

GABRIEL ÁLVARES BORGES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS INIBIDORES DE MTOR EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO**

BRASÍLIA, 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GABRIEL ÁLVARES BORGES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS INIBIDORES DE MTOR EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO**

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

Orientadora: Prof. Dr. Eliete Neves da Silva Guerra

Co-orientadora: Dr. Silvia Taveira Elias

Brasília

2015

GABRIEL ÁLVARES BORGES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS INIBIDORES DE MTOR EM LINHAGENS
CELULARES DE CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para 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 dezembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eliete Neves da Silva Guerra (presidente)

Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Universidade de Brasília (UNB)

Prof. Dr. Kênnia Rocha Rezende

Universidade Federal de Goiás (UFG)

AGRADECIMENTOS

Ao meus pais, Valdeci e Gilva, que com todo o carinho e o amor possíveis me conduziram pela vida até aqui, e ao meu irmão, Leandro, que me acompanhou por toda essa jornada.

À minha namorada, Lívia, que sempre me apoiou, incentivou e escutou, que compreendeu meus momentos de ausência e até acompanhou alguns experimentos.

Aos colegas e técnicos do laboratório, que fizeram o dia a dia no laboratório dinâmico e agradável, condição primordial para o bom desenvolvimento do meu trabalho.

À doutoranda Cinthia Gabriel, que com toda a paciência e solicitude me instruiu e acompanhou durante a realização de alguns dos meus experimentos.

À companheira de bancada, Daniele Assad, com quem trabalhei mais proximamente durante toda a construção dessa dissertação, pelos conselhos e disposição invejável.

À doutora Silvia Elias, Silvinha, com quem aprendi muito do que sei sobre a rotina laboratorial e cultura de células, pela paciência e pelo exemplo de pessoa e pesquisadora que tem sido para mim nesses últimos 5 anos.

Ao professor Ricardo Della Coletta, por me receber generosamente em seu laboratório e colocar seu conhecimento à disposição.

À professora Eliete Guerra, que me inspira essa paixão pela pesquisa científica, e tem me guiado por esse caminho com uma energia contagiante, um vigor incomparável e uma dedicação maternal, sempre disposta a ensinar, corrigir, mostrar e demonstrar de modo pragmático e acolhedor.

A Deus, que me mostra os caminhos e me guarda enquanto sigo por eles.

“Was ich weiß, kann jeder wissen. Mein Herz hab' ich allein..”

Johann Wolfgang von Goethe
Die Leiden des jungen Werthers

RESUMO

A via PI3K/AKT/mTOR apresenta-se superativada nos carcinomas escamosos de cabeça e pescoço (HNSCC). O estudo de substâncias que tenham por alvo as proteínas efetoras dessa via é de fundamental importância para o desenvolvimento de terapias para o câncer que sejam mais efetivas, mais específicas e menos deletérias aos pacientes. Com essa justificativa, objetivou-se com esse trabalho a avaliação dos efeitos biológicos dos inibidores de mTOR em linhagens celulares de HNSCC. O tratamento das linhagens SCC-9 (carcinoma de língua), FaDu (carcinoma de hipofaringe) e HaCaT (queratinócitos) com everolimus e temsirolimus, inibidores rapanálogos, e ainda com curcumina, resveratrol e EGCG, inibidores derivados da dieta, em diversas concentrações, possibilitou o estabelecimento de uma curva dose-resposta para cada substância em cada linhagem. A partir das curvas, foram calculados valores de IC₅₀, com os quais os experimentos subsequentes foram realizados. O índice de seletividade tumoral foi calculado, e a curcumina e o everolimus mostraram-se seletivos para as linhagens SCC-9 e FaDu em relação à célula HaCaT. Em associação à radioterapia, os inibidores demonstraram efeito sinérgico significativo na linhagem FaDu ($p < 0,05$), o que não foi observado na célula HaCaT, indicando também seletividade para a linhagem neoplásica. O everolimus causou inibição da migração celular das linhagens FaDu e HaCaT a partir de 24h ($p < 0,05$). O everolimus ainda induziu apoptose na célula SCC-9 ($p < 0,05$) e interrompeu o ciclo celular das linhagens SCC-9 e FaDu na fase S ($p < 0,05$). Um perfil de morte celular incerto de apoptose tardia ou necrose foi observado nas células SCC-9 e FaDu tratadas com temsirolimus ($p < 0,05$). A curcumina causou interrupção do ciclo celular na fase G₂/M nas linhagens SCC-9 e FaDu ($p < 0,05$). Observou-se ainda a inibição da expressão da proteína p-mTOR pelo teste de *western blot* na linhagem FaDu tratada com curcumina. Tais resultados instigam novos estudos que aprofundem o conhecimento sobre a ação e mecanismos dos inibidores de mTOR, viabilizando sua aplicação clínica.

Palavras-chave: Inibidores de mTOR; Câncer de Cabeça e Pescoço; Viabilidade Celular; Ciclo Celular; Apoptose.

ABSTRACT

The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is overactivated in head and neck cancers, and the study of substances which target effector proteins of this pathway is important for the development of therapeutic options that are more effective and specific and less deleterious to the patient. With such justification, this study had as objective evaluating the effects of mTOR inhibitors in head and neck cancer cell lines. By treating SCC-9 (tongue carcinoma), FaDu (hypopharynx carcinoma) and HaCaT (oral keratinocytes) cell lines with Everolimus and Temsirolimus, both rapalogs, and Curcumin, Resveratrol and EGCG, diet-derived inhibitors, in different concentrations, it was possible to establish dose-response curves for each substance with each cell line. IC₅₀ values were obtained and used for subsequent experiments. A tumour selectivity index was calculated, and curcumin and everolimus were found to be selective to SCC-9 and FaDu cell lines. When combined with radiotherapy, all inhibitors demonstrated a significant synergic effect on FaDu cell line ($p < 0.05$), which was not observed on HaCaT and indicates the combination as selective to neoplastic cells. Everolimus cause cell migration inhibition in FaDu and HaCat from 24h of treatment on ($p < 0.05$), resulted in apoptosis in SCC-9 ($p < 0.05$) and arrested cell cycle in S-Phase in SCC-9 and FaDu cells ($p < 0.05$). A doubtful cell death profile of late apoptosis or necrosis was observed in SCC-9 and FaDu cells treated with temsirolimus ($p < 0.05$). Curcumin caused a cell cycle arrest in G₂/M in both SCC-9 and FaDu cells ($p < 0.05$) and inhibited p-mTOR expression, as observed in the western blot assay performed with FaDu cells. Such results instigate new studies that help construct the knowledge on the action and mechanisms of the mTOR inhibitors and make their clinical application feasible and more comprehensive.

Keywords: mTOR Inhibitors; Head and Neck Neoplasms; Cell Survival; Cell Cycle; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do ciclo celular e seus devidos reguladores	18
Figura 2	Representação esquemática das vias extrínseca e intrínseca da apoptose	20
Figura 3	Representação esquemática da cascata de sinalização PI3K/AKT/mTOR	21
Figura 4	Fórmulas estruturais das moléculas de rapamicina, everolimus, temsirolimus, curcumina, resveratrol e EGCG	24
Figura 5	Curvas dose-resposta dos inibidores de mTOR em FaDu	35
Figura 6	Curvas dose-resposta dos inibidores de mTOR em SCC-9	36
Figura 7	Curvas dose-resposta dos inibidores de mTOR em HaCaT	37
Figura 8	Efeito dos inibidores de mTOR derivados da dieta em concentração de 50 μ M	40
Figura 9	Efeito dos inibidores de mTOR rapanálogos em concentração de 10 μ M	41
Figura 10	Viabilidade celular (%) na linhagem FaDu com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores de mTOR no IC ₅₀	42
Figura 11	Viabilidade celular (%) na linhagem HaCaT com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores de mTOR no IC ₅₀	43
Figura 12	Avaliação do fechamento de lesão em monocamada das linhagens FaDu e HaCat após tratamento com curcumina e everolimus	45
Figura 13	Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem FaDu pós-tratamento com os inibidores de mTOR curcumina e everolimus	46
Figura 14	Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem HaCaT pós-tratamento com os inibidores de mTOR curcumina e everolimus	47
Figura 15	Distribuição das células da linhagem SCC-9 após tratamento com curcumina, temsirolimus e everolimus	49
Figura 16	Distribuição das células da linhagem FaDu após tratamento com curcumina, temsirolimus e everolimus	50

