aos sinais anti-crescimento; evasão a apoptose; potencial replicativo ilimitado; sustentação da angiogênese; invasão de tecidos e metástase (19).

A progressão de uma lesão benigna para a maligna é um processo genético que começa a nível celular e posteriormente a nível clínico (20). O desenvolvimento do carcinoma espinocelular de boca é geralmente precedido do desenvolvimento de múltiplas alterações genéticas, que levam uma população clonal de células ao crescimento avançado. A desregulação de oncogenes, genes supressores tumorais, alterações citogenéticas, alterações epigenéticas e mutações mitocondriais estão relacionadas ao desenvolvimento do carcinoma bucal (21).

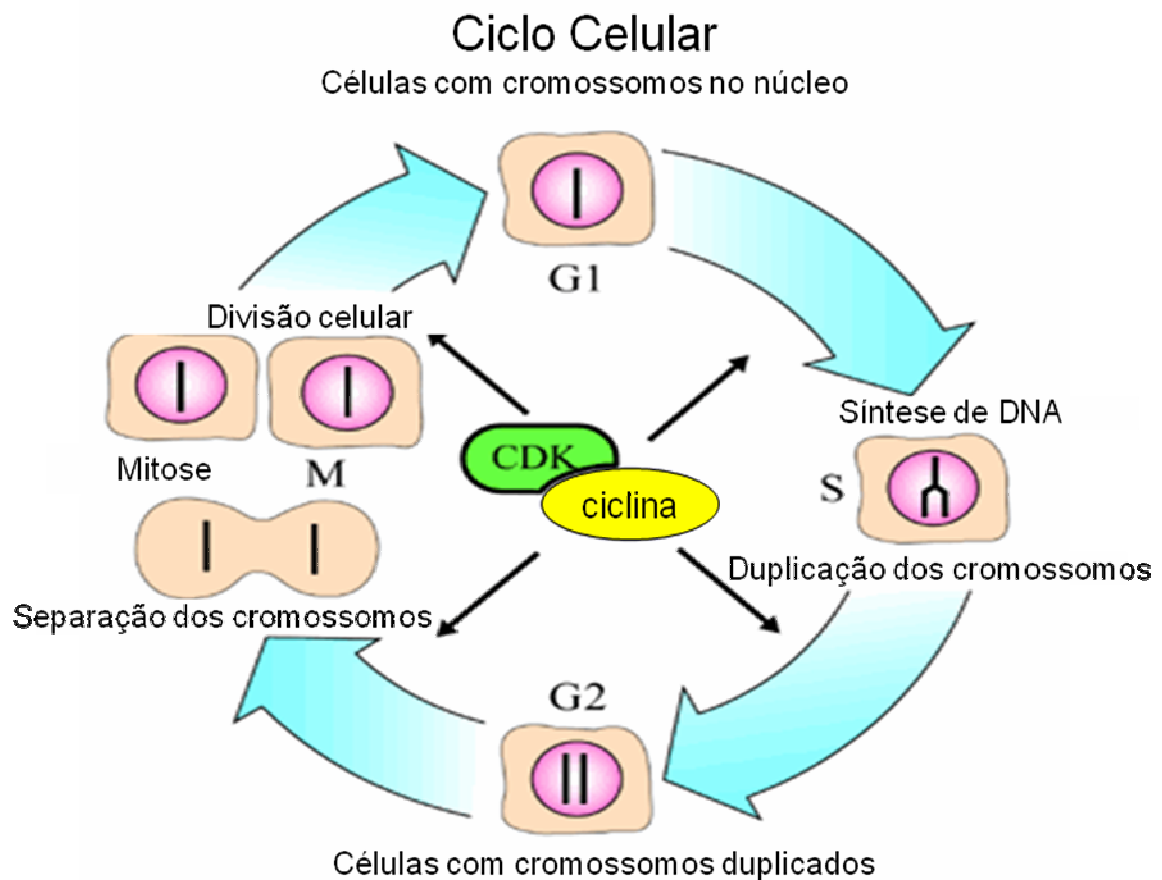


Figura 1: Representação esquemática do ciclo celular desde sua fase inicial G1, até o momento da divisão celular propriamente dita, mitose. Adaptado de http://www.spg.pt/ficheiro/conteudo/imagens/ciclo_celular.gif.

Evidências emergentes sugerem também que a exposição ao estresse induz reprogramação epigenética de algumas células e aumenta a taxa de mutação, acelerando a adaptação ao estresse ambiental (22,23). Esse aumento na taxa de mutação leva a transformação neoplásica (24).

Marcadores moleculares do câncer oral envolvendo o HPV já foram identificados em várias linhagens celulares em tumores de origem oral (24,25). A progressão e metástase envolvem a regulação positiva de oncogenes (RAs, c-myc, c-erbB2) (26), mutação, deleção e regulação negativa de genes supressores de tumor (p53 e histidina) (27,28). Quinases associadas ao ciclo celular e seus inibidores, receptores de fatores de crescimento (epidermal e insulínico), e regulação negativa de receptores nucleares (receptor ácido retinóico α e β) (29,30) também estão envolvidos na progressão tumoral. A alteração de níveis de expressão de outros marcadores celulares como proliferador celular e antígeno nuclear (PCNA), citoqueratinas, enzimas (ciclooxigenase 2), genes antiapoptóticos (família bcl), genes proangiogênicos (família VEGF) e imunomoduladores (IL-10, IL-12), estão implicados na progressão do carcinoma de células escamosas (31,32).

1.3 FATORES DE RISCO

Muitos são os fatores de risco associados ao câncer de boca. O tabaco e o álcool são reconhecidos mundialmente como os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cavidade oral e faringe (5,33). O consumo concomitante de tabaco e álcool, principalmente o uso constante e elevado dessas substâncias, é definitivamente o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer de boca.

Os principais fatores relacionados a essa patologia são o consumo de tabaco e álcool. Apesar desses serem os principais fatores de risco relacionados ao câncer de boca, eles não são os únicos. Além do uso do tabaco e do álcool, outros fatores contribuem para o aparecimento e desenvolvimento do câncer (9). Mutações genéticas, má nutrição, hereditariedade, uso de betel ou areca mascado, os vírus como o HPV (papiloma vírus humano), EBV (epsten-barr vírus), e o vírus da hepatite C, profissão e até mesmo uso de enxaguatórios bucais com álcool podem ser associados ao desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (2, 34,35,36).

1.3.1 Tabaco

Tabaco é o nome dado às plantas do gênero *Nicotiana L.* (*Solanaceae*), em particular a *N. tabacum*, originárias da América do Sul da qual é extraída a substância nicotina.

O tabaco é conhecidamente o maior fator de risco relacionado ao câncer de cabeça e pescoço. Constituintes do tabaco podem causar danos ao DNA e, conseqüentemente, levarem ao desenvolvimento do carcinoma escamoso de boca (5). Já se sabe que o risco de desenvolver câncer de boca é 6 a 9 vezes maior em pessoas que fumam. Verifica-se que quanto maior o consumo de tabaco, maior o risco de desenvolvimento do câncer, ou seja, o risco para desenvolvimento de câncer de boca em pacientes fumantes é tempo-dose-dependente. Em fumantes crônicos, por exemplo, esse risco chega a ser 17 vezes maior do que em pessoas não fumantes (16,37,38).

Existem ainda outras formas de utilização do tabaco. O tabaco mascado, muito utilizado por jogadores de beisebol nos Estados Unidos, está associado ao desenvolvimento do câncer, porém esse tipo de consumo não é comum no Brasil.

1.3.2 Álcool

O álcool é outro forte fator de risco para o câncer oral (16). Enquanto o tabaco é capaz de causar mutação celular o álcool promove proliferação celular. É comprovado que o acetaldeído, o primeiro metabólito do etanol, é cancerígeno (5). O consumo de álcool foi identificado como o maior fator de risco de câncer no trato aereodigestivo superior. Essa ligação do álcool ao câncer também está diretamente relacionada ao tipo de bebida ingerida, quanto maior o teor alcoólico maior o risco oferecido.

Um estudo na França mostrou que alcoolistas crônicos (consumo de álcool maior que 100 gramas por dia) têm seu risco de desenvolver câncer de boca e orofaringe aumentado em até 30 vezes (39).

Os diferentes tipos e formas de uso do tabaco e álcool podem caracterizar a incidência particular e os padrões de mortalidade por câncer de boca em diferentes áreas geográficas brasileiras. Porém, outros fatores de risco podem também ter efeitos específicos na incidência de câncer bucal. Particularmente entre os brasileiros, destaca-se o consumo de cachaça, um derivado popular e barato da cana de açúcar, de alto teor alcoólico. Esse produto pode ainda causar má nutrição e diminuir a imunidade favorecendo o desenvolvimento do câncer (9).

1.3.3 Vírus

Dentre todos os vírus com potencial carcinogênico, o que tem maior associação ao desenvolvimento de câncer de boca é o HPV. Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados e eles são classificados como de alto ou baixo risco de desenvolvimento para câncer de acordo com o seu potencial oncogênico. Um dos tipos que oferece maior risco é o HPV 16 que é capaz de formar complexos específicos com reguladores vitais do ciclo celular: E6, que se liga ao p53 (supressor de tumor) e induz a sua degradação; e o E7, que interage com o pRb e bloqueia a sua atividade reguladora (2). Essa desregulação resulta em uma replicação incontrolável do DNA e diminuição da atividade apoptótica, o que explica sua correlação com a carcinogênese (2).

O EBV é um membro da família dos vírus simples da herpes. Já foi estabelecido que ele participa na transformação maligna dos linfócitos B, sendo frequentemente encontrado em lesões cancerizáveis como o líquen plano e até mesmo no carcinoma espinocelular. Apesar disso a patogênese do EBV em relação ao câncer não está totalmente estabelecida (2). Pacientes com carcinoma verrucoso e escamoso muitas vezes apresentam o vírus da hepatite C (40,41) porém ainda não é possível fazer uma correlação direta desse vírus ao câncer oral.

1.3.4 Betel

Mascar betel é um hábito popular em Taiwan, Índia e alguns países do sudoeste asiático. Esse hábito é fortemente associado com a alta incidência de leucoplasia, fibrose submucosa oral e câncer de boca (42,43,44,45).

O betel consiste basicamente da noz de areca (*Areca catechu*), pimenta de betel (“betel pepper”), pasta de lima e tabaco. Apesar dessa ser a composição básica do betel, esses componentes podem mudar de acordo com a região geográfica (46). A aerocolina, principal alcalóide encontrado no betel, tem efeito citotóxico, genotóxico, e mutagênico em vários tipos celulares (47). Seu mecanismo de ação na biologia celular ainda não foi definido com clareza, sendo ainda necessários estudos para tanto. A aerocolina é capaz de inibir o crescimento celular da linhagem epitelial KB mantendo o ciclo celular nas fases S e G2/M, o que provoca apoptose celular quando utilizada de maneira prolongada. As alterações provocadas por essa substância em diferentes proteínas do ciclo celular podem ser cruciais para o papel do betel na carcinogênese oral (47).

1.3.5 Má nutrição e dieta

Pessoas com má nutrição tendem a ter câncer, provavelmente porque a falta de nutrientes pode levar a uma queda no sistema imunológico, principal defesa do organismo contra todas as patologias (8). No entanto, não é possível dizer com clareza quais nutrientes específicos são responsáveis por essa associação. Acredita-se que o consumo de frutas e vegetais verdes confira um certo efeito protetor (9). O consumo de alimentos ricos em licopeno, como o tomate, também pode conferir certo grau de proteção, por suprimir a expressão de proteínas envolvidas com a proliferação celular (48).

Enquanto esses alimentos parecem ter ação protetora contra o câncer de boca, um estudo realizado em cidades do sudeste brasileiro indicou que o consumo exagerado de carne vermelha leva a um aumento no risco de desenvolver câncer de boca e faringe. Nenhuma relação entre o consumo de café e o surgimento de câncer

foi encontrada porém, o consumo de chimarrão, uma infusão de erva mate, tomada em temperatura muito quente, e que é bastante comum na Argentina, Uruguai, Paraguai e sul do Brasil, pode ter relação com esse tipo de câncer (49).

1.3.6 Profissão

A ocupação profissional também está diretamente relacionada ao desenvolvimento de câncer de boca. Pessoas expostas à radiação solar sem proteção, como protetores solares ou até mesmo chapéu tem maior tendência a desenvolver tanto câncer de pele, quanto câncer de boca (lábio). Trabalhadores rurais e donas de casa são os principais atingidos por essa patologia, provavelmente pela uma maior exposição desprotegida aos raios solares (4).

1.4 HISTÓRICO FAMILIAR

A relação de herança familiar é vista em vários tipos de câncer. Estudos demonstram que famílias que apresentam histórico de câncer tendem a ter um risco maior para desenvolvimento de um novo câncer (50).

Um estudo caso-controle feito no Brasil mostrou que há um risco aumentado para desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço para pessoas que tem um histórico de qualquer tipo de câncer na família. Se na mesma família existir um caso de câncer de cabeça e pescoço anterior esse risco é ainda maior (51). Porém, não se pode atribuir à maior incidência de câncer bucal em pessoas em cujas famílias já se encontra um afetado, pois muitas vezes, hábitos correlacionados aos fatores de risco (como fumar e beber) são transmitidos socialmente por gerações anteriores.

Polimorfismos genéticos têm um importante envolvimento no processo de vários carcinogênicos presentes no tabaco e álcool. O citocromo P450 2E1 (CYP2E) é uma enzima secundária que pode metabolizar o etanol. A glutathione S-transferase (GST)

está envolvida na desintoxicação dos epóxidos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A variação da habilidade individual para metabolizar tóxicos pode estar ligada a mutação desses genes em populações diferentes (9). Outro estudo revelou que os genótipos GSTM1 e a deleção do GSTT1 são mais freqüentes em pacientes com câncer de cabeça e pescoço do que nos controles com pessoas que não apresentavam câncer (52). A presença do genótipo mutante CYP2E1 também é maior em pacientes com câncer de boca do que nos controles. Esses genótipos podem ser transmitidos as gerações subseqüentes aumentando assim o risco de desenvolvimento de câncer.