Figura 17	Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos inibidores de mTOR	51
Figura 18	Distribuição de eventos em SCC-9 marcados com iodeto de propídeo	53
Figura 19	Distribuição de eventos em FaDu marcados com iodeto de propídeo	54
Figura 20	Distribuição das células SCC-9 e FaDu controle e tratadas nas fases do ciclo celular	55
Figura 21	<i>Western blot</i> para a detecção da p-mTOR (mTOR fosforilado) e β -actina na linhagem FaDu	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de IC ₅₀ de inibidores de mTOR nas linhagens FaDu, SCC-9 e HaCaT	34
Tabela 2	Valores de IST para cada inibidor de mTOR com as linhagens SCC-9 e FaDu	38
Tabela 3	Média de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores do mTOR derivados da dieta nas linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT na concentração de 50mM	39
Tabela 4	Média de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores de mTOR rapanálogos nas linhagens FaDu, SCC-9 e HaCaT na concentração de 10 µM	40
Tabela 5	Avaliação da viabilidade celular com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores de mTOR no IC ₅₀	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4E-BP1 – Proteína 1 Ligante a 4E Iniciadora de Tradução Eucariótica
- 7-AAD – 7-aminoactinomicina D
- AKT – Proteína Quinase B
- AMPK – Proteína Quinase α Ativada por AMP
- Apaf1 – Fator Ativante 1 da Protease Apoptótica
- ATCC – American Type Culture Collection
- ATP – Trifosfato de Adenosina
- Bad – Promotor de Morte Associado a Bcl-2
- Bak – Antagonista Assassino de Bcl-2
- Bax – Proteína X Associada a Bcl-2
- Bcl – Linfoma de Célula B
- Bid – Agonista de Morte com Domínio Interativo com BH3
- Bik – Assassino Interativo com Bcl-2
- Bim – Proteína 11 Semelhante a Bcl-2
- BSA – Albumina de Soro Bovino
- CACON-HUB – Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília
- CCI-779 – Temsirolimus
- CDC25C – Proteína Ciclo de Divisão Celular (Cell Division Cycle) 25C
- CDK – Quinase Dependente de Ciclina
- C-Flip – Proteína Inibitória de FLICE celular
- CO₂ – Dióxido de Carbono
- Deptor – Proteína Interativa com mTOR Contendo Domínio DEP
- DFS – Sobrevida Livre de Doença
- DISC – Complexo Sinalizador Indutor de Morte
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- E2F – Fator E2
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EGCG – Epigallocatequina-3-galato
- EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

eIF4E – Fator de Iniciação da Tradução Eucariótica 4E
FADD – Proteína Associada ao Fas com Domínio de Morte
FasL – Ligante de Fas
FDA – *Food and Drug Administration*
FITC - Isotiocianato de Fluoresceína
FKBP – Peptidil-prolil cis-trans isomerase
FRB – Domínio para Ligação de FKBP12-Rapamicina
GPCR – Receptor Acoplado a Proteína G
GTP – Guanosina Trifosfato
h – Hora
HCl – Ácido Clorídrico
HNSCC – Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço
HPV – Papiloma Vírus Humano
IC₅₀ – Concentração capaz de induzir 50% de citotoxicidade celular
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IST – Índice de Seletividade Tumoral
MEK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mLST8 – Proteína 8 Mamífera Letal com SEC13
mRNA – RNA mensageiro
mSin1 – Proteína 1 Associada à Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mTOR – Alvo Mecanístico da Rapamicina
mTORC – Complexo de mTOR
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) Tetrazólio
OMS – Organização Mundial da Saúde
p53 – Proteína 53 (kDa)
p70S6K – Quinase da Proteína Ribossomal S6
PARP – Poli ADP-Ribose Polimerase
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PDK1 – Quinase 1 Dependente de Fosfoinosítídeo
PI3K – Fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP₂ – Fosfatidilinositol-4,5-bifostato
PIP₃ – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifostato
p-mTOR – mTOR fosforilado
PRAS40 – Substrato 1 do AKT1 Rico em Prolina

pRB – Proteína do Retinoblastoma

PS – Fosfatidilserina

PTEN – Homólogo da Fosfatase e Tensina

RAD001 – Everolimus

Raptor – Proteína Regulatória Associada ao mTOR

Rheb – Homólogo do Ras Enriquecido no Cérebro

Rictor – Companheiro do mTOR Insensível à Rapamicina

RIPA – Ensaio de Radioimunoprecipitação

RNA – Ácido Ribonucleico

RT – Radioterapia

S6K1 – Proteína Ribossomal S6 Quinase 1

SFB – Soro Fetal Bovino

TBST – Tampão Tris-Salina com Tween 20

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRADD – Proteína Associada ao TNF tipo I com Domínio de Morte

TSC – Complexo de Esclerose Tuberosa

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	16
2.2 CARCINOGENESE DO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	17
2.3 A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR	21
2.4 OS INIBIDORES DO MTOR	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MÉTODOS	26
4.1 CULTURA DE CÉLULAS	26
4.2 INIBIDORES DE mTOR	27
4.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) – CURVA DOSE-RESPOSTA	27
4.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM OS INIBIDORES DE MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA	28
4.5 TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA – <i>SCRATCH ASSAY</i>	29
4.6 CITOMETRIA DE FLUXO	29
4.7 <i>WESTERN BLOT</i>	31
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5 RESULTADOS	33
5.1 VIABILIDADE CELULAR – CURVA DOSE-RESPOSTA	33
5.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE TUMORAL	38
5.3 VIABILIDADE CELULAR EM CONCENTRAÇÕES FIXAS	39
5.4 VIABILIDADE CELULAR COM INIBIDORES DE MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA	41
5.5 TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA – <i>SCRATCH ASSAY</i>	43
5.6 CITOMETRIA DE FLUXO	48
5.6.1 Morte Celular	48
5.6.2 Ciclo Celular	52
5.7 <i>WESTERN BLOT</i>	56
6 DISCUSSÃO	58
6.1 INIBIDORES DE mTOR RAPANÁLOGOS	58
6.2 INIBIDORES DE mTOR DERIVADOS DA DIETA	61
6.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	65
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o termo “câncer” é utilizado para designar um grande número de doenças, essas caracterizadas por um crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos e podem espalhar-se para outras regiões do corpo, processo conhecido como metástase (1). O câncer foi em 2013 a causa de mais de 8 milhões de mortes em todo o mundo, sendo a segunda causa de morte mais comum, atrás apenas de doenças cardiovasculares (2).

O câncer de cabeça e pescoço, que acomete a cavidade oral, a faringe ou a laringe (3), é mundialmente o sexto mais comum, sendo especialmente incidente no sul e sudeste asiáticos e em partes da Europa e da América do Sul (4). O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC), cujas principais causas são as diferentes formas de consumo de tabaco e álcool (4, 5), é o mais comum dos cânceres de cabeça e pescoço (6). O Papiloma Vírus Humano (HPV) tem sido recentemente considerado também um importante fator etiológico, especialmente para o câncer de orofaringe (7).

O tratamento do HNSCC é multimodal e baseado em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Embora sejam empregadas técnicas cirúrgicas modernas e novas estratégias terapêuticas, as taxas de mortalidade do HNSCC continuam sendo altas em vários países, geralmente com uma taxa de sobrevida global em 5 anos inferior a 50% (5). A morbidade associada ao tratamento do HNSCC também é relevante, consideradas as funções do aparelho mastigatório referentes à fala, à mastigação e à estética, muitas vezes afetadas como consequência do procedimento cirúrgico (8). Assim, há uma necessidade de novas drogas, que sejam significativamente efetivas no tratamento do câncer e menos deletérias à saúde geral dos pacientes (9).

Nesse sentido, a terapia alvo molecular, direcionada a proteínas que desempenham uma função relevante ao processo oncogênico, desponta como uma alternativa potencialmente específica (10, 11). Exemplos de medicamentos alvo-específicos são os inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), tal como o cetuximab, os inibidores da EGFR tirosina-quinase, os inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os inibidores de proteínas tais como a

poli ADP-ribose polimerase (PARP) e o alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), investigados e utilizados em tratamento de diversos tipos de câncer (9).

O estudo de substâncias derivadas de plantas e da dieta também é uma tendência, com resultados indicando o seu uso como agentes quimiopreventivos e adjuvantes, ou mesmo como fonte de moléculas que possam ser aplicadas ativamente ao tratamento do HNSCC (12-14). A curcumina, o resveratrol e a epigallocatequina-3-galato (EGCG), substâncias derivadas de plantas e da dieta, tiveram seu potencial anti-inflamatório, antibiótico e antioxidante avaliados (15, 16). A atividade antitumoral, caracterizada pelo controle da proliferação celular, da sobrevivência, da migração, da invasão, da angiogênese e da metástase, também foi reportada para diversos tipos de câncer (17).