1.5 LESÕES CANCERIZÁVEIS

Muitos cânceres começam em mucosa aparentemente normal, mas alguns deles são precedidos por lesões pré-malignas que são clinicamente detectáveis. Por lesão cancerizável entende-se um tecido morfológicamente alterado no qual o câncer tem maior probabilidade de ocorrer do que em outro local aparentemente normal (53).

As principais lesões que podem preceder o câncer são: eritroplasia (área vermelha), leucoplasia (área branca), e eritroleucoplasia (área mista vermelha e branca). Basicamente essas lesões podem ser divididas apenas pelo seu aspecto clínico em lesões brancas ou vermelhas ou então brancas e vermelhas (54).

Apesar das lesões brancas serem o tipo de lesão mais comum, as lesões vermelhas tem um potencial maligno maior, por isso é necessário que o cirurgião-dentista esteja sempre atento a esse tipo de achado (54). O acompanhamento dessas lesões implica no diagnóstico prévio de um carcinoma e conseqüentemente em um tratamento menos agressivo e mais conservador para o paciente, além de uma sobrevida melhor e aumento na expectativa de vida. Outras lesões como líquen plano erosivo, glossite sífilítica, fibrose submucosa e lúpus eritematoso discóide também podem preceder um carcinoma (5,55).

1.5.1 Leucoplasia

Leucoplasia é definida comumente como uma lesão predominantemente branca da mucosa oral que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como qualquer outra lesão (56), sendo o diagnóstico, então, feito por exclusão. Assim, não há uma conotação histológica nesse termo e a presença de leucoplasia nem sempre implica em um potencial maligno.

A característica branca é provocada por uma hiperqueratinização da mucosa. A causa de muitas leucoplasias é idiopática, mas grande parte delas são precedidas por irritação crônica ou alguns agentes etiológicos como, por exemplo, o consumo de tabaco e álcool (maiores indutores da leucoplasia) (55).

Clinicamente as lesões podem ser divididas em dois grupos principais. O mais comum são as placas brancas uniformes (leucoplasia homogênea), prevalentes na mucosa bucal e que tem um potencial maligno baixo. O outro grupo é a leucoplasia heterogênea ou eritroleucoplasia, que consiste em placas brancas ou nódulos esbranquiçados em uma área avermelhada da mucosa (16). Uma grande porcentagem das leucoplasias regridem espontaneamente desde que o fator causal, fumo, seja removido. As áreas esbranquiçadas restantes ou mais acentuadas podem ser removidas cirurgicamente ou acompanhadas.

1.5.2 Eritroplasia

A lesão eritroplásica caracteriza-se como placas vermelhas aveludadas que, em pelo menos 85% dos casos apresenta displasia severa. Esse tipo de lesão é rara, afeta pacientes de ambos os sexos por volta da sexta ou sétima décadas de vida e envolve tipicamente o assoalho de boca, ventre da língua ou o palato mole. Diferentemente da leucoplasia, a eritroplasia não forma placas mais sim uma depressão que circunda a mucosa. A grande importância desse tipo de lesão é que, na maioria dos casos ela já é um carcinoma, ou carcinoma *in-situ* ou pelo menos apresenta severa displasia, o que faz dela uma lesão muito mais perigosa do que as lesões brancas (16, 55)

1.5.3 Queilite actínica

A queilite actínica é uma lesão potencialmente maligna, que ocorre no lábio inferior em razão de exposição solar prolongada. Afeta, principalmente, homens de pele clara, com idade variando entre 40 e 80 anos (56). O predomínio dessa lesão pelo sexo masculino se deve ao fato de que muitos homens trabalham, por períodos longos, sob exposição solar, sendo o lábio inferior mais afetado em razão de sua anatomia. Acredita-se que as mulheres, ao usarem batom, protegem seus lábios contra os raios solares, evitando a doença. Não há hoje na literatura uma estimativa precisa sobre a transformação maligna a partir de queilite actínica. Para evitar que a ocorrência da mesma, recomenda-se o tratamento quando identificadas tais lesões. Em alguns casos, principalmente naqueles em que o quadro histológico não demonstra atipia epitelial, pode-se optar pelo tratamento conservador, ou seja, indicar uso de chapéus e filtro solar labial quando houver exposição ao sol, associado a consultas de controle periódico. Quando no quadro histológico forem evidenciadas alterações do tipo atipia epitelial, a remoção total da lesão faz-se necessária.

1.6 TRATAMENTO

Várias são as modalidades de tratamento para o câncer bucal, mas o que se constata é que nenhuma delas é totalmente eficaz (57). O avanço nessas técnicas não foi capaz de aumentar, ao longo das últimas décadas, a expectativa de vida, que permanece ao redor de 50% 5 anos após diagnóstico, para os pacientes com esse tipo de tumor (58). Além disso todas as terapias trazem consigo uma série de efeitos adversos. A abordagem cirúrgica para o controle do câncer inclui a remoção do tecido maligno e normal adjacente para tentar remover todas as células cancerígenas. Por ser uma cirurgia extensa ela geralmente causa alterações funcionais e estéticas nos pacientes. A radioterapia é o tratamento que causa o maior número de efeitos adversos como alterações mucocutâneas, perda do paladar, xerostomia, osteoradionecrose e necrose dos tecidos moles. Cáries

dentárias, candidose e dificuldade na nutrição podem ocorrer principalmente devido a xerostomia induzida pela radiação (59). Comumente, a quimioterapia induz a mucosite bucal e uma série de outros efeitos adversos (59). Esses efeitos são desconfortáveis e diminuem a qualidade de vida dos pacientes.

A terapia do câncer de boca não é sempre satisfatória, e depende muito da sua classificação TNM. Em estágios iniciais (I e II) o câncer pode ser curado com cirurgia ou radioterapia, sendo que esses tratamentos não tem que ser conjugados. No entanto, em casos mais avançados (estágios III e IV) o tratamento constitui-se geralmente de cirurgia seguida de radioterapia (60). Tal terapêutica é bem agressiva e muitas vezes até mutilante. A radioterapia, por sua vez, causa vários efeitos adversos (59). Ultimamente o tratamento com quimioterapia seguido por radioterapia vem sendo utilizado com boas taxas de sucesso (61).

O objetivo da cura com o tratamento quimioterápico é raramente encontrado em pacientes com malignidades epiteliais avançadas. Resistência às drogas convencionais usadas separadas ou em conjunto e falta de seletividade terapêutica são um obstáculo a terapia curativa (62). Durante as últimas duas décadas a quimioterapia teve um papel substancial no tratamento do câncer oral. Os efeitos benéficos desse tipo de tratamento nos pacientes com carcinoma escamoso avançado de cabeça e pescoço foi demonstrado por metanálises, especialmente quando os agentes citotóxicos são combinados a radioterapia (63). O tratamento quimioterápico em conjunto com o radioterápico, de forma neoadjuvante ou concomitante, pode aumentar a sobrevida dos pacientes de 8 a 11%. Essa evolução é idade-dependente não sendo observada de maneira significativa em pacientes maiores de 70 anos (64).

Os principais agentes quimioterápicos utilizados para esse tipo de câncer são o 5-fluorouracil (5-FU) e a cisplatina (65).

1.6.1 5 Fluorouracil (5-FU)

O quimioterápico 5-fluorouracil é um dos agentes anti-neoplásicos mais utilizados mundialmente na terapia de câncer de cabeça e pescoço (67). Essa

substância tem ação específica na cascata regulatória do ciclo celular e com isso induz a morte por apoptose nas células cancerígenas. Seu maior mecanismo de citotoxicidade é a interrupção da síntese de DNA através do bloqueio da timidilato sintetase (67,68). O 5-FU exerce seu efeito nas células em proliferação da seguinte maneira: ele é inicialmente metabolizado nas células em 5-fluoroexiuridina monofosfato (FdUMP). FdUMP faz uma ligação covalente com a sintase de dTMP e inibe a síntese de DNA esgotando o dMTP celular. O 5-FU também é metabolizado em 5-fluorouridina trifosfato (FUTP), que é incorporada ao RNA. Esses metabólitos do 5-FU são responsáveis pela atividade anti-neoplásica dessa substância em modelos tumorais experimentais. Pelo seu modo de ação o 5-FU é um agente anti-neoplásico ciclo celular-específico e seu efeito é dependente da sua concentração e tempo de tratamento. A inibição da síntese de DNA é manifestada na fase S do ciclo celular e a incorporação desse quimioterápico ao RNA ocorre na fase G1(69).

Sendo a citotoxicidade direta ao DNA expressa na fase S, o 5-FU exibe uma potente ação em tratamentos longos, mesmo em doses baixas. A citotoxicidade ao DNA ou RNA resulta em desaparecimento da fase inicial S e acúmulo na fase G1/S. A indução prolongada da fase G1/S leva a alterações no p21, ciclinas D1 e E e aumento da ligação do p21 ao CDK4 (quinase ciclina-dependente 4) em linhagens de câncer oral. Nenhuma mudança na expressão do p53 foi notada experimentalmente com o tratamento com 5-FU (69).

1.6.2 Apoptose

O objetivo maior dos agentes anti-neoplásicos convencionais (quimioterápicos) ou não (extratos, “garrafadas”, chás caseiros) é a indução de morte celular nas células malignas. Atualmente, sabe-se que existem dois tipos de morte celular, a apoptose e a necrose, que apresentam profundas diferenças morfológicas e biológicas, sendo que a de interesse terapêutico no câncer é a primeira.

A apoptose, ou, morte celular programada (auto-destruição celular que ocorre de forma ordenada e demanda energia), é uma via que, uma vez que a célula tomou a decisão de cometer o suicídio, não há mais como regredir (70). A desregulação da

apoptose leva a uma variedade de patologias humanas dentre as quais podemos incluir o câncer, doenças auto-imunes e desordens neurodegenerativas (71). A apoptose ocorre por meio de dois processos básicos duas vias proteolíticas independentes porém interconectadas (explicadas abaixo), que tem o objetivo de ativar o efetor (também chamado de executor), que irá iniciar o processo de auto-destruição, propriamente dita. Isso é feito pela ação de proteases que são capazes de clivar proteínas celulares desencadeando eventos bioquímicos que culminam na morte celular. As proteases que transmitem a via apoptótica são membros da família das caspases (70). Caspases são os componentes centrais da resposta apoptótica (72,73).

Até hoje foram descobertas pelo menos 14 caspases, destas 11 são da espécie humana. As caspases apoptóticas são divididas geralmente em duas classes: as caspases iniciadoras, que incluem as caspases 2, 8, 9 e 10 nos mamíferos e Dronc e Dredd nas moscas de fruta; e as caspases efetoras, que incluem as caspases 3,6,7 nos mamíferos e Drice, Decay, Damm, Dcpl e Strica nas moscas de fruta (74).

Nos mamíferos a apoptose pode ter duas vias de iniciação (via intrínseca e extrínseca), sendo a seleção realizada de acordo com a natureza do estímulo de morte. A via intrínseca é desencadeada em resposta a um estímulo de morte próprio, que é gerado juntamente com a célula, como a ativação de um oncogene ou danos ao DNA (74). A inativação dessa via geralmente é lembrada como um marco para o desenvolvimento e progressão do câncer (74). Já a via extrínseca é iniciada pela ação de um ligante extracelular “de morte”, ao receptor de “morte” da superfície celular. Os ligantes de morte são constituintes homotriméricos, que quando ligados aos receptores formam um complexo ligante-receptor que recruta fatores citosólicos e a própria caspase 8. Após ser recrutada, a caspase iniciadora 8 é ativada e, ao clivar outras caspases, como a caspase efetora 3, dá início à sinalização que culminará na morte celular (76).

A via intrínseca é mediada por mitocôndrias e, em resposta a um estímulo apoptótico, muitas proteínas são lançadas para a região intermembrana da mitocôndria no citoplasma. Esses sinais apoptóticos intrínsecos ativam sua caspase iniciadora que é a caspase 9. Na via extrínseca as caspases iniciadoras são a 8 e 10. Uma vez ativada essas caspases ativam as caspases efetoras que são as

caspsas 3 e 7. Estas últimas são responsáveis pela clivagem dos substratos que provocam a morte celular propriamente dita (70).

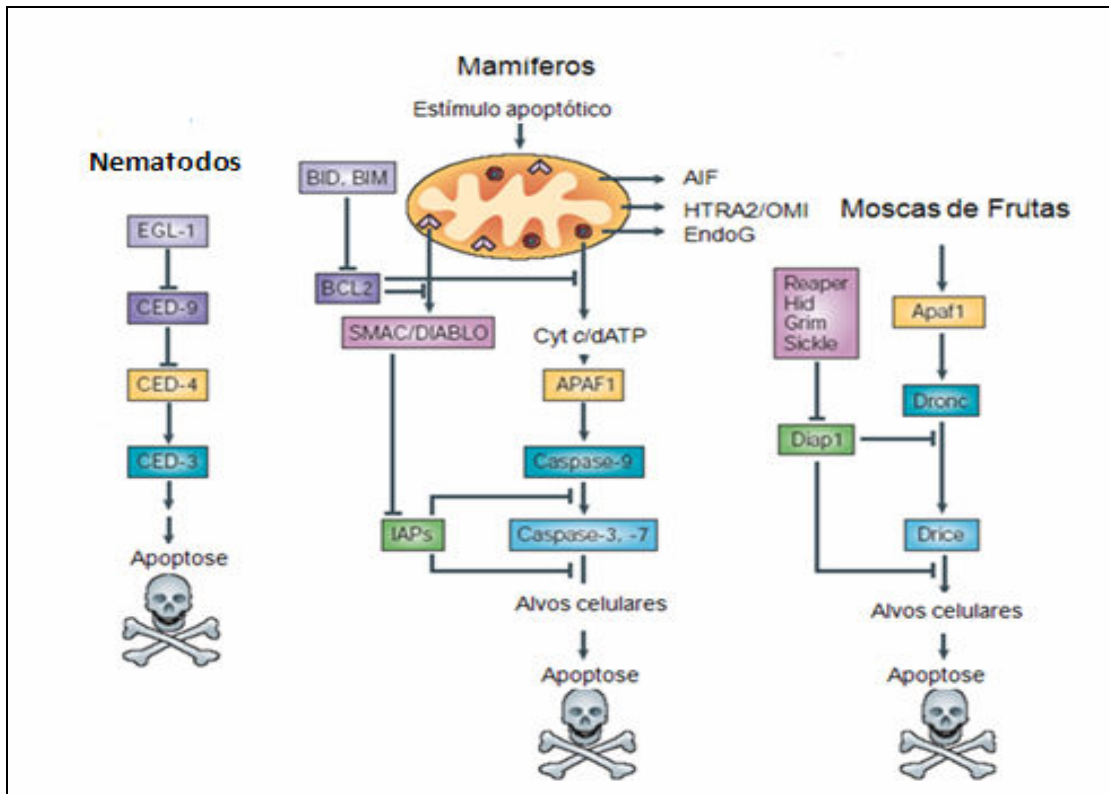


Figura 2: Representação esquemática da cascata das caspases que estão envolvidas no processo de morte celular denominado como apoptose. Figura adaptada de Riedl,SJ; Shi,Yigong, 2004 (74)

1.7 PESQUISA BÁSICA

Muitas das drogas usadas atualmente são compostos extraídos de plantas ou de seus produtos como frutas, casca ou semente (76). As plantas são utilizadas para encontrar uma alternativa terapêutica para o manejo do câncer tanto fornecendo um

composto ativo, bem como servindo de ferramenta de entendimento da biologia dos tumores. Elas podem ainda ser utilizadas como fator preventivo ao aparecimento/desenvolvimento do câncer, quando consumidas regularmente, como no caso das frutas e vegetais.

A importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas é reconhecida (76).

Recentemente a busca por fitosubstâncias, e os estudos sobre seus efeitos benéficos tem aumentado. Frutas como o Kiwi (fruto de *Actinidia deliciosa*) têm sido estudadas na busca por novas terapias. O extrato de Kiwi e suas frações demonstraram ter atividade anti-neoplásica e antibacteriana (77). Extrato de *Geum qellyon*, uma erva da família das Rosáceas, mostrou ter efeito anti-neoplásico em células Caco-2 (células de adenocarcinoma), DU-145 (células de câncer de próstata) e KB (carcinoma escamoso de boca), e isso se deve ao seu potencial antioxidante (78). O extrato de *Ginkgo biloba* também é capaz de induzir a apoptose, através da ativação da caspase 3, em células de câncer da cavidade oral de forma tempo-dose-dependente (79).

As proantocianidinas (Pacs) são componentes polifenólicos de alta concentração em algumas frutas e nozes presentes na nossa dieta como as uvas, amoras, amêndoas, o cacau, feijão e até mesmo no chocolate. As Pacs pertencem a uma abundante classe de componentes derivados de plantas, flavonóides, que parecem ter muitos efeitos benéficos a saúde, principalmente por sua propriedade antioxidativa. Ele exibe citotoxicidade seletiva contra alguns tipos de câncer como o de mama, pulmão, próstata e carcinoma gástrico (80,81). Extratos de casca e semente de uva e framboesa preta têm alta concentração de proantocianidinas e são capazes de promover uma supressão tumorigênica seletiva em câncer oral, principalmente em carcinoma de células escamosas orais (OSCC) (82,83).

O efeito quimioprotetor dos carotenóides também já foi estudado. Os carotenóides são indicados como fortes protetores celulares contra espécies de oxigênio reativas (radicais livres) (48). Os carotenóides são fitoquímicos fitotrópicos comuns na natureza, e tem o poder de prevenir o câncer interferindo na expressão de proteínas no ciclo celular. Um estudo confirmou que os carotenóides apresentam várias atividades como supressão de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e ciclina D1 na proliferação celular. Essas observações sugerem que os carotenóides tem atividade anti-neoplásica (48).

Assim como alguns vegetais e frutas são estudados, a atividade de compostos do cigarro, principal causador do câncer de boca, como a nicotina também foi avaliada. A nicotina é o maior componente do tabaco. Ela é capaz de inibir a apoptose em uma variedade de tipos celulares, e essa atividade anti-apoptótica pode ser a grande responsável pela carcinogênese induzida pelo tabaco (84). Outras pesquisas comprovaram que nicotina é capaz de inibir a apoptose induzida por diversos estímulos como o fator de necrose tumoral, luz UV e drogas quimioterapêuticas em linhagens de câncer de diversas origens (85). A inibição da apoptose causada pela exposição crônica a nicotina, pode resultar em um acúmulo de células com DNA danificado o que levaria ao desenvolvimento e progressão do câncer. PAH (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), NNK e NNN (nitrosaminas) são os carcinogênicos mais fortes e podem causar câncer de boca em usuários de tabaco fumado. Em modelos animais quando administrados de maneira conjunta esses carcinógenos induzem tumor oral em ratos . Mesmo com todos os estudos é difícil dizer que produtos específicos do tabaco induzem um tipo particular de câncer, para isso mais estudos com os carcinógenos, análises dos seus produtos e análises bioquímicas e moleculares ainda são necessárias (33).

O tabaco fumado (cigarro) é uma mistura complexa de muitos componentes químicos diferentes. Esses componentes podem tanto induzir a apoptose quanto inibi-la (91). Mais de 60 carcinogênicos foram encontrados no cigarro, também existem carcinógenos no tabaco que não é fumado, porem o número desses carcinógenos é menor porque a maioria deles é formada durante a combustão. Dentre os componentes que tem maior potencial carcinogênico podemos destacar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e as nitrosaminas derivadas da nicotina, suas interações com os metabólitos do DNA são as principais causas da indução do câncer (86).

A nicotina é reconhecida como a maior causa das doenças cardiovasculares em fumantes, seus efeitos neurobiológicos e psicológicos estão associados a dependência e aumento no consumo do cigarro. Todos esses efeitos provocados pela nicotina no organismo são mediados pelos receptores acetilcolínicos nicotínicos, que estão localizados no sistema nervoso central e periférico. O agonista fisiológico dos receptores acetilcolínicos nicotínicos (nAChRs) é a acetilcolina. A nicotina é capaz de se ligar ao receptor através da subunidade α dos nAChRs, o que resulta em mudanças conformacionais dos receptores abrindo canais intracelulares

que permitem o influxo de diferentes cátions como K^+ , Na^+ , e Ca^{2+} . Todos esses eventos são capazes de ativar a caspase intracelular ligada a regulação da proliferação, apoptose, migração e diferenciação. A expressão dos nAChRs tem uma regulação positiva em pessoas expostas a nicotina de maneira crônica, o que pode levar ao desenvolvimento da maior parte dos cânceres humanos (86).

O extrato aquoso de tabaco é capaz de induzir a apoptose em uma linhagem de carcinoma oral de hamsters (87). Outros estudos mostraram que taninos e ligninas, constituintes do tabaco fumado provocam quebras no DNA. Isso pode ser o fator responsável pela apoptose provocada por essa substância (87,88). A influência da nicotina na apoptose ainda não está totalmente elucidada. Um milimolar de nicotina é capaz de inibir significativamente a apoptose induzida pelo extrato de tabaco nas células orais. A exposição à nicotina isoladamente não tem nenhum efeito na apoptose, mas a nicotina é capaz de inibir a apoptose induzida por agentes presentes no extrato de tabaco.

Adicionalmente, outro trabalho (91) sugeriu que a ação anti-apoptótica da nicotina parece estar associada especialmente com a regulação negativa da produção de óxido nítrico. Embora os resultados sejam interessantes, o cabe ressaltar que a pesquisa foi realizada em células de murinos. Em conjunto, resultados obtidos com tabaco e nicotina sugerem que componentes comumente encontrados no tabaco podem ter ações antagônicas, sendo anti-apoptóticos como a própria nicotina, ou pró-apoptóticos, como as nitrosaminas. Especula-se que a ação combinada dos mesmos é o que leva ao aparecimento de tumores. Estudos mais detalhados ainda são necessários para o entendimento completo dos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese desencadeada pelo tabaco.

Outros estudos em linhagem celular humana podem comprovar esses resultados. Um passo importante para a pesquisa básica seria a continuidade desses estudos em pacientes, só assim pode-se avaliar com precisão a ação desse extrato em carcinomas orais humanos, a dose-resposta para a ação do extrato e o tempo de ação deste.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a existência de atividade citotóxica do extrato bruto de tabaco e suas frações em uma linhagem de carcinoma oral humano, OSCC-3 e identificar sua via de ação.

Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica do extrato bruto de tabaco na linhagem OSCC-3;
- Avaliar a atividade citotóxica das frações de extrato de tabaco na linhagem OSCC-3;
- Identificar a dose necessária do extrato bruto de tabaco capaz de induzir a morte celular da linhagem;
- Avaliar a ação de cinco frações (metanólica, neutra, carbônica, ácida e básica) na linhagem OSCC-3 de carcinoma oral humano;
- Caracterizar o perfil de morte celular induzido pelo extrato bruto de tabaco na linhagem OSCC-3;
- Identificar a(s) via(s) envolvida no processo em caso de morte celular induzida pelo extrato bruto de tabaco;

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

Para todos os experimentos foi utilizada a linhagem celular OSCC-3, tipo de linhagem celular secundária de carcinoma escamoso oral humano, ou produtos derivados dela como proteínas e DNA. Essa linhagem foi cedida pelo Prof. Dr. Márcio Poças, do Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. O extrato bruto de tabaco, e suas respectivas frações foram cedidas pelo Prof. Dr. Esteban Ferro, da Universidade Nacional do Paraguai.

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Para o cultivo celular, utilizou-se o meio Dulbelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) acrescido com soro fetal bovino a 10% e antibióticos penicilina e estreptomicina nas concentrações finais de 100ng/mL e 1ug/mL, respectivamente. O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,2um e mantido a 4°C, sendo aquecido em banho-maria a 37°C por aproximadamente 5 minutos, antes do uso. A cultura de células utilizada na pesquisa foi a OSCC3 (oral squamous cell cancer-carcinoma de células escamosas orais), um tipo de linhagem secundária derivada de carcinoma escamoso bucal humano que é bastante representativa para câncer de boca, já que o carcinoma escamoso representa 90% dos casos de câncer bucal. As culturas de células OSCC-3 foram mantidas no meio acima descrito em incubadora à temperatura constante de 37° C e 5% de CO₂, sendo repicadas duas vezes por semana.

Para o repique, o meio de cultivo foi descartado, e as células lavadas uma vez com PBS 1X pré-aquecido, sendo em seguida tratadas com solução de tripsina 0,25% acrescida de EDTA 5%, por 2 minutos, a 37° C. Após o desprendimento das células da placa de cultivo por digestão enzimática, a tripsina foi inativada por adição de 5 ml de meio de cultura completo. As células foram coletadas por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e o pellet de células ressuspendido em meio de cultivo completo. Dessa solução, foram utilizados 10ul para a contagem de células na câmara de Neubauer, sob microscópio óptico invertido. O número total de células foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Número de células por ml} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células em 4 quadrantes} \times \text{Fator de diluição da suspensão de células} \times 10^4}{4}$$

3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES

Nicotiniana tabacum foi coletada do Jardim Botânico da Universidade Nacional do Paraguai, e a amostra armazenada. As folhas passaram por processo de secagem a 37° C por 4 dias e submetidas a extração em etanol 100%. O resultado da extração foi seco em vácuo e a massa posteriormente diluída em colunas de purificação com os solventes apropriados para gerar as frações metanólica, neutra, carbônica, ácida e básica.

3.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células tratadas com extrato bruto de tabaco foi testada utilizando-se o teste de exclusão do azul tripan. Tal corante tem a capacidade de penetrar as células inviáveis, deixando-as azuis sob observação ao microscópio óptico. As células viáveis, por sua vez, não são coradas. Para o teste de viabilidade celular, foram utilizadas 2×10^5 células por poço, em placas de 6 poços. Após a aderência das células (intervalo mínimo de 12h), elas foram incubadas com 500 ug/ml de extrato bruto de tabaco por 24h. Como controles negativos, utilizaram-se tratamentos com igual volume de solvente (DMSO:etanol, 2:3), ou com apenas meio completo de cultivo. Cada solução foi testada em triplicata, e o experimento foi repetido pelo menos 3 vezes. Após 24 horas de tratamento, as células foram coradas com tripan azul e contadas em uma câmara de Neubauer, aplicando-se a

fórmula descrita acima. Em detalhes, o meio de cultivo contendo as células não-aderidas foi recolhido em um tubo falcon de 15 ml. Os poços foram lavados com 2 ml de PBS, os quais também foram recolhidos no mesmo tubo falcon correspondente a cada poço. As células então passaram pelo processo de digestão enzimática com tripsina (500ul da solução descrita acima), por aproximadamente 2 minutos, a qual foi inativada pela adição de 1,5 ml de meio de cultivo completo, sendo toda a solução (tripsina + meio) recolhida e armazenada no tubo falcon. O pellet celular foi obtido por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e após descarte do sobrenadante, foi ressuspensionado em 4ml de PBS e novamente submetido à centrifugação. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensionadas em 250ul de corante azul tripan (0,04% em solução salina). Dez microlitros da solução de células ressuspensionadas em azul tripan são colocados em uma câmara de Neubauer e é feita a contagem de células viáveis (translúcidas) e não viáveis (azuis). O mesmo procedimento foi repetido após 48 horas de tratamento. Para a contagem de células, a permanência das mesmas em solução corante foi por tempo inferior a 10 minutos, para evitar coloração inespecífica. A porcentagem de células viáveis em cada poço contendo cada um dos tratamentos, após 24 e 48h, foi obtida pelo cálculo:

Total de células viáveis = total de células translúcidas X 100/ (total de células translúcidas + total de células azuis)

3.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE CELULAR

A porcentagem de morte celular ocasionada pelo tratamento com o extrato bruto de tabaco ou com suas frações foi aferida pelo teste colorimétrico de citotoxicidade, utilizando-se cristal violeta. Para tanto, as células foram cultivadas a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 24 poços. Vinte e quatro horas após plaqueamento, as células foram tratadas com meio de cultivo (DMEM) sozinho, ou acrescido de: solvente 1 (DMSO:etanol, 2:3), solvente 2 (etanol 95%), extrato bruto de tabaco, ou frações HCl, NaOH, NaHCO₃, neutra e metanólica. Tanto o extrato de tabaco quanto suas frações foram utilizados na concentração de

500 ug/ml, e o tratamento efetuado por 24 h e 48h. Para o processo de coloração com cristal violeta, o meio de cultivo foi descartado e as células aderentes lavadas com 1 ml de PBS, e fixadas com 500 ul de metanol/poço por 20 minutos. O metanol foi descartado e os poços lavados novamente com 1 ml de PBS. A coloração foi realizada com 250 ul de solução de cristal violeta (0,2% em PBS) por 5 min, ao final dos quais, o corante foi descartado e as células extensivamente (5 a 7 vezes) lavadas com PBS. Para a quantificação de células viáveis após os tratamentos, as células coradas foram recuperadas com 250 ul de tampão composto por citrato de sódio 1% e etanol (50%). A solução contendo as células recuperadas foi armazenada em uma cuveta de poliestireno e o volume complementado com tampão de recuperação para 1 mL. A absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro de luz UV (UV-1601 Shimadzu) à 570 nm, sendo a absorbância obtida com o respectivo solvente considerada como 100% de viabilidade para o tratamento considerado.

3.5 CURVA DOSE RESPOSTA

A fim de determinar se a resposta citotóxica seria dose-dependente, foram feitas curvas dose-resposta de citotoxicidade de células tratadas com concentrações decrescentes de extrato ou frações (500, 250, 100, 50, 10, 0 ug/mL). Após 24h de tratamento, as células viáveis remanescentes na placa de cultivo foram coradas com cristal violeta e a absorbância a 570nm medida em espectrofotômetro. A concentração de “zero” ug/mL (adição de solvente, apenas) do extrato ou fração foi considerada 100% de viabilidade. Para cada concentração foi adicionado volume de solvente de forma que o volume final fosse sempre equivalente àquele utilizado na maior concentração de extrato.

3.6 WST – ENSAIO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Este experimento utilizou placas de 96 poços. A concentração de células utilizada foi de 3×10^3 células por poço. Assim como nos experimentos citados anteriormente após serem plaqueadas as células são mantidas em condições ideais por 24 horas. Após esse tempo as células foram tratadas com DMEM, solvente 1 e 2 e frações do extrato de tabaco (ácida, básica, carbônica, neutra e metanólica) nas seguintes concentrações: 500, 250, 100, 50, 10, 0 e $\mu\text{g/mL}$. As células foram recolocadas na incubadora, onde permaneceram por 24 ou 48 horas. Após incubação tempo as placas foram retiradas da incubadora e em cada poço foi acrescentado 10 μl do substrato tetrazólio, que sofreu redução a formazan, pela ação das enzimas mitocondriais. A absorbância foi medida em uma leitora de microplaca (thermo plate TP reader) a 450nm. A citotoxicidade celular foi calculada comparando-se a absorbância dos tratamentos com a absorbância de cada solvente.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA FRAGMENTADO

As células OSCC-3 foram plaqueadas na concentração de $1,2 \times 10^6$ células por placa, em placas de 10 cm. Após 24 horas de incubação em condições ideais, foi feito o tratamento das células com: meio (DMEM), solvente 1 (DMSO/etanol), solvente 2 (etanol), quimioterápico estaurosporina (concentração de escolha 200nm), quimioterápico 5-FU (25mg/ml), extrato de tabaco, fração neutra, fração NaOH e fração NaHCO_3 . Tanto o extrato quanto as frações estavam na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$. Os quimioterápicos funcionaram como controle positivo, e os solventes como controle negativo. As células com os tratamentos foram incubadas por 48 horas, e passado esse tempo, foi realizada a extração de DNA propriamente dita.

As placas foram retiradas da incubadora, mantidas em gelo para manipulação e o meio de cultura em que elas estavam foi coletado e armazenado em um tubo falcon de 15 ml. As células foram lavadas com 5mL de PBS e este foi recolhido e colocado no mesmo tubo em que estava o meio. Após centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 200 ul de tampão de lise (0,5M EDTA; 1M TrisCl ph 8,0; Triton X 100%, SDS 20%; água destilada para completar o volume), em um tubo eppendorf. Para cada placa, foram acrescentados 60 uL do tampão de lise, e com uma ponteira nova e limpa foi feita a fricção dessa placa, para desprender e lisar as células que ainda estavam aderidas à placa. A suspensão assim obtida foi recolhida e armazenada no tubo eppendorf correspondente ao tratamento, sendo então incubada em gelo por 20 minutos. Em seguida, foi feita a centrifugação a 14.000 rpm, 4° C por 2° minutos, para descarte de debris celulares. Ao sobrenadante foi adicionada RNase A na concentração final de 0,5 mg/ml e a solução, este foi incubado a 37°C por 30 minutos. Após incubação, acrescentou-se solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) no mesmo volume total da solução contida no eppendorf. Essa mistura foi vortexada e centrifugada a 14.000 rpm, 4°C, por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, e realizou-se a repetição do mesmo processo, ao qual foi acrescentado clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Mais uma vez o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo eppendorf. Acrescentou-se acetato de sódio (3M pH 5,2) a 1/10 da concentração do volume inicial e etanol absoluto em uma concentração 3 vezes maior que o volume inicial. O acetato de sódio e o etanol promovem a precipitação de sal e de DNA. Após esse processo os eppendorfs foram mantidos a – 20° C, por 2 horas.

Finalmente após 2 horas de espera foi feita uma nova centrifugação a 14.000 rpm, 4°C, por 30 minutos. Desta vez descartou-se o sobrenadante, o pellet remanescente foi lavado com 250 ul de etanol 70% e centrifugado nas mesmas condições por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, os pellets secos por exaustão e em seguida ressuscitados em 10 uL de água milli Q e 4 ul de tampão de corrida para DNA 6x. Essas amostras foram aplicadas em um gel de agarose 1,5%, em TBE 1x e submetidas a eletroforese a 120mA por cerca de 1 hora juntamente com um marcador molecular de DNA. Ao final desse processo o gel foi fotografado, sob luz UV, o que nós permitiu analisar o padrão de banda de corrida, formada em cada tratamento.

Perfis de bandas equivalentes indicam que o tratamento induziu a morte celular por apoptose, enquanto que o aparecimento de uma única banda reflete o estado intacto do DNA genômico. Bandas indistinguíveis, formando um “borrão” contínuo, por sua vez, indicam a ocorrência de necrose.

3.8 WESTERN-BLOT

As células foram plaqueadas na concentração de $1,2 \times 10^6$ células por placa de 10 cm e tratadas com controle negativo (DMEM, DMSO/etanol, etanol), controle positivo (estaurosporina, 5-FU), extrato de tabaco, frações (NaOH, NaHCO₃ e neutra). As concentrações utilizadas nos respectivos tratamentos foram as mesmas usadas para o teste de fragmentação de DNA. As proteínas foram extraídas após 24h de tratamento. Para a extração de proteínas as células foram retiradas da incubadora e as placas mantidas em gelo. O meio foi descartado e a lavagem da placas realizada inicialmente com solução de PBS gelado + 1mM de PMSF e em seguida com 6ml de tampão de extração protéica (50mM hepes ph 7,5 ; 150 mM NaCl; 2mM EGTA; 1mM EDTA; 1m PMSF, água destilada) sem detergente. Todo o resíduo de solução que podia estar na placa foi retirado com a ajuda de ponteiros ou com vácuo. Às placas foram acrescentados entre 150 ul e 200 ul de tampão de extração protéica contendo 1% de NP40, para lise celular. Com uma ponteira fez-se a fricção das placas e desprendimento das células que estavam com o tampão. As células e o lisado foram recolhidos, incubados em gelo por 15 minutos e centrifugados a 14.000 rpm por 2 minutos e 4°C. O sobrenadante transferido para novo tubo eppendorf, sendo uma alíquota retirada de cada amostra para a medida da concentração de proteínas. O restante foi congelado em nitrogênio líquido e estocado à - 80°C até ser utilizado. O método usado para medir a concentração de proteínas foi o de Bradford. Foram feitas duas diluições de cada amostra, geralmente 1:100 e 1:50. Para a diluição 1:100, foram utilizados 10 ul da amostra, 200 ul de reagente de Bradford e 790 ul de água destilada. Para a diluição 1:50

foram usados 20 μ l de amostra, 200 μ l de reagente de Bradford e 780 μ l de água destilada. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 595nm, em triplicata para cada amostra. Como padrão, foi utilizada uma solução de albumina sérica bovina (BSA) em pelo menos 4 concentrações distintas, utilizadas para traçar a curva-padrão e obter a equação da reta utilizada para calcular a concentração de proteínas a partir da absorbância obtida.

Vinte e cinco microgramas de proteínas foram aplicados em gel de poliacrilamida (12%) e submetidos a um campo eletroforético de 150V. Após corrida em gel, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em processo semi-seco, em tampão de transferência (tris-glicina 1M, metanol 20%), sob amperagem constante de 48mA por 2 horas. Terminado o processo de transferência, a membrana de nitrocelulose foi seca a temperatura ambiente por 30 minutos.

Para verificar se a transferência teve sucesso e se a quantidade de proteínas estava adequada para a continuação do experimento, corou-se a membrana com solução de Ponceau 1,0% (10mL de solução sob agitação por 10 minutos). Antes da incubação com anticorpos primários, a membrana corada foi cortada em dois pedaços que permitissem o uso dos mesmos para dois anticorpos distintos, como anti-tubulina e anti-caspase-3.

A membrana agora passou por um processo de bloqueio com solução de leite desnatado 5% diluído em TBST (Tris base 2,42 g.L. pH 7.6, NaCl 8g.L. tween 20 1ml) 0,1%. sob agitação por 30 minutos. A incubação com os anticorpos primários (contra as proteínas de interesse) foi feita em 6 ml de TBST 0,1%, sob agitação à 4°C, por 16 a 20h a parte superior da membrana foi incubada com anti-tubulina (Santa Cruz) na diluição de 1:2000, a parte inferior foi incubada com anti-caspase3 (Cell signaling) na diluição de 1:800.

Após incubação com anticorpos primários, as membranas foram lavadas 4 vezes com aproximadamente 10 ml de TBST 0,1%, sob agitação por 5 minutos. A incubação em anticorpo secundário foi realizada em 6ml de TBST por 1h a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários e suas respectivas diluições foram: anti-cabra - 1:7000 (Invitrogen), e anti-coelho - 1:2500 (Santa Cruz). Após esse processo os anticorpos foram descartados e as membranas novamente lavadas com TBST 0,1% por 4 vezes. Após as lavagens, o excesso de TBST foi removido da membrana e a ela adicionado 1 ml de substrato quimioluminescente

ECL plus, por 5 minutos. Após retirada do excesso de substrato, a membrana foi envolvida por um plástico e exposta a um filme radiográfico por tempos que variavam de 10 segundos a 30 min, dependendo da proteína de interesse. O filme radiográfico foi revelado manualmente por incubação da seguinte forma : 2 minutos em solução reveladora, 2 minutos em solução fixadora seguida de lavagem em água corrente.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados com auxílio do software Prism 3.0, por análise de variância (ANOVA-ONE-WAY).

4 RESULTADOS

A incidência de câncer de boca vem aumentando alarmantemente nas últimas décadas e, apesar do número crescente de pesquisas nessa área, o tratamento continua sendo agressivo e muitas vezes ineficaz (2). A busca por novas substâncias que possam ser utilizadas no tratamento dessa patologia é de fundamental importância. O estudo com extratos naturais é uma das ferramentas na busca por tratamentos mais eficazes. Por essa razão, avaliou-se nesse trabalho a ação do extrato bruto de tabaco e suas frações em uma linhagem de carcinoma oral humano, OSCC-3. Esses resultados ainda foram comparados com a ação de dois quimioterápicos (5-FU e estaurosporina) sendo que o primeiro é amplamente utilizado no tratamento do câncer oral.

4.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

O primeiro experimento realizado teve como objetivo avaliar a capacidade do extrato de levar à morte celular a linhagem selecionada. A maioria dos testes de viabilidade baseia-se no comprometimento da integridade da membrana celular, determinado pela penetração do corante. O azul tripan normalmente é incapaz de penetrar as células viáveis, que permanecem incolores, mas penetra facilmente as células não viáveis, corando-as em azul. Desta forma, o monitoramento das células submetidas aos tratamentos, posteriormente coradas e analisadas ao microscópio de luz possibilita a verificação do número de células viáveis. Para testar a capacidade do extrato bruto de tabaco em induzir a morte celular, células da linhagem OSCC-3 de carcinoma oral humano foram tratadas com 500ug/mL de extrato, ou igual volume de solvente (DMSO/etanol), ou simplesmente cultivadas em meio sem tratamento, e o número de células viáveis foi analisado como descrito.

O tratamento com extrato bruto de tabaco foi capaz de induzir a morte celular na linhagem OSCC3. Após 24 horas de tratamento, o percentual de morte celular é de aproximadamente 43%. O resultado após 48 horas é ainda mais significativo,

apenas 5% das células estavam viáveis, ou seja, 95% das células estavam mortas. Os controles negativos não provocaram a morte celular de maneira significativa, isso pode ser comprovado na figura 3.