Alterações em nível molecular são descritas como associadas à carcinogênese do HNSCC, dentre as quais a superativação da via PI3K/AKT/mTOR, importante via de sinalização celular que regula a proliferação, a sobrevivência celular e a angiogênese (18, 19). Por esse motivo, essa via de sinalização, seus efetores e seus inibidores têm sido objetos de diversos estudos recentes (19-21).

Dessa forma o presente trabalho propõe-se a avaliar os efeitos dos inibidores de mTOR sintéticos, everolimus e temsirolimus, e derivados da dieta, curcumina, resveratrol e EGCG, em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Uma estimativa sobre a prevalência, a incidência e a mortalidade mundiais do câncer para o ano de 2012, realizada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, da OMS, previu para o câncer de cavidade oral e lábio 300.400 novos casos e aproximadamente 145.400 óbitos em todo o mundo naquele ano, com cerca de 80% desses casos ocorrendo em países em desenvolvimento (22).

No Brasil, segundo uma estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2016 são previstos 17.500 novos casos de câncer de cavidade oral, lábio e laringe em homens, e 5.340 novos casos da doença em mulheres, o que pode ser dimensionado por um risco estimado de 11,27 novos casos de câncer de cavidade oral e lábio a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (23). Excetuando as neoplasias de pele, o câncer de cavidade oral é em homens o quarto mais frequente na região Sudeste, o quinto nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e o sexto na região Sul e o sétimo na região Norte. Em mulheres, é o nono mais frequente na região Nordeste, o décimo na região Sudeste, o 12º nas regiões Norte e Centro-Oeste e o 15º na região Sul (23). Observa-se, portanto, uma maior incidência do câncer de cavidade oral em homens que em mulheres.

Das neoplasias malignas em cabeça e pescoço, aproximadamente 90% são carcinoma espinocelular, também conhecido como carcinoma de células escamosas ou ainda carcinoma epidermóide (6). O HNSCC tem por principal fator de risco o uso do tabaco, em suas diversas formas de consumo (24), e quando o tabaco é associado ao álcool, o risco de desenvolvimento da doença é consideravelmente aumentado (25). Em populações do sul da Ásia também tem importância para a etiologia da doença o hábito de mascar a noz da areca com as folhas de betel, combinação que possui considerável potencial carcinogênico (24).

Especialmente em casos de HNSCC de orofaringe, o HPV também é relevante enquanto agente etiológico (7). Um aumento na incidência de HNSCC de orofaringe tem sido observado nos últimos anos, particularmente em homens de meia-idade (muitas vezes não-fumantes, ex-fumantes ou fumantes em intensidade leve),

quando comparados ao paciente tradicional de HNSCC (homens mais velhos com um significativo histórico de abuso de tabaco e álcool). Tal aumento é atribuído ao HPV, em especial ao subtipo 16, vírus essencial na etiologia do câncer cervical. Esse fato é justificado pela diminuição na idade de início da vida sexual e pelo aumento no número de parceiros sexuais observados nas últimas décadas, tendo em vista que uma infecção orofaríngea por HPV oncogênico é, na maior parte dos casos, consequente de transmissão por relação sexual com contato orogenital (26).

2.2. CARCINOGENESE DO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

São relevantes para a carcinogênese do câncer de cabeça e pescoço os eventos mutagênicos, consequentes principalmente do consumo de tabaco e álcool, responsáveis por diversas alterações genéticas e moleculares. De maneira geral, quando o metabolismo dos carcinógenos do tabaco não ocorre de maneira adequada, quer por polimorfismos genéticos nas enzimas envolvidas no processo metabólico ou pela alta quantidade de carcinógenos presente no organismo, há lesão em DNA, que resulta em expressão anormal de proteínas, e consequente desenvolvimento de mecanismos para evadir a apoptose, instigar a angiogênese, maximizar o potencial proliferativo e promover invasão tecidual e metástase (25).

A progressão das células pelo ciclo celular é um processo fisiológico e essencial para a proliferação celular e desenvolvimento do organismo, e anormalidades em componentes que regulam esse processo são descritas para a maioria das neoplasias humanas (27). O ciclo celular, esquematizado na Figura 1, é caracterizado por duas fases distintas: a interfase (constituída pelas fases G_1 , S e G_2) e a mitótica (fase M), e coordenado por complexos de ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDK), que são diversas e têm funções distintas em cada *checkpoint* do ciclo celular (27). As CDK2, CDK4, CDK6, bem como a ciclina D e a ciclina E, são exemplos de proteínas envolvidas na transição da fase G_1 para a fase S (27). Já a CDK1, a CDC25C, a ciclina A e a ciclina B estão envolvidas na transição da fase G_2 para a fase M (27). A proteína do retinoblastoma (pRB) é um outro importante regulador do ciclo celular. Na sua forma hipofosforilada, encontra-se ligada à proteína Fator E2 (E2F), condição na qual a E2F mantém-se inativa e o ciclo celular permanece paralisado na fase G_1 (28). Quando os complexos ciclina-CDK fosforilam pRB, a E2F

é liberada e pode então atuar como fator de transcrição que controla a expressão de genes essenciais para a progressão do ciclo celular e para a proliferação celular (28).

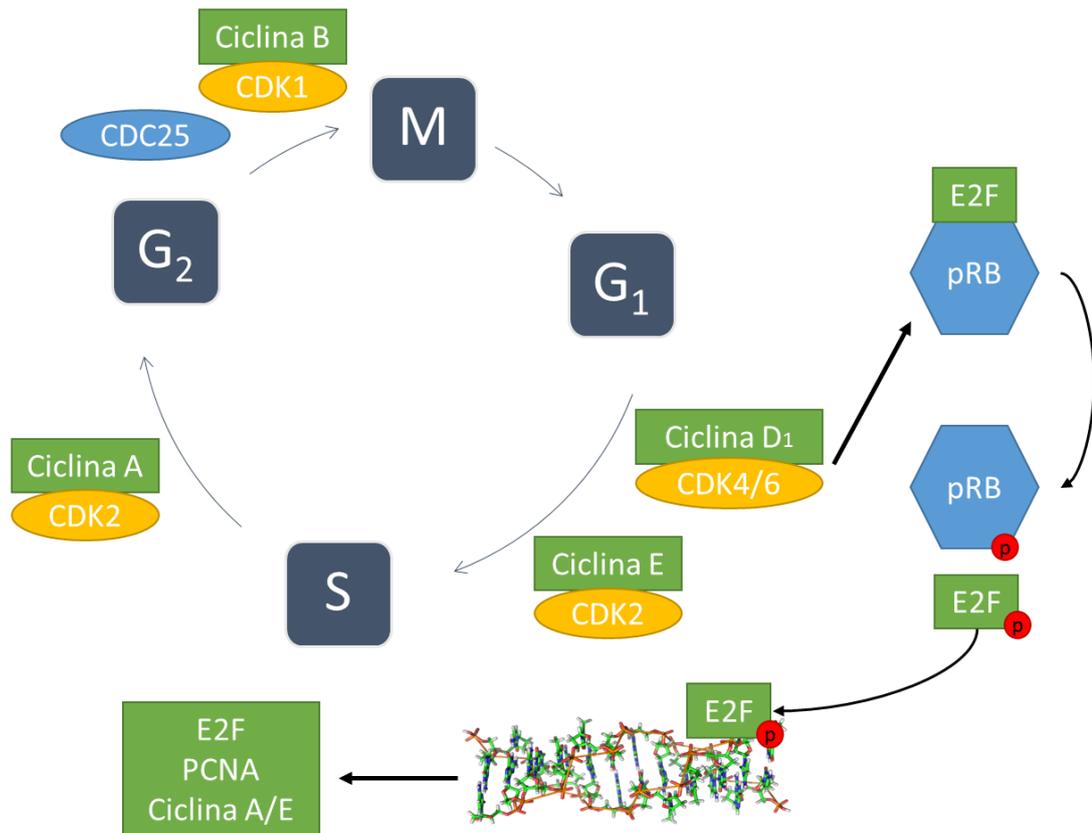


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo celular e seus devidos reguladores. Figura adaptada do artigo de Sobolewski *et al.*, 2010 (29).

A superexpressão de proteínas do ciclo celular foi observada em estudos clínicos e pré-clínicos com diversos tipos de câncer, o que evidencia a importância das alterações no ciclo celular para a carcinogênese. Especificamente no HNSCC, foi descrita a superexpressão das proteínas ciclina A, ciclina B e ciclina D, em suas diversas isoformas, assim como mutações nos genes que as codificam (30).