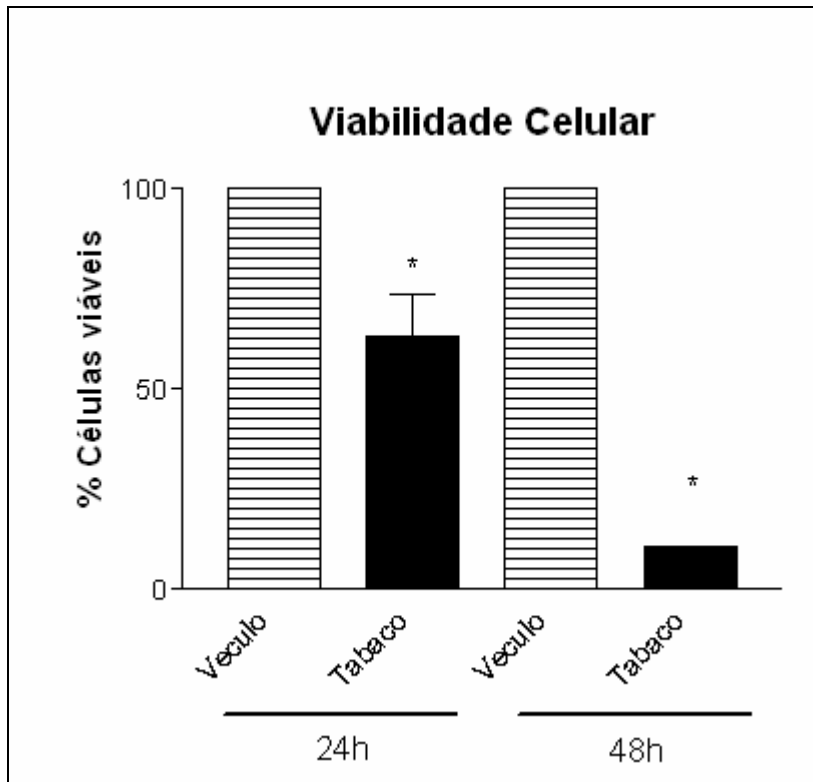


Figura 3: Teste de viabilidade celular com EBT, e o veículo (DMSO/etanol) * $p < 0,05$ vs veículo

Tabela 1: Crescimento celular

Tratamento	24h			48h		
	Sem trat.	Veículo	Tabaco	Sem trat.	Veículo	Tabaco
Núm. Cels inviáveis	195.000	422.500	240.000	360.000	197.500	370.000
Núm Cels Totais	1.405.000	2.167.500	1.185.000	1.627.500	332.500	387.500
Percentual viável	86%	80%	78%	77%	43%	5%

Também foi analisado o perfil de crescimento celular, esse dado pode ser visto na figura 4.

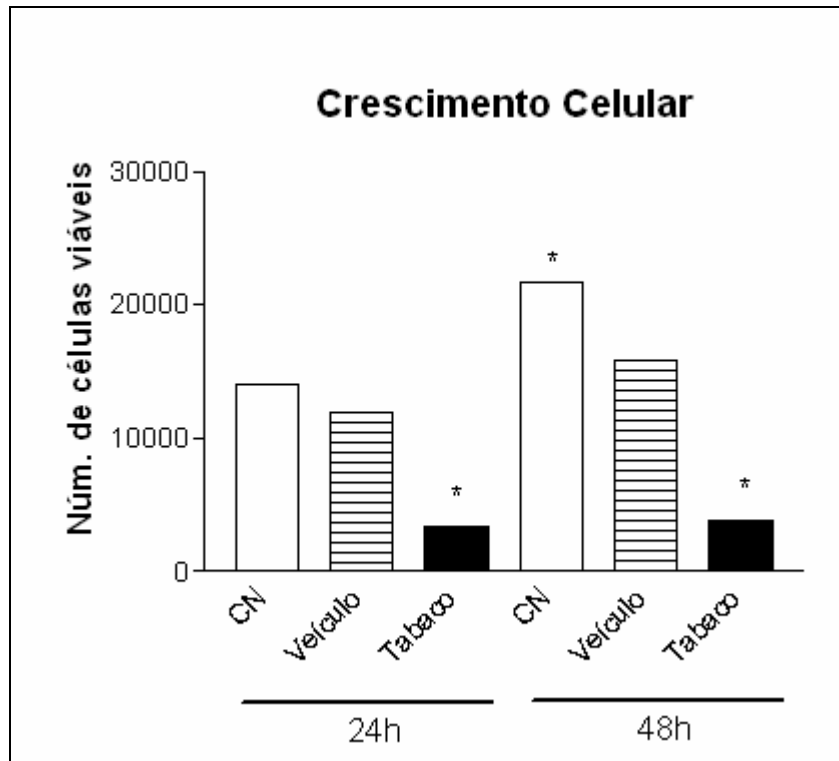


Figura 4: Crescimento celular das OSCC-3 após tratamento com CN (controle negativo, sem tratamento), veículo (DMSO/etanol) e EBT * $p < 0,001$. Tabaco vs veículo

4.2 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE CELULAR

As células foram submetidas a tratamento com extrato bruto de tabaco, 5-fluorouracil (controle positivo), DMSO/etanol (controle negativo) ou cultivadas em DMEM apenas. Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo para avaliar a citotoxicidade celular. As células sem tratamento não apresentaram morte celular, assim como as células tratadas com o veículo (controle negativo). O

tratamento com o quimioterápico 5-FU por 24 horas não resultou em citotoxicidade celular (figura 5). Já após 48h de tratamento com o 5-FU a citotoxicidade celular foi próxima a 50%. Esse fato se justifica pelo mecanismo de ação do próprio medicamento, que por ser um quimioterápico do tipo antimetabólito só começa a agir no processo de divisão celular, mitose, e por isso necessita de um tempo maior para que seu resultado seja visível. Já as células tratadas com o extrato bruto de tabaco apresentam citotoxicidade celular significativa nas primeiras 24 horas após o tratamento, próxima a 30%. Completa as 48 horas de tratamento a citotoxicidade celular teve um ligeiro aumento, apresentando-se em cerca de 26 % (figura 5).

Com esses resultados podemos concluir que o extrato de tabaco é citotóxico para a linhagem OSCC-3 de carcinoma oral.

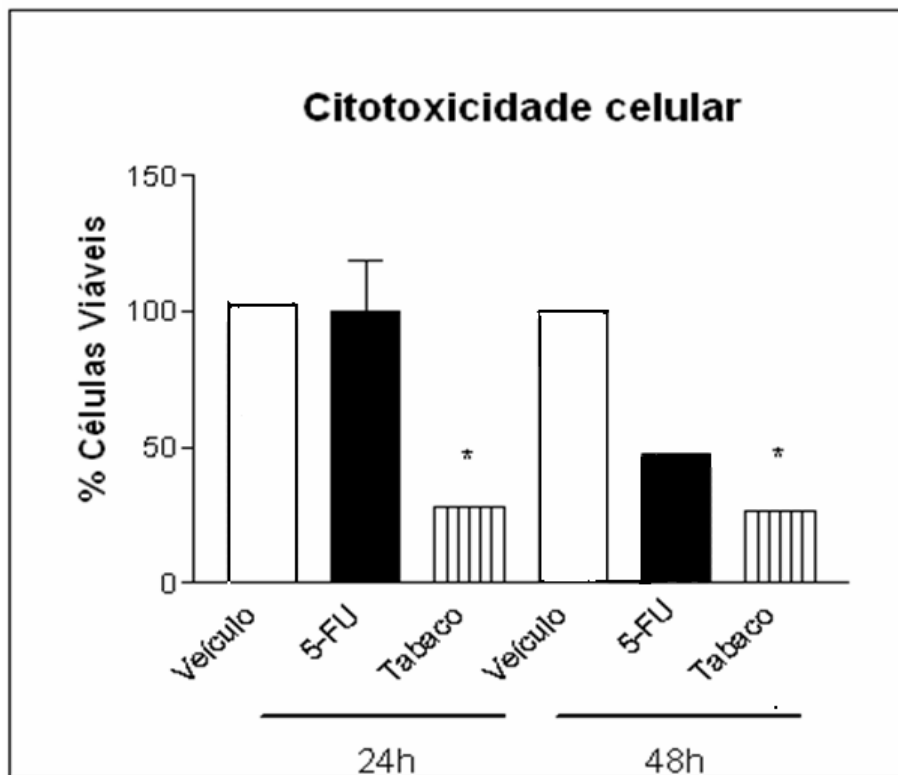


Figura 5: Teste de citotoxicidade celular com veículo (DMSO/etanol), 5-FU e EBT. * $p < 0,01$ vs veículo

4.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO E CITOTOXICIDADE DAS SUAS FRAÇÕES

O extrato bruto de tabaco foi fracionado de acordo com a polaridade e solubilidade (frações metanólica, neutra, ácida/HCl, básica/NaOH, e NaHCO₃/carbônica), e a capacidade de ação das respectivas frações verificada em teste de citotoxicidade celular. Dentre todas as frações as que apresentaram maior citotoxicidade celular foram as frações metanólica e neutra. Essa ação parece ser tempo-dependente, pois a porcentagem de morte celular é maior após 48h de tratamento do que após 24h (fig. 6A e 6B). A fração neutra apresentou maior potencial de atividade citotóxica, ocasionando mais mortes celulares, tendo ação citotóxica maior que a do próprio extrato bruto. As demais frações não conseguiram induzir morte celular nessa linhagem de carcinoma oral. Esse experimento permite identificar em que fração a atividade tóxica do extrato bruto de tabaco está concentrada e posteriormente, com novos experimentos, pode-se isolar a molécula responsável por essa atividade.

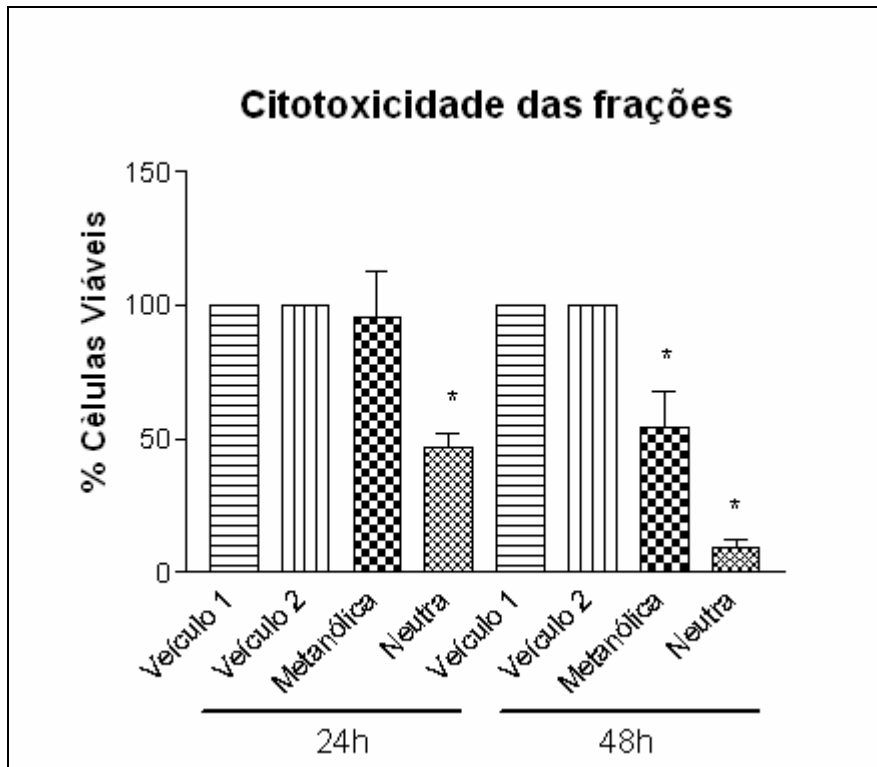


Figura 6 A: Gráfico demonstrando a citotoxicidade das frações metanólica e neutra na concentração de 500 ug/ml, veículo 1 (DMSO/etanol) e veículo 2 (etanol) após 24 e 48 horas de tratamento

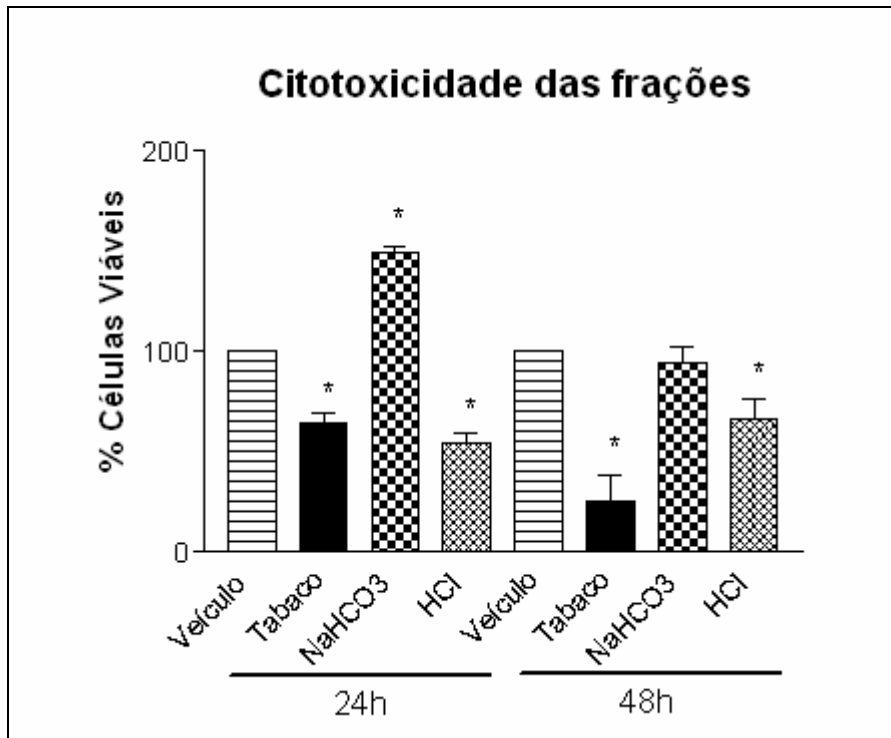


Figura 6 B: Gráfico demonstrando a citotoxicidade das frações carbônica e ácida na concentração de 500 ug/ml,veículo (DMSO/etanol) após 24 e 48 horas de tratamento *p <0,01 tratamento vs veículo

4.4 WST

Uma outra forma de confirmar a citotoxicidade celular é o teste de WST (uma versão simplificada de MTT). Tal teste baseia-se na atividade mitocondrial das células, que, metabolicamente ativas, secretam enzimas capazes de converter sais de tetrazólio em formazan, cuja presença pode ser detectada em espectrofotômetro. Desse modo, após serem tratadas por 24 ou 48 horas, as células foram incubadas com solução de tetrazólio e a absorbância do meio é determinada por um leitor de placa/espectrofotômetro. Todas as frações foram testadas, com exceção da fração ácida que não apresentara ação na linhagem OSCC-3 em testes prévios, em duas concentrações diferentes, 250 ug/ml e 500 ug/ml. Também foram testados o extrato bruto de tabaco, assim como os controles negativos (sem tratamento DMEM, DMSO/Etanol, etanol). O tempo de escolha para a leitura após a adição do substrato

foi de 1 hora. Como o esperado, o extrato bruto de tabaco apresentou elevada citotoxicidade celular, assim como as frações metanólica e neutra. As frações NaOH e NaHCO₃ não apresentaram citotoxicidade celular (figura 8).

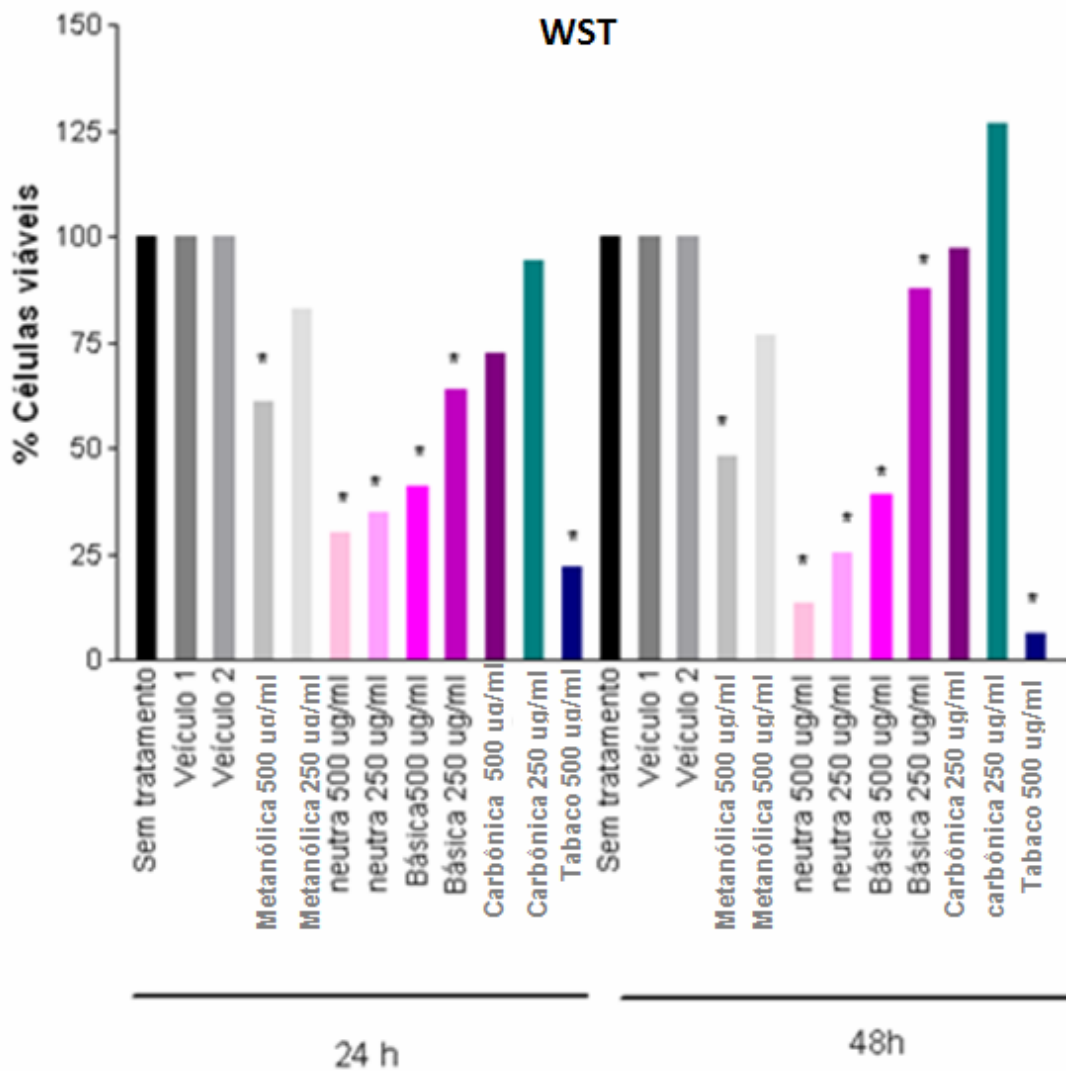


Figura 7: WST para avaliar citotoxicidade do extrato de tabaco e suas frações nas concentrações de 500 e 250 ug/ml 1 hora após incubar com sais de tetrazólio
* $p < 0,01$ Tabaco, metanólica, carbônica, básica vs veículo 1; neutra vs veículo 2

4.5 CURVA DOSE RESPOSTA EXTRATO DE TABACO

Com os experimentos anteriores foi possível verificar que o extrato de tabaco é citotóxico na linhagem OSCC-3 na concentração de 500ug/ml. Fez-se necessário avaliar a concentração mínima de extrato bruto de tabaco necessária para induzir citotoxicidade celular e, conseqüentemente morte celular nas células OSCC-3. Para isso foi feita a curva dose-resposta com diferentes concentrações do extrato. As concentrações variaram de 0 a 500 ug/ml (0, 10, 50, 100, 250 e 500 ug/ml) correspondente aos logaritmos, respectivamente, (0 ; 1; 1,69; 2; 2,39; 2,69) e o tempo de tratamento foi de 24 horas. A citotoxicidade foi medida conforme descrita no experimento anterior, por coloração com cristal violeta. A concentração mínima do extrato necessária para induzir a morte celular é de 250 ug/ml, sendo que o pico de ação foi obtido na concentração de 500 ug/ml. A IC₅₀ foi calculada a partir da curva obtida, resultando em 344,35µg/mL.

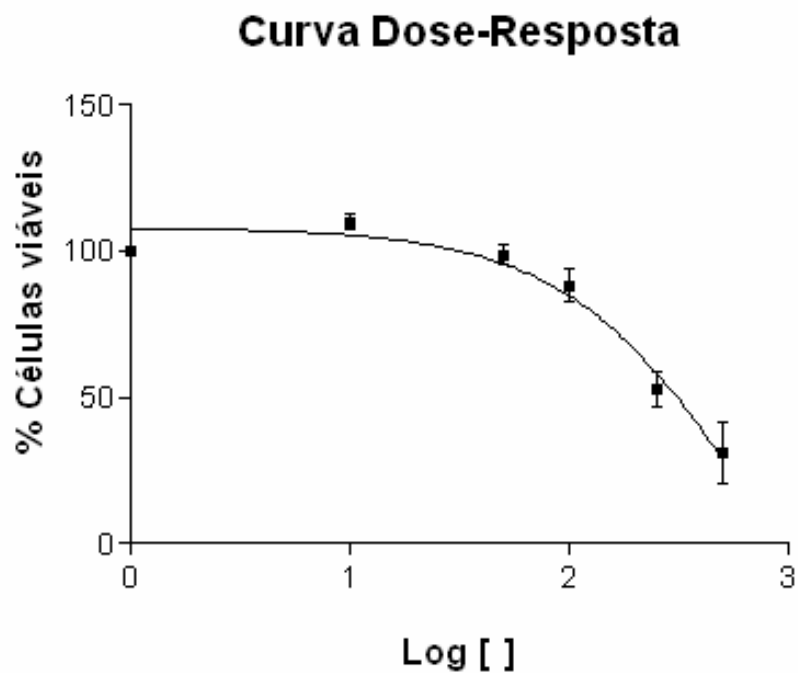


Figura 8: Curva dose-resposta do extrato bruto de tabaco após 24 horas de tratamento.

4.6 CURVA DOSE-RESPOSTA COM AS FRAÇÕES QUE APRESENTARAM MAIOR CITOTOXICIDADE

Foi feita uma curva dose-resposta com as frações que apresentaram maior citotoxicidade celular. As concentrações utilizadas foram 500, 250, 100, 50 e 0 ug/ml, assim como foi constatado com o extrato bruto, as frações foram capazes de induzir morte celular de maneira significativa apenas na concentração de 500 ug/ml.(figuras 9 e 10)

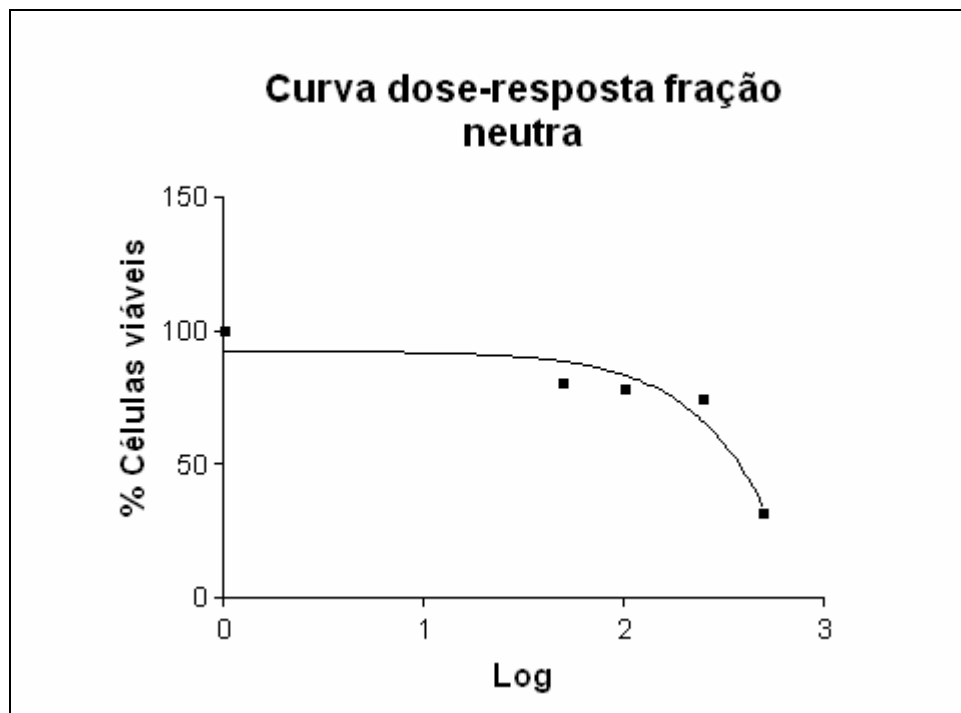


Figura 9: Curva dose-resposta fração neutra, após 24 horas de tratamento

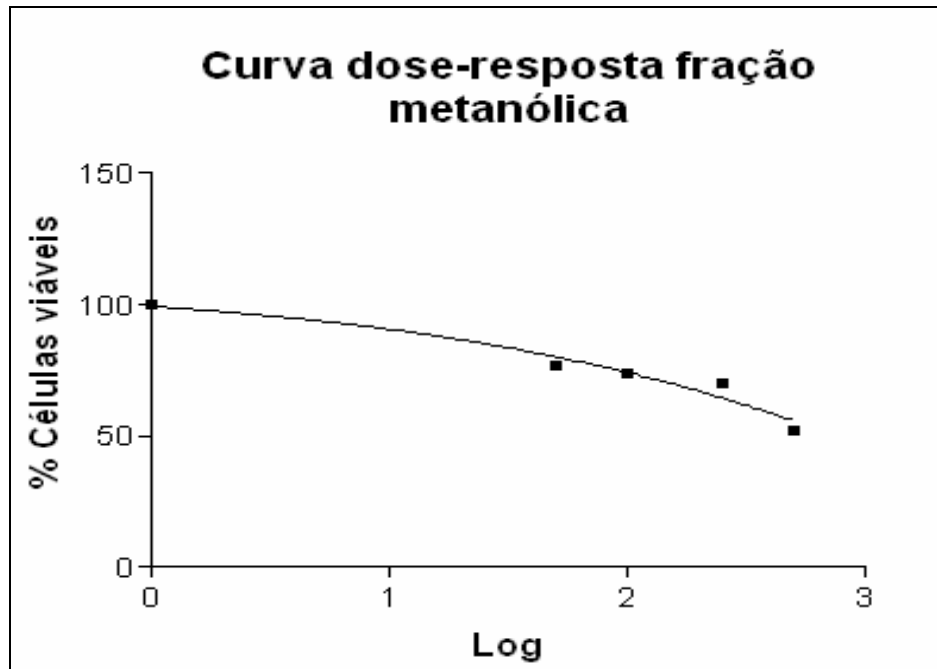


Figura 10: Curva dose-resposta fração metanólica, após 24 horas de tratamento

4.7 FRAGMENTAÇÃO DE DNA

A fragmentação de DNA permite avaliar qual tipo de morte celular (necrose vs apoptose) é provocada pelo extrato e suas frações. Apoptose e necrose são dois padrões de morte celular. A apoptose é um processo fisiológico normal que funciona como controle da população celular e pode ser distinguida da necrose por critérios morfológicos e bioquímicos (82). Para esse experimento as células foram tratadas com os controles negativos (DMEM, DMSO/etanol, etanol), controles positivos (estaurosporina - 200nM, 5-FU - 25 mg/ml), extrato bruto de tabaco na concentração de 500 ug/ml, e as frações neutra, básica e carbônica na mesma concentração do extrato bruto. Os quimioterápicos utilizados como controle positivo foram escolhidos por já ser conhecida sua ação apoptótica (90,91).

Como pode ser observado na figura 11, os controles negativos deram origem a apenas uma banda, correspondente ao DNA genômico intacto das células, o que identifica estes tratamentos como incapazes de induzir a apoptose. Já os

tratamentos com os controles positivos assim como o extrato bruto de tabaco e a fração neutra resultaram no aparecimento de bandas, referentes à quebra do DNA em regiões inter-nucleossômicas, isto é, apresentaram padrão típico da morte celular que pode ser caracterizada como apoptose. O tratamento com as frações básica e carbônica assim como os controles negativos não resultaram em bandas de DNA fragmentado, indicando a incapacidade dos mesmos em induzir a apoptose.