A apoptose é um dispositivo de morte celular programada inerente aos organismos multicelulares e presente desde os estágios iniciais de desenvolvimento até a vida adulta. É iniciada por uma variedade de estímulos externos e internos, tais como a irradiação, drogas, alguns hormônios e proteínas relacionadas à resposta inflamatória, ocorrendo por mecanismos controlados (31). A apoptose é caracterizada por uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas, tais como a perda de assimetria, fragmentação nuclear e fragmentação de DNA cromossomal, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (28).

Dois mecanismos principais, esquematizados na Figura 2, engatilham a apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca (32). Em ambas as vias, as caspases desempenham um papel fundamental enquanto mediadoras desses processos. As caspases iniciadoras, tais como a caspase-8 e a caspase-9, têm a função de clivar pró-formas inativas de caspases efetoras, tais como a caspase-3 e a caspase-7, cujas formas ativas conduzem à morte celular por apoptose (32).

A via extrínseca é iniciada pela ligação de Ligante Fas (FasL) ou Fator de Necrose Tumoral (TNF) aos seus respectivos receptores de membrana, com recrutamento das proteínas adaptadoras FADD (para receptores de Fas) e TRADD (para receptores de TNF). Tais proteínas se associam à pró-caspase-8, formando o Complexo Sinalizador Indutor de Morte (DISC), que promove a ativação autocatalítica da pró-caspase-8. A caspase-8 então cliva pró-caspase-3 e pró-caspase-7, tornando-as ativas e iniciando a fase de execução da apoptose (31).

A via intrínseca ou mitocondrial é em grande parte controlada por membros da família Bcl-2, que podem agir como promotores ou inibidores da apoptose (32). As proteínas Bcl-2, Bcl-x e Bcl-w são algumas proteínas antiapoptóticas dessa família, e as Bcl-10, Bax, Bak, Bid e Bad são exemplos de proteínas com atividade pró-apoptótica (31). Essas proteínas são importantes por determinar se a célula inicia a apoptose ou aborta o processo, através do controle da permeabilidade da membrana da mitocôndria. Quando as proteínas pró-apoptóticas estão ativas, a membrana está permeável e ocorre então a translocação de citocromo c do interior da mitocôndria para o citosol. Tal evento possibilita a constituição do apoptossomo, complexo de citocromo c, Apaf-1 e pró-caspase-9, que promove a ativação de caspase-9, que por sua vez promove a ativação das caspase-3 e caspase-7. Estando as proteínas antiapoptóticas ativas, a presença de citocromo-c citosólico diminui e a sinalização para a apoptose por via intrínseca deixa de ocorrer (31). Para a ativação das proteínas da família Bcl-2, proteínas como a p53, especialmente em casos em que se observa lesão irreversível de DNA, e a Proteína Quinase B (AKT), que desempenha função em diversos processos celulares, são de considerável significância (32).

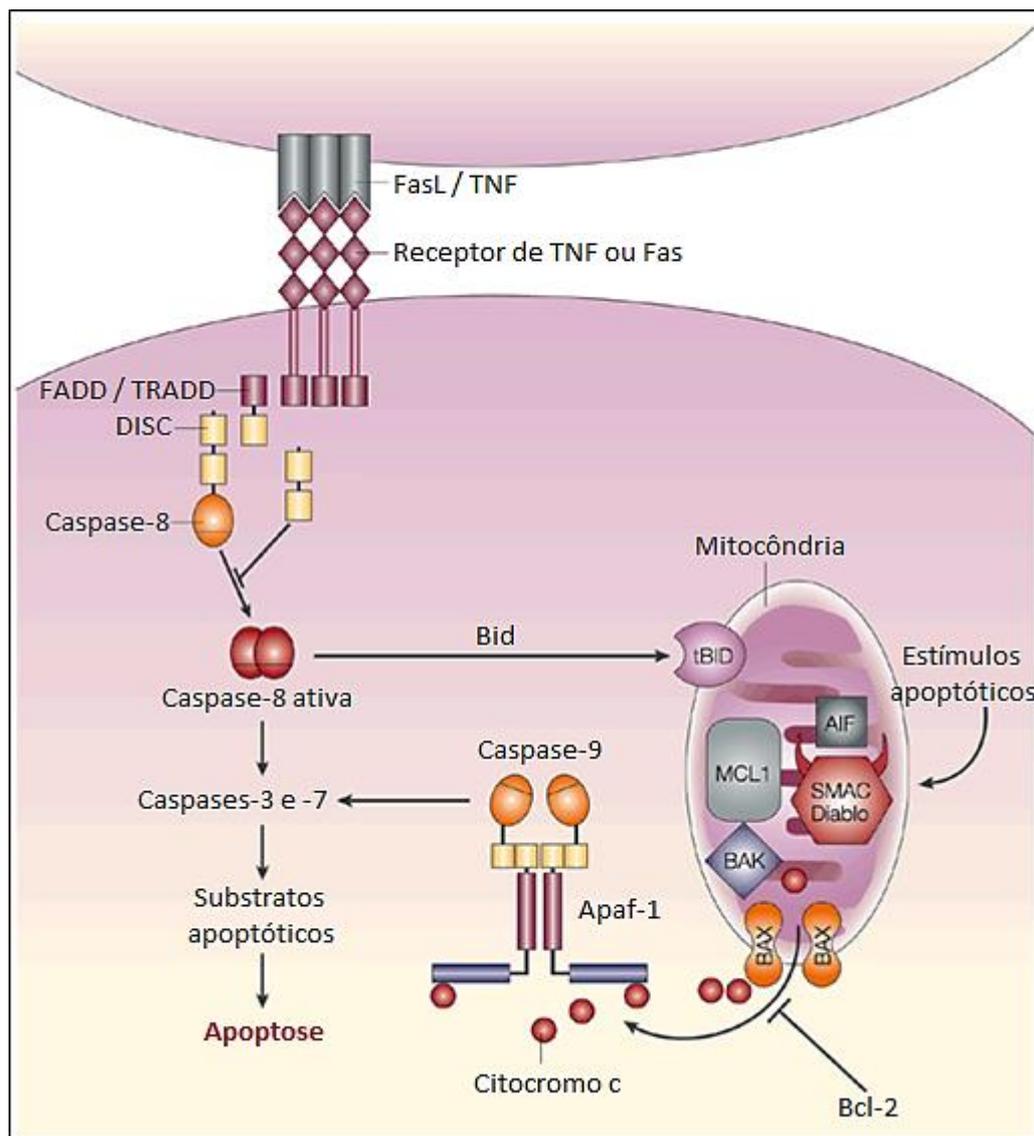


Figura 2 – Representação esquemática das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.
Figura adaptada do artigo de Pope, 2002 (33)

A evasão da apoptose como forma de manter o potencial proliferativo e aberrações gênicas é uma das marcas do câncer. Estudos mostram que há expressão aberrante de genes pró-apoptóticos, diminuição de expressão de proteínas pró-apoptóticas tais como p53, Bax, Bik, Bim e Fas e superexpressão de proteínas antiapoptóticas como o Bcl-2 e o C-Flip em linhagens celulares, modelos animais e amostras clínicas de HNSCC (28, 34, 35). A redução de caspases na forma ativa, especialmente das caspase-3, caspase-7, caspase-8 e caspase-9 também é amplamente descrita no HNSCC (28).

2.3. A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR

A via PI3K/AKT/mTOR, esquematizada na Figura 3, é uma cascata de sinalização em células de mamíferos, cujas operações coordenadoras promovem importantes atividades celulares tais como proliferação, sobrevivência celular e angiogênese (18). Essa via, quando superativada, desempenha também um papel crítico na carcinogênese. Através do controle da ativação do mTOR e seus efetores, esta rede celular, em última análise, regula a tradução do mRNA que codifica proteínas pró-oncogênicas e assim promove a sobrevivência de células malignas, motivo pelo qual tem sido objeto de investigação nas duas últimas décadas (36).