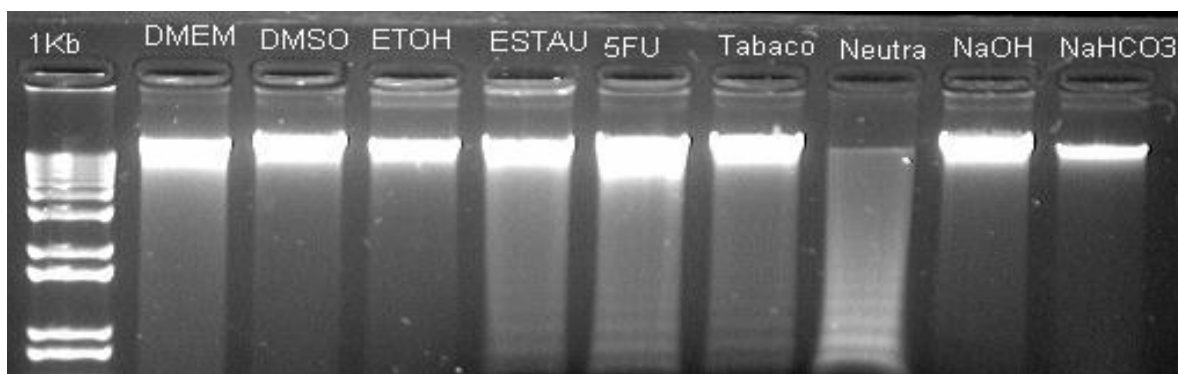


Figura 11: Foto DNA fragmentado, os poços tratados com estaurosporina, 5-FU, EBT, e fração neutra apresentam padrões de banda correspondentes a apoptose (1 Kb= marcador de peso molecular)

4.8 WESTERN-BLOT

Para confirmar o tipo de morte celular, e indicar a provável via envolvida no processo de morte celular induzido pelo extrato bruto de tabaco e suas frações na linhagem OSCC-3, foi feito um western-blot contra a forma clivada (ativa) de caspase-3 e PARP. Como os experimentos com fragmentação de DNA indicavam que o perfil apoptótico de morte utilizamos o anticorpo anti-caspase3. Os estágios finais da apoptose geralmente envolvem mecanismos dependentes de caspase-3, que atua como um executor da morte celular clivando múltiplas estruturas e proteínas (92). Como controle foram utilizados anticorpo anti-tubulina (um constituinte celular cuja expressão não deve ser alterada pelo tratamento com o extrato ou frações).

As células de carcinoma oral humano foram plaqueadas e receberam o mesmo tratamento utilizado para o experimento da fragmentação de DNA, controle negativo (DMEM, DMSO/Etanol, etanol), controle positivo (estaurosporina, 5-FU), extrato bruto de tabaco e suas frações metanólica, carbônica e neutra na concentração de 500 ug/ml. Após tratamento (24horas) as proteínas foram extraídas e detectadas por western-blot. A figura 12 confirma os dados obtidos com a fragmentação de DNA. As linhas 4 (estaurosporina), 5 (5-FU), 6 (EBT) e 7 (fração neutra), foram as únicas que apresentaram o perfil de banda corresponde a caspase-3 clivada (17 KDa), correspondente ao processo apoptótico. As demais linhas apresentaram bandas de 35 KDa correspondentes a caspase-3 que não foi clivada.

A PARP (poli ADP-ribose polimerase) é um das proteínas clivadas pela caspase-3 quando a célula entra em processo de apoptose. Novos western-blots foram feitos com anticorpo anti-PARP e actina (controle) para confirmarem os resultados vistos nos experimentos anteriores. A figura 13 mostra claramente que o perfil de bandas encontrados nesse segundo experimento é semelhante ao primeiro, ou seja, nas linhas 4, 5 e 6 encontramos as bandas correspondentes a PARP clivada, 89 KDa (o que comprova o processo apoptótico) e nas demais linhas é encontrada apenas a banda de PARP não clivado (116 KDa) demonstrando que esses tratamentos não resultaram em apoptose.

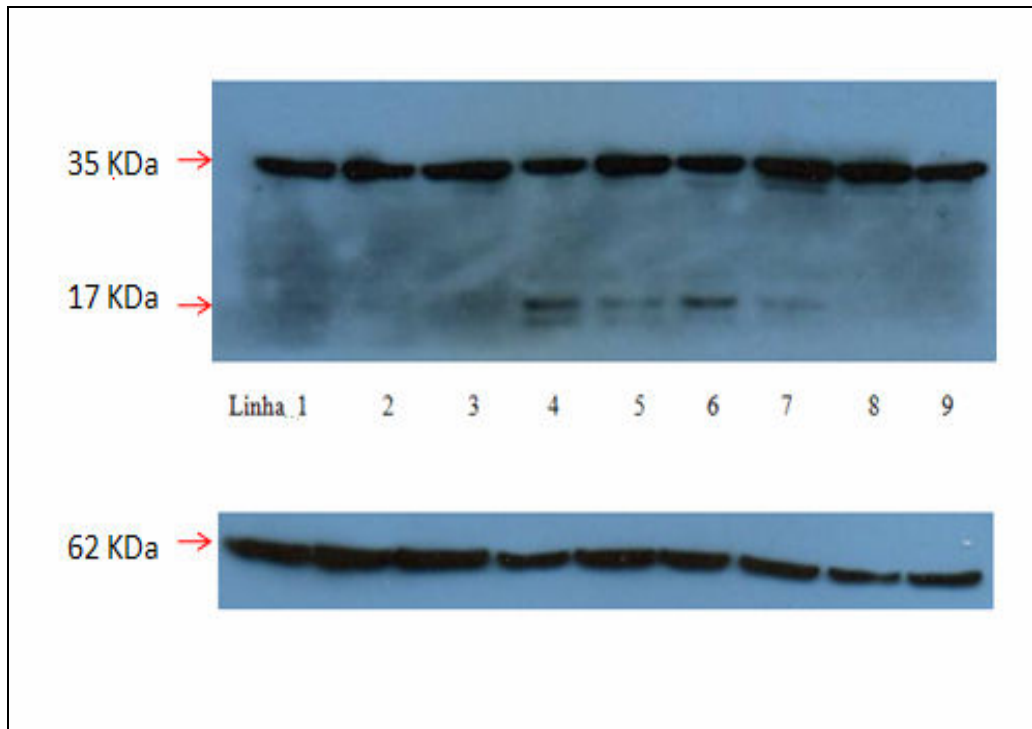


Figura 12 : Western-blot com extrato de proteínas extraídas das células tratadas com veículo 2 (DMSO/etanol), 3 (etanol), 4 (estaurosporina), 5(5-FU), 6 (EBT), 7 (fração neutra), 8 (fração básica) e 9 (fração carbônica). Painel superior refere-se à caspase-3, e painel inferior, à tubulina.

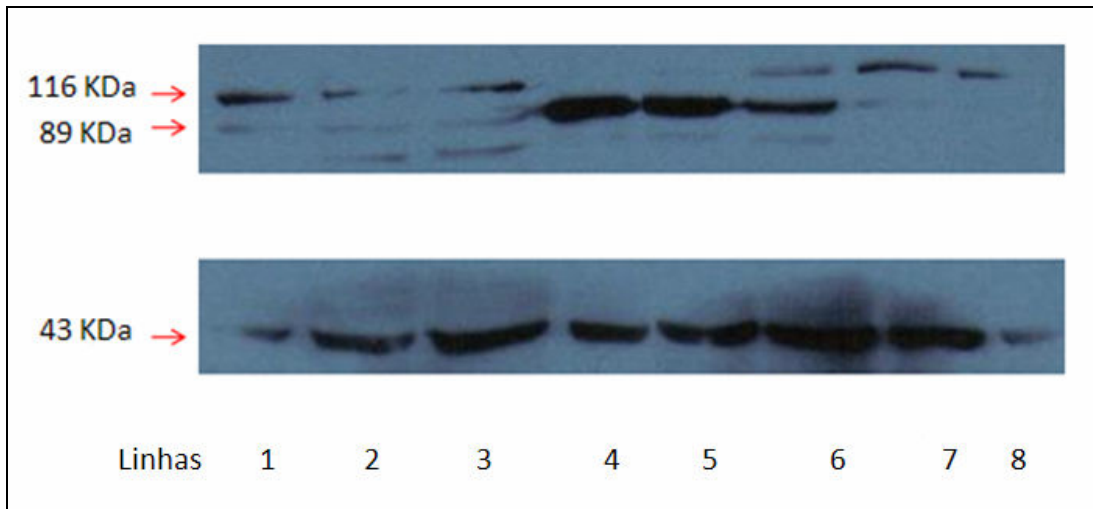


Figura 13: Western-blot contra PARP e actina. Na parte inferior observa-se o controle, bandas de actina. 1 sem tratamento, 2 veículo (DMSO/etanol), 3 (etanol), 4 (estaurosporina), 5 (EBT), 6 (fração neutra), 7 (fração básica), 8 (fração carbônica). Painel superior corresponde a PARP e painel inferior a actina.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento do carcinoma oral está intimamente ligado a hábitos como o uso de cigarro, ou qualquer outro tipo de consumo de tabaco, e álcool. Apesar de serem fatores de risco independentes, o uso concomitante dessas substâncias tem efeito sinérgico e aumentam consideravelmente o risco de desenvolver câncer de boca ou orofaringe (2). Pode-se dizer até que a maioria dos casos de câncer de boca só ocorre por influência desses hábitos, principalmente o uso de tabaco.

Muitos estudos têm sido feitos para avaliar qual o mecanismo de ação que o tabaco exerce nas células, o que permite avaliar o potencial carcinogênico dessa substância. Através dessas pesquisas já se sabe que o tabaco possui inúmeros carcinógenos responsáveis pela progressão do câncer (33, 93). Os produtos do tabaco estão ligados a uma infinidade de tipos de câncer como câncer de pulmão, cavidade oral, nasal, orofaringe, esôfago, estômago, rim, pâncreas, fígado e até mesmo com a leucemia mielóide. Segundo Hecht (33), existem mais de 60 carcinógenos em um cigarro comum, em produtos de tabaco que são consumidos sem serem queimados. O tabaco que não é fumado possui menos carcinógenos que o fumado porque muitos deles são formados durante a combustão. Dentre todos os carcinógenos presentes no tabaco pode-se distinguir três como os principais, são eles, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas e aminas aromáticas. Juntos eles são capazes de provocar danos no DNA e estresse oxidativo o que pode levar ao desenvolvimento do câncer (33). No entanto, em um estudo pioneiro, ficou claro que os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos não são os únicos responsáveis pelo desenvolvimento de câncer em camundongos, co-carcinógenos e promotores de tumores são cruciais para o desenvolvimento desta patologia (94).

O cigarro é composto por uma gama de componentes químicos que podem tanto induzir a apoptose como reprimi-la (87). A desregulação do processo apoptótico leva a uma variedade de patologias humanas como doenças auto-imunes, desordens degenerativas e o próprio câncer (70).

Os dados apresentados nessa dissertação deixam clara a ação citotóxica do extrato bruto de tabaco na linhagem de carcinoma oral humano OSCC3. Além disso, os experimentos ora realizados demonstraram que a ação do extrato de tabaco na

linhagem de carcinoma oral humano OSCC-3 é dose dependente, tal qual observado na linhagem HCPC-1 de camundongos (91).

Curiosamente, a nicotina parece exercer um efeito anti-apoptótico em células do câncer oral. Abhijit e colaboradores (91) testaram diferentes concentrações de nicotina associada ao extrato aquoso de tabaco na linhagem de carcinoma oral de camundongos HCPC-1. Segundo os mesmos autores, a grande responsável pela ação carcinogênica do tabaco seria a nicotina (concentração 1mM) que após ser adicionada as células tratadas com extrato de tabaco inibiu a apoptose provocada pelo extrato de tabaco de maneira significativa. Estudos prévios mostram que em baixas concentrações (0,5 – 2,5%) o extrato de tabaco induz a apoptose em células epiteliais orais, já em concentrações altas (2,5 – 5 %) há uma diminuição do número de células apoptóticas (86).

Nem todas as frações do extrato são capazes de gerar citotoxicidade celular. Apenas as frações neutra e metanólica tiveram esse poder de ação. A fração neutra isolada conferiu uma citotoxicidade celular ainda maior que a observada em células tratadas com o extrato bruto. Isso nos permite inferir que a molécula, ou moléculas responsáveis por causar a morte dessa linhagem celular esta presente nessas frações e que provavelmente esta molécula é de natureza apolar. Novas pesquisas são necessárias para que o isolamento dessas moléculas seja feito.

O mecanismo molecular envolvido na apoptose induzida pelo extrato de tabaco ainda não esta totalmente esclarecido. Descobrir qual o tipo de morte celular gerada pelo extrato bruto de tabaco é de fundamental importância para entender o mecanismo de ação dessa substância. Os experimentos com fragmentação de DNA e western-blot mostram que o tipo de morte celular propiciada pelo extrato é a apoptose, e que a caspase-3 esta diretamente relacionada a esse processo

Adicionalmente um estudo mostrou que o óxido nítrico é um dos mediadores da morte celular provocada pelo extrato (87). Apesar do tabaco ser capaz de induzir apoptose, tanto em linhagem de carcinoma oral humano quanto em carcinoma de camundongos, o cigarro continua sendo o maior causador de câncer de boca. Isso se deve provavelmente ao fato de que os carcinógenos presentes neste produto provocam alterações em genes que, após mutados estimulam a iniciação e progressão da tumorigênese. Muitos são os genes que estão envolvidos no processo de carcinogênese oral como o p53, RB1 e CDKN2A, mutações em

oncogenes como nas famílias ErbB e ciclinas também já foram descritas tanto em lesões cancerizáveis como no próprio carcinoma (2).

As caspases, uma família conservada de enzimas, são os componentes centrais da resposta apoptótica (72). A resposta apoptótica, em células de mamíferos, pode ser mediada por via intrínseca ou extrínseca dependendo da origem do estímulo de morte celular. A via intrínseca é desencadeada em resposta a estímulos da própria célula (19). Já a via extrínseca é desencadeada por ligantes de “morte celular” extracelulares, que se ligam aos receptores de superfície celular. A formação desse complexo ligante-receptor recruta fatores citosólicos como a própria caspase 8 (caspase iniciadora), que por sua vez cliva e ativa as caspases efetoras. A caspase 3 é uma das caspases efetoras, e uma vez ativada promove a apoptose celular (70). O extrato bruto de tabaco promove apoptose, através da clivagem da caspase 3, provavelmente pela via extrínseca.