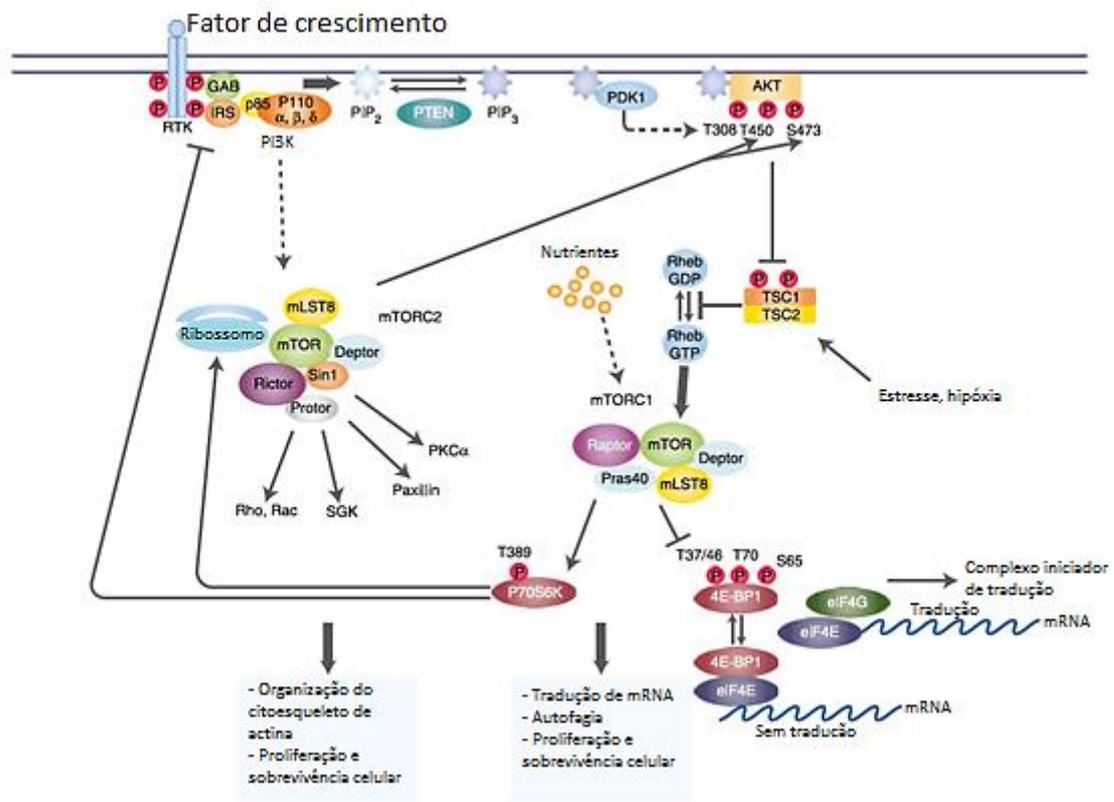


Figura 3 – Representação esquemática da cascata de sinalização PI3K/AKT/mTOR. Figura adaptada do artigo de Willems *et al.*, 2012 (37).

O mTOR é uma serina-treonina quinase e é a subunidade catalítica de dois complexos: mTORC1 e mTORC2 (38). Os estímulos positivos para o mTORC1 são os fatores de crescimento, as citocinas, os nutrientes e o *status* de energia celular (39).

A ligação de fatores de crescimento aos receptores tirosina quinase ou receptores acoplados à proteína G (GPCR) estimula o recrutamento e fosforilação da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), uma quinase lipídica que controla a formação de diferentes complexos de sinalização no interior das células (27). A PI3K ativada leva à conversão de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), negativamente regulada pelo homólogo da fosfatase e tensina (PTEN). O PIP₃ aumentado se liga à proteína AKT na membrana, e em combinação com a fosforilação adicional de AKT pela quinase 1 dependente de fosfoinositídeo (PDK1), assim, a AKT é ativada (40). Uma vez ativa, a AKT se transloca para o citoplasma e núcleo, fosforilando vários substratos efetores, que estão envolvidos na regulação de diversas funções celulares, incluindo mTORC1 (41).

O mTORC1 é composto pelas proteínas mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 e Deptor (40). A AKT pode ativar e fosforilar diretamente o mTOR ou pode ativá-lo indiretamente através do complexo de esclerose tuberosa 2 (TSC2) (42, 43). O TSC2 forma complexo inibitório com o TSC1 para inativar o homólogo do Ras enriquecido no cérebro (Rheb). Quando o TSC2 é fosforilado pela AKT, a atividade do complexo TSC1/TSC2 é inibida, permitindo acúmulo de Rheb ligado à GTP (44). A ativação de Rheb causa a fosforilação do substrato 1 do AKT rico em prolina (PRAS40) e sua dissociação da proteína regulatória associada ao mTOR (Raptor), com resultante ativação do mTORC1 (43). Os efetores do mTORC1 ativado são a proteína ribossomal S6 quinase 1 (S6K1) e a proteína 1 ligante a 4E (4E-BP1), envolvidas na tradução do mRNA e síntese proteica (42). O mTORC2 é composto por mTOR, mLST8 associado a Rictor e mSin 1 (40). O mTORC2 fosforila e ativa diretamente a AKT e outras quinases, estando envolvido também na organização do citoesqueleto e sobrevivência celular (40).

Diversos mecanismos levam à ativação constitutiva da via PI3K/AKT/mTOR nas neoplasias, tais como perda ou inativação do PTEN ou p53, mutação de *PIK3CA* ou *AKT*, alteração das proteínas reguladoras TSC1 ou TSC2 e superexpressão dos receptores de tirosina quinase ou dos efetores do mTOR como a S6K1 ou o fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E) (43, 45). Por essa razão, a via PI3K/AKT/mTOR e seus inibidores em HNSCC têm sido objetos de diversos estudos (19-21).

2.4. OS INIBIDORES DO MTOR

A rapamicina, também conhecida como sirolimus, é o protótipo do inibidor de mTOR. É produzida pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus* e foi primeiramente encontrada em amostras do solo na Ilha de Páscoa em 1975 (46). A pobre solubilidade aquosa e estabilidade química da rapamicina restringiram sua aplicação na terapia do câncer, apesar da atividade antiproliferativa contra diversos tipos de neoplasias em estudos pré-clínicos. Dessa forma, diversos análogos da rapamicina (rapanálogos), com propriedades farmacológicas mais favoráveis, foram desenvolvidos, incluindo CCI-779 (Temsirolimus, Wyeth) e RAD001 (Everolimus, Novartis) (40). As fórmulas estruturais dessas moléculas são apresentadas na Figura 4.

A rapamicina e seus rapanálogos agem como inibidores alostéricos específicos de mTORC1 (43). O temsirolimus e o everolimus são pró-drogas semi-sintéticas cujo metabólito ativo é a rapamicina. Esses fármacos formam complexo inibitório com seu receptor intracelular FKBP12. Esse complexo se liga ao domínio para ligação de FKBP12-rapamicina (FRB) do mTOR, levando à inibição da função catalítica do mTORC1, interferindo na tradução de proteínas fundamentais que codificam RNA mensageiros (mRNAs), as quais estão envolvidas na regulação do ciclo celular, glicólise e adaptação a condições com baixo teor de oxigênio (hipóxia) (45). Isso inibe o crescimento tumoral e a expressão de fatores induzidos por hipóxia, resultando na expressão reduzida de fatores envolvidos na angiogênese tumoral (47).

Os rapanálogos são diferentes no metabolismo, estrutura e esquema de administração (43). O temsirolimus, um éster de rapamicina, pode ser administrado por via oral ou endovenosa (40). Esse fármaco demonstrou atividade antitumoral em uma variedade de células, em particular de tumores com deleção de PTEN (43), e está aprovado para o tratamento do câncer de rim (39). O everolimus é um análogo da rapamicina disponível na forma oral, também aprovado para tratamento do câncer de rim, tumor neuroendócrino de pâncreas e ainda do câncer de mama (39).

Os produtos naturais derivados da dieta, incluindo a curcumina, o resveratrol, o EGCG, a genisteína e a cafeína, também inibem a sinalização do mTOR direta ou indiretamente (40). O EGCG, um polifenol catequina extraído do chá verde e do chá branco das folhas da *Camellia sinensis*, é um potente antioxidante com potencial

terapêutico (48). Em células de hepatocarcinoma, o EGCG ativou a proteína quinase α ativada por AMP (AMPK), resultando em supressão de efetores de sinalização, incluindo mTOR e 4E-BP1 (49). O resveratrol, um polifenol estibenóide, um flavonóide e uma fitoalexina, extraído da casca e das sementes de uvas vermelhas e negras e também presente no vinho tinto, tem potencial antioxidante e antitumoral (50). Em linhagem de células de glioma, o resveratrol diminuiu a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR e em combinação com a rapamicina aumentou a taxa de morte celular (51). A curcumina, um polifenol natural isolado do rizoma da *Curcuma longa*, tem sido extensivamente estudada, devido a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, e seu efeito positivo no tratamento de doenças crônicas, assim como seu potencial na terapia de diversos tipos de câncer, já foi observado (52, 53). As fórmulas estruturais das moléculas de EGCG, resveratrol e curcumina são apresentadas na Figura 4.

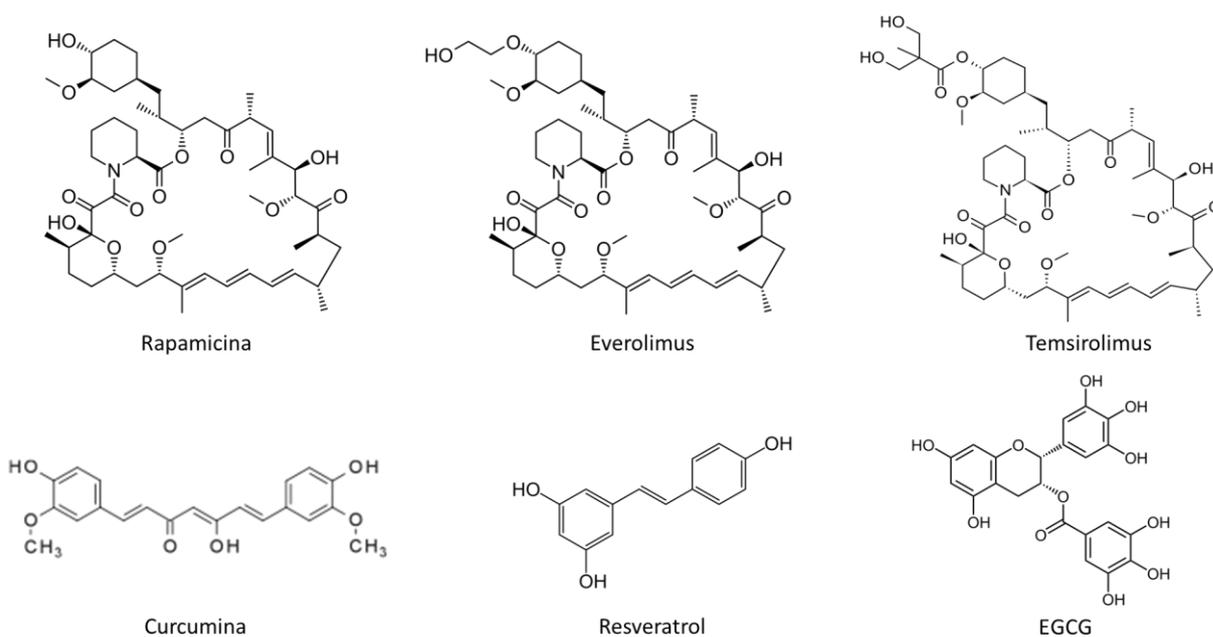


Figura 4 – Fórmulas estruturais das moléculas de rapamicina, everolimus, temsirolimus, curcumina, resveratrol e EGCG.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos inibidores de mTOR, associados ou não à radioterapia, em linhagens de células de carcinoma de hipofaringe (FaDu), de carcinoma de língua (SCC-9) e de queratinócitos humanos (HaCaT).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a viabilidade celular das linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço após tratamento com inibidores de mTOR;
- 2- Identificar a dose necessária (IC_{50}) dos inibidores de mTOR para induzir morte celular nas células de carcinoma de cabeça e pescoço;
- 3- Definir se há seletividade citotóxica dos inibidores de mTOR em células de carcinoma de cabeça e pescoço humano, quando comparadas aos queratinócitos;
- 4- Avaliar a viabilidade celular em células de carcinoma de cabeça e pescoço após tratamento com inibidores de mTOR associados à radioterapia;
- 5- Avaliar a migração celular em linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço tratadas com inibidores de mTOR;
- 6- Avaliar a distribuição no ciclo celular e a presença de células apoptóticas quando tratadas com os inibidores de mTOR;
- 7- Analisar a expressão da proteína mTOR em células tratadas com os inibidores de mTOR.

4. MÉTODOS

4.1. CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas três linhagens celulares humanas imortalizadas para a realização dos experimentos: SCC-9, FaDu e HaCaT. A linhagem SCC-9 é proveniente de carcinoma espinocelular de língua, originada de um paciente de sexo masculino com 25 anos de idade (54). A linhagem FaDu é derivada de carcinoma espinocelular de hipofaringe, estabelecida em 1968 da biópsia um paciente de sexo masculino de 56 anos de idade (55). Como controle foi utilizada a linhagem HaCaT, de queratinócitos humanos. Todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e estão descritas na *American Type Culture Collection* (ATCC).

Para o cultivo de SCC-9, utilizou-se o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) acrescido de meio F12, na proporção 1:1, adicionado de soro fetal bovino a 10%, penicilina e estreptomicina nas concentrações finais respectivas de 100 ng/mL e 1 µg/mL e hidrocortisona a 400 ng/mL. Para as linhagens FaDu e HaCaT o meio de cultura utilizado foi o DMEM também complementado com soro fetal bovino à 10% e penicilina e estreptomicina à 1%. Os meios de cultura foram esterilizados por filtração em membrana de 0,2 µm e mantidos a 4°C, sendo aquecidos em banho-maria à temperatura de 37°C por 10 minutos antes do uso. Todos os reagentes utilizados foram comprados da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

As células foram mantidas em condições ideais, em incubadora com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Em média, a cada três dias era realizado a troca do meio e a cada sete dias o repique celular. Para o repique, o meio de cultivo era descartado, e as células lavadas uma vez com PBS pré-aquecido, sendo em seguida tratadas com solução de tripsina 0,25% acrescida de EDTA 5%, por 5 minutos, à temperatura de 37°C. Após o desprendimento das células da placa de cultivo por digestão enzimática, a tripsina era inativada por adição de meio de cultura completo. As células eram coletadas por centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e o *pellet* de células ressuscitado em meio de cultivo completo. Dessa solução, foram utilizados 10 µL para a contagem de células em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico invertido. O número total de células era calculado por meio da

razão entre o número total das células contadas nos quatro quadrantes x fator de diluição da suspensão de células x 10^4 , dividido por quatro, conforme a fórmula:

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

4

4.2. INIBIDORES DE mTOR

Foram utilizados os inibidores de mTOR rapanálogos, o everolimus e o temsirolimus, e os produtos naturais derivados da dieta o EGCG, o resveratrol e a curcumina. Todos os inibidores de mTOR foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), em forma liofilizada e com grau de pureza padrão analítico. Para os experimentos, uma solução-mãe de cada substância foi preparada. O EGCG (referência E4143, peso molecular 458,370 u) foi diluído em água Milli-Q, em uma concentração de 21816 μM . O resveratrol (referência R5010, peso molecular 228,240 u), a curcumina (referência 08511, peso molecular 368,380 u), o everolimus (referência 07741, peso molecular 958,220 u) e o temsirolimus (referência PZ0020, peso molecular 1030,290 u) foram diluídos em DMSO, em concentrações de 43813, 9953, 10436 e 9706 μM respectivamente. Essas soluções-mãe foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

4.3. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) – CURVA DOSE-RESPOSTA

A viabilidade celular resultante do tratamento com inibidores de mTOR foi aferida pelo teste de avaliação da atividade mitocondrial das células. Esse teste avalia a capacidade das enzimas mitocondriais celulares em reduzir MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) tetrazólio) a formazam. O produto de formazam apresenta uma coloração arroxeada, que após diluído em solvente alcoólico, pode ter sua absorbância aferida em uma leitora de microplaca a 570 nm e comparada à absorbância dos devidos controles.

Para a realização desse experimento, todas as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 5.000 células/poço e mantidas em incubadora em condições ideais por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com os inibidores de mTOR. Os inibidores de mTOR foram diluídos em meio de cultura para obter as concentrações desejadas para a curva dose-resposta, específicas para

cada inibidor. Para o EGCG, as concentrações utilizadas foram de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1,25 μM . Para o resveratrol, as concentrações foram de 150, 100, 50, 25, 10, 5 e 2,5 μM . Com a curcumina, as concentrações foram de 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,75 μM . O everolimus e o temsirolimus foram utilizados nas concentrações de 10, 7,5, 5, 2,5, 1,25, 0,75 e 0,375 μM . As células também foram tratadas com os devidos controles negativos (água milliQ para o EGCG e o DMSO para o resveratrol, a curcumina, o everolimus e o temsirolimus), em concentração semelhante à maior utilizada com cada um dos inibidores de mTOR. Após 24 e 48 horas de tratamento, 10 μL de solução MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) a 5mg/mL eram adicionados aos poços, a cada 100 μL de meio com inibidores de mTOR. As placas eram recobertas com papel alumínio e retornavam a incubadora. Após 4 horas, era aspirado o meio de cultura com a solução de MTT e acrescentados 100 μL de isopropanol acidificado (25 mL de isopropanol + 104 μL de HCl 100%). As placas eram agitadas por 10 minutos à velocidade média. Finalmente, a absorbância das células era verificada em uma leitora de microplaca a 570 nm (*Thermo Plate TP Reader*). Para obter viabilidade resultante do tratamento, a absorbância das células tratadas foi comparada à absorbância de seu controle, estabilizado como 100% de células viáveis.