Finalmente, o tabaco representa apenas uma dentre as inúmeras espécies vegetais que poderiam servir de fonte para isolamento de compostos com atividade pró-apoptótica, de extrema valia no manejo do câncer. O extrato de *Ginkgo biloba*, por exemplo, tem uma ação parecida com a do extrato bruto de tabaco encontrada neste trabalho, ele também é capaz de induzir a apoptose, através da ativação da caspase 3, em células de câncer da cavidade oral de forma tempo-dose-dependente (80).

No caso do presente trabalho, bem como no dos supra-citados, mais experimentos são necessários para isolar o composto ativo encontrado nessas espécies vegetais responsável pela morte de células tumorais, e assim facultar o desenvolvimento de novos medicamentos.

6 CONCLUSÕES

Com este estudo pode-se concluir que:

- Apesar do tabaco ser um dos maiores carcinógenos conhecidos, o EBT é citotóxico para a linhagem OSCC-3 de carcinoma oral humano.
- EBT é citotóxico de maneira dose-dependente.
- Entre as frações testadas apenas as frações neutra e metanólica são capazes de induzir morte celular na linhagem OSCC-3.
- A fração neutra é a que apresenta maior citotoxicidade na linhagem estudada, e por isso podemos inferir que a molécula responsável por induzir a morte celular provavelmente é apolar.
- A concentração de 500 ug/ml é a mais eficiente em causar a morte celular, tanto para o EBT quanto para as frações.
- O tipo de morte celular induzida pelo extrato é a apoptose.
- A via envolvida no processo da apoptose é a das caspases, e a caspase-3 esta intimamente ligada a esse processo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Parise Jr, O. Câncer de Boca. Ed 1ª. 2000
2. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gourgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral oncology* 2007, 43 (6): 523-34.
- 3 Campana JP, Meyers AD. The surgical management of oral cancer. *Otolaryngol Clin n Am* 2006; 39:331-348.
4. Alvarenga LM, Ruiz MT, Beertelli ECP, Ruback MJC, Maniglia JV, Bertollo EMG. Epidemiologic evaluation in patients with head and neck cancer in a university hospital northwest state of São Paulo. *Brazilian J of Otorhinolar* 2008; 74: 68-73.
5. Scully C, Bagan J. Recent advance in oral oncology. *Oral Oncol* 2007;43:107-115.
- 6 Schenkel EP, Gosmann G, Athayde ML 2003. Saponinas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. E Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS
7. World Health Organization . Cancer control guide- Knowledge into action Geneva: WHO, 2006 . Disponível em www.who.int/cancer .
- 8 Petersen PE. Oral cancer prevention and control- The aproach of the World Health Organization. *Oral Oncol* 2009; 45: 454-60.
- 9.Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002;38:737-746.
- 10.Home Page:Instituto Nacional do Câncer [citado em 2009 jan]. Disponível em <http://www.inca.gov.br>.
- 11 Wunsch Filho V. Epidemiologia do câncer de laringe no Brasil. *São Paulo Med J* 2004;122:188-94.
- 12 La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol*. 1997 Sep;33(5):302-12.
- 14 Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis*. 2000 Mar;6(2):65-74.
15. Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG. Oral cancer. Taylor & Francis 2003.

16. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002;52:195-215.
17. Silverman S Jr. Epidemiology. In: Silverman S Jr ed *Oral Cancer*. 4th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc;1998;1-6.
18. Musunuru K, Hinds PW. *Cell cycle regulators in cancer*. 1^o ed.,1997.
19. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
20. Esptein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2002; 68:617-621.
21. Mithani, SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. *Oral Dis*. 2007; 13: 126-33.
22. Hofseth, LJ. The adaptative imbalance to genotoxic stress: genome guardians rear their ugly heads. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1787-93.
23. Karpinets, TV; Foy, BD. Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations and succeeding matched mutations. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1323-34.
24. Siber, OM ; Tomlinson, SR; Tomlinson IP. Tissue, cell and stage specificity of (epi)mutations in cancers. *Nature Ver. Cancer* 2005; 5:649-55.
25. Park NK, Kang MK. Genetic instability and oral cancer. *J Biotechnol* 2000; 3:66-71.
26. Brachman DG, Graves D, Vokes E, Beckett M, Haraf D, Montag A et al. Occurrence of p53 gene deletion and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1992;52:4832-4836.
27. Shindoh M, Chiba I, Yasuda M, Saito T, Funaoka K, Kohgo T et all. Detection of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferation cell nuclear antigen expression. *Cancer* 1995; 76:1513-1521.
28. Van-Der RP, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W et al. Frequent loss .*Res* 1994; 54:1156-1158
29. Yakamoto, T; Kamata, N; Kawano H; Shimizu S; Kuroki T, Toyoushima K et AL. Hight incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1996; 46:414-16.

30. Shin DM, Vorvud N, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN. Sequential increases in proliferation cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis : a potential biomarker. *Journal Cancer Inst* 1993; 85:971-978.
31. Hansson A, Bloor BK, Haig Y, Morgan PR, Ekstrand J, Grasform RC. Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral ephitelia in organotypic culture. *Oral Oncol* 2001; 37:419-430.
32. Park NH, Min BM, Lis SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis* 1991; 12:1627-1631.
33. Hecht, SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews* 2003; 3:733-44.
34. Todd R, Donoff B, Wong DTW. The molecular biology of oral carcinogenesis: Toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:613-623.
35. Sanderson RJ, Ironside JAD. Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ* 2002;325:822-827.
36. Marques LA, Neto JE, Figueiredo RA, Gois-Filho JF, Kowalski LP, Carvalho MB et al. Oral health, hygiene practices and oral cancer. *Saúde Pública* 2008; 3:471-79.
37. Mashberg A, Boffeta P, Winkelman R. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer* 1993;72: 1369-1375.
38. Lewin F, Norell SE, Johansson H. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population based case referent study in Sweden. *Cancer* 1998; 82: 1367-1375.
39. Andre K, Schraub S, Mercier M. Role of alcohol and tobacco in the etiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995; 31B: 301-309.
40. Nagao Y, Sata M, Tanikawa K, Itoh K, Kameyama T. High prevalence of hepatitis C virus antibody and RNA in patients with oral cancer. *J Oral Pathol Med* 1995; 28:254-360.
41. Porter SR, Lodi G, Chandle K, KumarN. Development of squamous cell carcinoma in hepatitis C virus-associated lichen planus. *Oral Oncol* 1997; 33:58-59.

42. Trivedy RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activation Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 2002; 30: 285- 289.
43. Reichard, PA. Oral cancer and precancer related to betel and miang chewing in Thailand: a review. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 241-243.
44. IARC. Betel-quid and areca-nut chewing and some areca nut derived nitrosamines. *IARC Monog. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 2004; 85: 1-334.
45. 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: 477-492.
46. Lai KC, Lee TC. Genetic damage in culture human keratinocytes stressed by long-term exposure to areca nut extracts. *Mutation Research* 2006; 599:66-75.
47. Lee PH, Chang MC, Chang WH, Wang TM, Wang YJ, Hahn LJ, et al. Prolonged exposure to arecoline arrested human KB epithelial cell growth: Regulatory mechanisms of cell cycle and apoptosis. *Toxicol* 2006;220:81-89
48. Cheng HC, Chien H, Liao CH, Yang YY, Huang SY. Carotenoids suppress proliferating cell nuclear antigen and cyclin D1 expression in oral carcinogenic models. *J Nut Biochem* 2007; 18: 667-675.
49. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *International Journal of Cancer* 1989;43:992-1000.
50. SCHOTTENFELD, D. & WINAWER, S.J. *Cancer Epidemiology and Prevention* 1996; Oxford: Editora Oxford University Press.
51. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod AS, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *International Journal of Cancer* 1995;63:769-773.
52. Gattás GJF, Siraque MS, Soares-Vieira JA, Kohler P, Guarnieiro FB, Carvalho MB, et al. CYP2E1 genetic polymorphism and squamous cell carcinoma of head and neck in Brazil. *Annual Environmental Mutagen Society Meeting* 2002.
53. Pindborg JJ. Oral pré-cancer . In: Barnes L. *Surgical pathology of the head and neck*. New York, Marcel Deker,1985 p. 279.
54. Kuffer R, Lombardi T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol* 2002;38:125-130.

55. Scully C. Clinical diagnostic methods for the detection of premalignant and early malignant oral lesions. *Community Dental Health* 1993;10:43-52.
56. Martins MD, Marques LO, Martins MAT, Bussadori SK, Fernandes KPS. Queilite actínica; relato de caso clinic. *Arch Otorryngol Head Neck Surg* 2008;134(11):105-10.
57. Pedruzzi PA, Kowalski LP, Nishimoto IN, Oliveira BV, Tironi F, Ramos GH. Analysis of prognostic factors in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy alone or in combination with systemic chemotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008;134:1196-204.
58. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Eng J Med* 1993; 328:184-94.
59. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FKL, Jansma J, Coppes RP. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med* 2003; 14(3):213-225.
60. Harris L, Sessions R, Hong W. Head and neck cancer : a multidisciplinary approach. Philadelphia: Lippincott –Raven;1998.
61. Fuwa N, Kodaira T, Furutani K, Tachibana H, Nakamura T, Daimon T. Chemoradiation therapy using radiotherapy, systemic chemotherapy with 5-fluorouracil and nedaplatin, and intra-arterial infusion using carboplatin for locally advanced head and neck cancer – Phase II study . *Oral Oncology* 2007;
62. Shousong C, Farukh AD, Rustum YM. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:2561-2569.
63. Pignon Jp, Bourthis J, Domenge C. Chemotherapy added to locoregional treatment and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of update individual data. *Lancet* 2000; 355: 949-955.
64. Hotte SJ, Wright JR. Understanding the results of meta-analyses in the treatment of head and neck squamous cell cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008;22: 1257-66.
65. Schantz SP, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses nasopharynx, oral cavity, and oropharynx. In: De-Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and practice*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2001; p. 797-860.
66. Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and

radiotherapy regimens in unresected local advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer* 2006; 6:28

67. Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988;6:1653-1664.

68. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidilate synthase with 5-fluorodeoxyridylate. *Biochemistry* 1974;13:471-481.

69. Li MH, Ito D, Sanada M, Odani T, Hatori M, Iwase Met al. Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncology* 2004; 40:63-70.

70. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome signalling platform of cell death. 2007; 8:405-432.

71. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* 1995; 267:1456-1462.

72. Shi Y. Mechanism of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9:459-470.

73. Thornberry NA, Lazbnik Y. Caspase: enemies within. *Science* 1998; 281:1312-1316.

74. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews* 2004;5:897-06.

75. Nagata S. Fas ligand-induce apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999; 33:29-55.

76. Calixto JB., et al. (1997). Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca. *Ciência hoje* 21: 26 – 30

77. Motohashi N, Shirataki Y, Kawase M, Tani S, Sakagami H, Satoh H et al. Cancer prevention and therapy with Kiwifruit in chinese folklore medicine: a study of kiwifruit extracts. *J Ethnopharm* 2002; 81:357-364.

78. Russo A, Cardile V, Lombardo L, Vanella L, Vanella A, Garbarino JÁ. Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* swett roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;100:323-32.

79. Kim KS, Rhee KH, Yoon JH, Lee JG, Lee JH, Yoo JB. Ginkgo biloba extract (EGb761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. *Oral Oncol* 2005;41 (4):383-89.

80. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000; 148: 187-197.

81. Hong H, Yi-Min Q. Grape seed proanthocyanidin extract induced mitochondria-associated apoptosis in human acute myeloid leukaemia 14.3D10 cells. *Chinese Med J* 2006;119:417-421.
82. Shirataki Y, Kawase M, Saito S, Hurihara T, Tanaka W, Sath ket al. Selective cytotoxic activity of grape peel and seed extracts against oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 2000; 20:423-426.
83. Rodrigo KA, Rawal Y, Renner RJ, Schwartz SJ, Tian Q, Larsen PE et al. Supression of the tumorigenic phenotype in human oral squamous cell carcinoma cells by an ethanol extract derive from freeze-dried black raspberries. *Nutr Cancer* 2006; 54:58-68.
84. Heusch WI, Maneckjee R. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 1998;19:551-56.
85. Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW. Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *The FASEB Journal* 1993; 7:1045-1051.
86. Sculler HM. Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. *Life Sci.*2007;80:2274-80.
87. Mangipudy RS, Vishwanatha JK. Role of nitric oxide in the induction of apoptosis by smokeless tobacco extract. *Mol Cell Biochem* 1999; 200:51-57.
88. Sakagami H, Kuribayashi N, Iida M, Sakagami T, Takeda M, Fukuchi K et al. Induction of DNA fragmentation by tannin and lignin related substances. *Anticancer Res* 1995; 15:2121-2128.
89. Sakagami H, Fukuchi K, Kadofuku T, Gomi K, Nakamura K, Kuribayashi N et al. Effect of methionine depletion on growth and apoptosis in various tumor cell lines. *Anticancer Res* 1997; 17:2407-2410.
90. Abhijit GB, Velliyur KG, Indraneel B, Jamboor KV. Deregulated cyclooxygenase-2 expression in oral premalignant tissues. *Mol Cancer Therap* 2002; 1: 1265-71.
91. Abhijit GB, Velliyur KG, Jamboor KV. Inhibition of nitric oxide-induced apoptosis by nicotine in oral epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 2007;305:113-21
92. Hsu S, Singh B, Schuster G. Induction of apoptosis in oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention. *Oral Oncol* 2004;40:461-473.
93. Hoffmann D., Hoffmann I. & El Bayoumy, K. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernest L. Wynder. *Chem. Res. Toxicol.* 2001;14:767-790.
94. Hoffman D, Schmentz I, Hecht SS, Wynder EL in *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer* ed Gelboin, New York, 1978.