A concentração necessária dos inibidores para induzir 50% de citotoxicidade celular (IC_{50}) foi calculada e os dados obtidos permitiram estimar o índice de seletividade tumoral (IST), para o qual foi realizada a razão entre o IC_{50} obtido para a célula controle (HaCaT) e para as células neoplásicas (FaDu e SCC-9) conforme publicado anteriormente por Horii *et al.*, 2012 (56), segundo a fórmula:

$$\text{IST} = \frac{(\text{IC}_{50} \text{ célula controle})}{(\text{IC}_{50} \text{ células neoplásicas})}$$

4.4. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM OS INIBIDORES DE MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA

As linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT foram plaqueadas em 02 placas distintas de 96 poços na densidade de 5.000 células/poço e mantidas nas condições ideais de crescimento em incubadora. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com os inibidores de mTOR no IC_{50} e seus respectivos controles negativos. Depois de 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi removido e foram

acrescentados 100 μ L de PBS em cada um dos poços. As placas foram transportadas para o Centro de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília (CACON-HUB), sendo uma das placas irradiada a 2 Gy/min com acelerador linear Siemens Primus (Malvern, EUA) com 6MV *photon beams*. A outra placa foi armazenada em meio ambiente sem irradiação. Após a radioterapia as placas retornavam ao laboratório, o PBS era aspirado e as células mantidas em 100 μ L de meio de cultura em condições ideais por 24 horas. Decorrido esse tempo, as células eram submetidas ao teste MTT e a absorbância das células medida. Os valores relativos de viabilidade celular referentes às células submetidas à radioterapia foram comparados aos das células que não sofreram radiação.

4.5. TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA – SCRATCH ASSAY

Para realizar o ensaio de fechamento da ferida foram utilizadas placas de 6 poços. Para o preparo das placas, foram adicionados 2 mL de solução de fibronectina à 10 μ g/mL em cada poço, e a placa foi incubada à 4°C *overnight*. Após incubação, a solução de fibronectina foi aspirada e a placa permaneceu no fluxo laminar até secar completamente. As placas foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

Para o plaqueamento, as células foram usadas em concentração de 1×10^6 células/poço. Após 24h, a monocamada de células foi riscada manualmente com uma ponta de pipeta de plástico amarelo (200 μ L), lavada com PBS e tratada com a solução de inibidores de mTOR na concentração referente ao IC₅₀ ou controle negativo. Os poços foram fotografados nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas, em um microscópio invertido (Zeiss Primo Vert, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera digital (Zeiss ERC 5s, Göttingen, Alemanha) em objetiva de 10x, com o software ZEN Blue Edition (Zeiss, Göttingen, Alemanha). O fechamento da ferida foi medido através da área da ferida em cada período de tempo, e expresso como porcentagem da área inicial no tempo zero, com os inibidores de mTOR comparados aos seus respectivos controles. Para essa medida foram utilizadas áreas de 3 poços independentes para cada tratamento.

4.6. CITOMETRIA DE FLUXO

No presente trabalho utilizamos duas aplicações diferentes da técnica, a primeira com objetivo de identificar a ação dos inibidores do mTOR nas fases do ciclo

celular e a segunda aplicação com o objetivo de identificar o provável perfil de morte celular induzido pelos tratamentos propostos.

Para a avaliação do ciclo celular, as células SCC-9 e FaDu foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 6 poços e mantidas à 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. O cadenciamento das células foi realizado com meio de cultura sem adição de SFB durante 24h para a SCC-9 e 48h para a FaDu. Após o cadenciamento, foi realizado o tratamento das células com os inibidores de mTOR no IC₅₀, diluídos em meio de cultura acrescido de SFB. Após 24 horas de tratamento, as células foram recolhidas, fixadas com etanol 70% e mantidas à temperatura de -20°C. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram coradas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e mantidas no escuro à 4°C por pelo menos 1 hora. As amostras devidamente marcadas foram examinadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, New Jersey, EUA). Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada amostra. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o programa ModFit LTTM (BD Biosciences, New Jersey, EUA).

Com o objetivo de identificar o perfil de morte celular induzido pela ação dos inibidores de mTOR, as linhagens SCC-9 e FaDu foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço em placa de 6 poços e mantidas em condições ideais por 24 horas. Após 24 horas de exposição das células ao tratamento com os inibidores de mTOR, o meio de cultura em que as células estavam foi armazenado em tubos falcon de 15 mL, as células tripsinizadas e armazenadas no mesmo tubo que continha o meio de tratamento e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado, as células lavadas com 1 mL de PBS gelado e novamente centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos). O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação 1x. Para cada linhagem foi realizada uma leitura sem nenhuma marcação a fim de determinar a fluorescência natural das células. As amostras foram coradas com Anexina V-FITC e 7-AAD, utilizando-se do kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, New Jersey, EUA), conforme instruções do fabricante, e posteriormente analisadas no citômetro de fluxo.

A marcação das células com anexina permite detectar a presença de apoptose pela dosagem de fosfatidilserina (PS), que predominantemente é observada

na superfície interna da bicamada lipídica celular, voltada para o citosol. Nas células em processo inicial de apoptose, quando a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. A anexina V é uma proteína que se liga aos fosfolipídios e possui alta afinidade pela PS na presença de íons de cálcio. Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo. O marcador nuclear intercalante fluorescente, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), é utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas visto que ele tem forte afinidade por DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Desse modo, corar células simultaneamente com Anexina V-FITC e 7-AAD permite a discriminação de células intactas, viáveis (A- 7-AAD-), no início de apoptose (A+ 7-AAD-), células tardiamente apoptóticas (A+ 7-AAD+) ou necróticas (A- 7-AAD+).

4.7. WESTERN BLOT

Para a análise da expressão das proteínas de interesse, a linhagem FaDu foi plaqueada na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 6 poços e mantidas à 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após 24 horas de tratamento, o meio em que as células estavam foi descartado e as placas lavadas com 5 mL de PBS gelado. As células foram destacadas com o auxílio de rodos para células em cultura, transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado o tampão de lise RIPA. Em seguida foi feita a homogeneização *updown* com seringa e centrifugação a 12.000 rpm à 4°C por 20 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -80°C. As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Uma curva-padrão foi construída com BSA (albumina de soro bovino). As absorbâncias encontradas das proteínas foram interpoladas com a curva de BSA, determinando assim a concentração de proteínas totais em cada amostra.

Após a determinação da concentração dessas proteínas, uma amostra foi preparada (40µg de proteínas + tampão de amostra com betamercaptoetanol e água destilada suficiente para completar 20µL), as proteínas foram desnaturadas a uma temperatura de aproximadamente 96°C por 5 minutos e depois mantidas no gelo por no mínimo 5 minutos, prontas para serem aplicadas em um gel de acrilamida com

concentração de 10%. Em seguida, foram aplicados 20 μ L de amostra em cada poço e foi submetido a uma corrente de 110V por aproximadamente 2 horas. Após a corrida no gel de acrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, previamente ativada com metanol. Essa transferência ocorreu após a submissão a uma corrente de 24V por 1 hora e 30 minutos. Nesse processo, as proteínas, separadas no gel por peso molecular, passam então para membrana. A membrana foi submetida a bloqueio, com solução bloqueadora 10% (albumina do leite) *overnight*. Após este tempo, a membrana foi lavada com tampão Tris-salina (0,2 M) e 0,1% de Tween 20 (TBST) e foi incubada com anticorpo primário β -actina (Santa Cruz, Dallas, EUA) em uma concentração de 1:1000 *overnight* e em seguida incubada com anticorpo secundário *anti-goat* (Santa Cruz, Dallas, EUA) em uma concentração 1:6000 por 1 hora. Foi aplicado ECLPRIME (GE, Little Chalfont, Reino Unido), reagente que contém o substrato para enzima ligada ao anticorpo secundário, por 5 minutos. O filme foi exposto por 5 minutos e revelado. Essa mesma membrana foi novamente incubada *overnight* com anticorpo primário p-mTOR, de 220 kDa, com concentração de 1:300 e em seguida com o anticorpo secundário *anti-rabbit* com concentração 1:1500 por 1 hora. Foi aplicado o ECLPRIME e revelado.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com pelo menos três triplicatas independentes para os testes de viabilidade celular e em triplicatas independentes para os demais experimentos. As curvas dose-resposta foram feitas por regressão não linear, com variável *slope* da dose de inibição *versus* resposta e cálculo do IC₅₀. Para a avaliação da viabilidade celular com concentrações fixas, foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn em amostras sem distribuição normal e o OneWay ANOVA com teste de Tukey para amostras com distribuição normal. Para a análise de tipo de morte celular e para a análise de comparação entre as fases do ciclo celular foi utilizado o teste Mann Whitney. Para a análise das áreas das feridas no ensaio de lesão em monocamada e para a análise da associação dos inibidores à radioterapia, foi utilizado o teste de comparação para grupos TwoWay ANOVA, seguida pela análise de Bonferroni. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPadPrism versão 5.0. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. VIABILIDADE CELULAR – CURVA DOSE-RESPOSTA

A viabilidade celular após tratamento com inibidores de mTOR foi avaliada através de ensaio de MTT. Os resultados de absorvância das células tratadas foram comparados com os resultados obtidos do controle negativo, considerados sempre como 100%, após 24 e 48 horas de tratamento. As linhagens foram tratadas com os inibidores de mTOR em distintas concentrações, que resultaram em valores de viabilidade celular também distintos. Para o estabelecimento da curva dose-resposta de cada inibidor, foram utilizados valores de citotoxicidade calculados a partir da viabilidade celular observada em cada concentração. Objetivou-se com a curva dose-resposta determinar o IC₅₀, concentração necessária para causar 50% de morte celular nas linhagens estudadas. Tal valor de IC₅₀ foi calculado individualmente para cada inibidor de mTOR e em cada linhagem celular.

Nas células de carcinoma de língua (SCC-9), o EGCG apresentou IC₅₀ de 618,8 µM em 24h. A variabilidade e a inconsistência dos resultados impossibilitaram o estabelecimento de um valor de IC₅₀ em 48h. Com o resveratrol, o IC₅₀ foi de 329,3 µM em 24h e de 598,2 µM em 48h. A curcumina resultou em IC₅₀ de 40,93 µM em 24h e de 74,42 µM em 48h. O temsirolimus e o everolimus resultaram em valores de IC₅₀ em 24h de 40,08 µM e 12,85 µM, respectivamente, e em 48h de 8,74 µM e 14,18 µM.

Nas células de carcinoma de hipofaringe (FaDu), o EGCG apresentou IC₅₀ de 267,1 µM em 24h, e de 96,52 µM em 48h. Com o resveratrol, a variabilidade e a inconsistência dos resultados impossibilitaram o estabelecimento de um valor de IC₅₀ em 24h, mas tal valor foi de 446,1 µM em 48h. A curcumina resultou em IC₅₀ de 24,84 µM em 24h e de 87,49 µM em 48h. O temsirolimus e o everolimus resultaram em valores de IC₅₀ em 24h de 57,32 µM e 27,4 µM, respectivamente, e em 48h de 42,11 µM e 58,99 µM.

Nos queratinócitos (HaCaT), o EGCG apresentou IC₅₀ de 128,5 µM em 24h, e de 66,29 µM em 48h. Com o resveratrol, o valor de IC₅₀ em 24h foi de 355,3 µM e em 48h de 260,3 µM. A curcumina resultou em IC₅₀ de 47,25 µM em 24h e de 141 µM

em 48h. O temsirolimus e o everolimus resultaram em valores de IC₅₀ em 24h de 26,54 µM e 28,5 µM, respectivamente, e em 48h de 12,85 µM e 83,12 µM, respectivamente.

As curvas dose-resposta dos inibidores de mTOR nas diferentes linhagens em 24h e 48h podem ser analisadas nas Figuras 5, 6 e 7, e os valores de IC₅₀ na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de IC₅₀ de inibidores de mTOR nas linhagens FaDu, SCC-9 e HaCaT em 24h e 48h.

Linhagem	Inibidor	IC₅₀	IC₅₀
Celular	de mTOR	24H	48H
SCC-9	EGCG	618,8	-
	Resveratrol	329,3	598,2
	Curcumina	40,93	74,42
	Temsirolimus	40,08	8,74
	Everolimus	12,85	14,18
FaDu	EGCG	267,1	96,52
	Resveratrol	-	446,1
	Curcumina	24,84	87,49
	Temsirolimus	57,32	42,11
	Everolimus	27,4	58,99
HaCaT	EGCG	128,5	66,29
	Resveratrol	355,3	260,3
	Curcumina	47,25	141,0
	Temsirolimus	26,54	12,85
	Everolimus	28,5	83,12

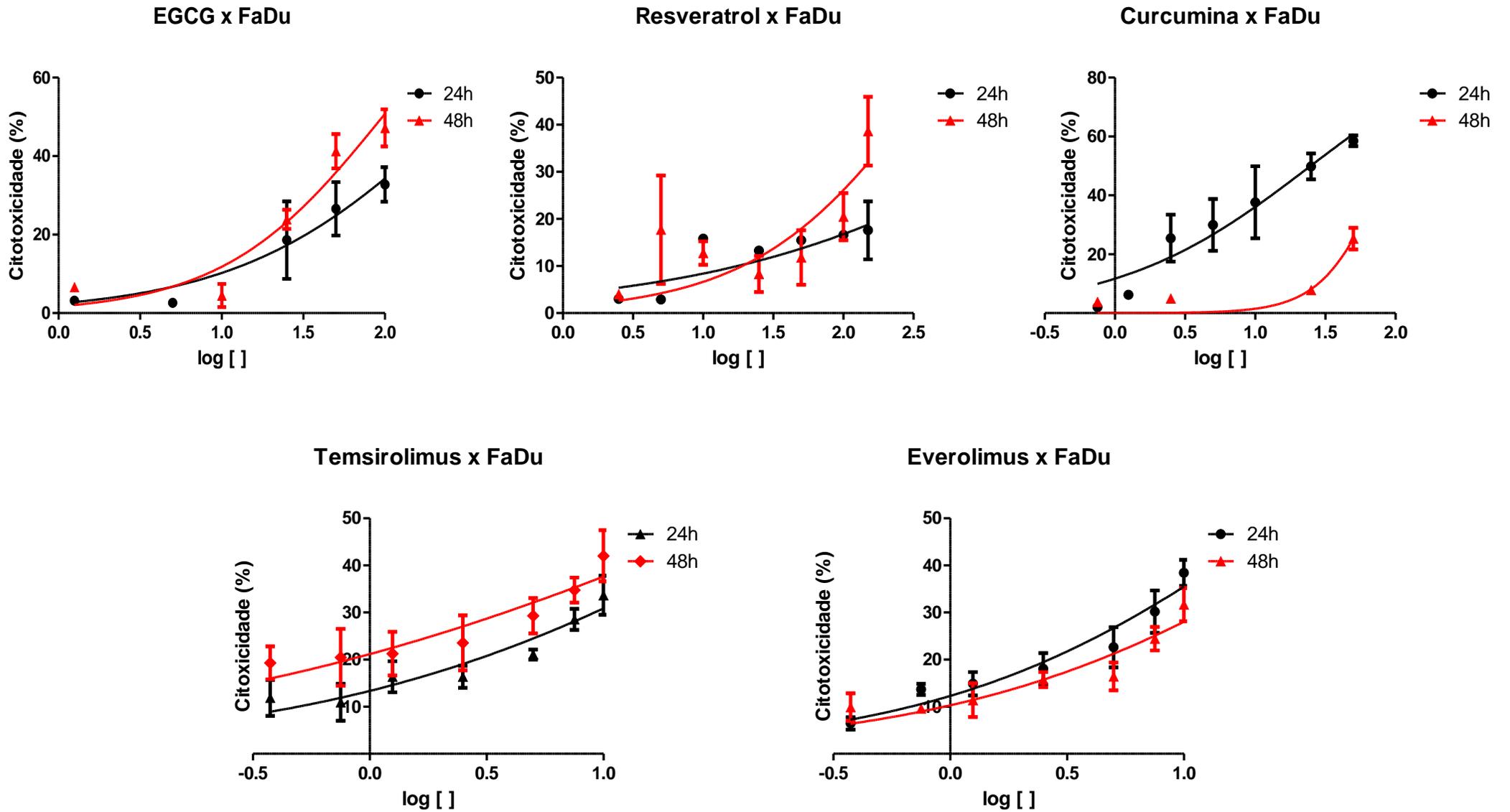


Figura 5 – Curvas dose-resposta dos inibidores de mTOR em FaDu, em 24h e 48h.

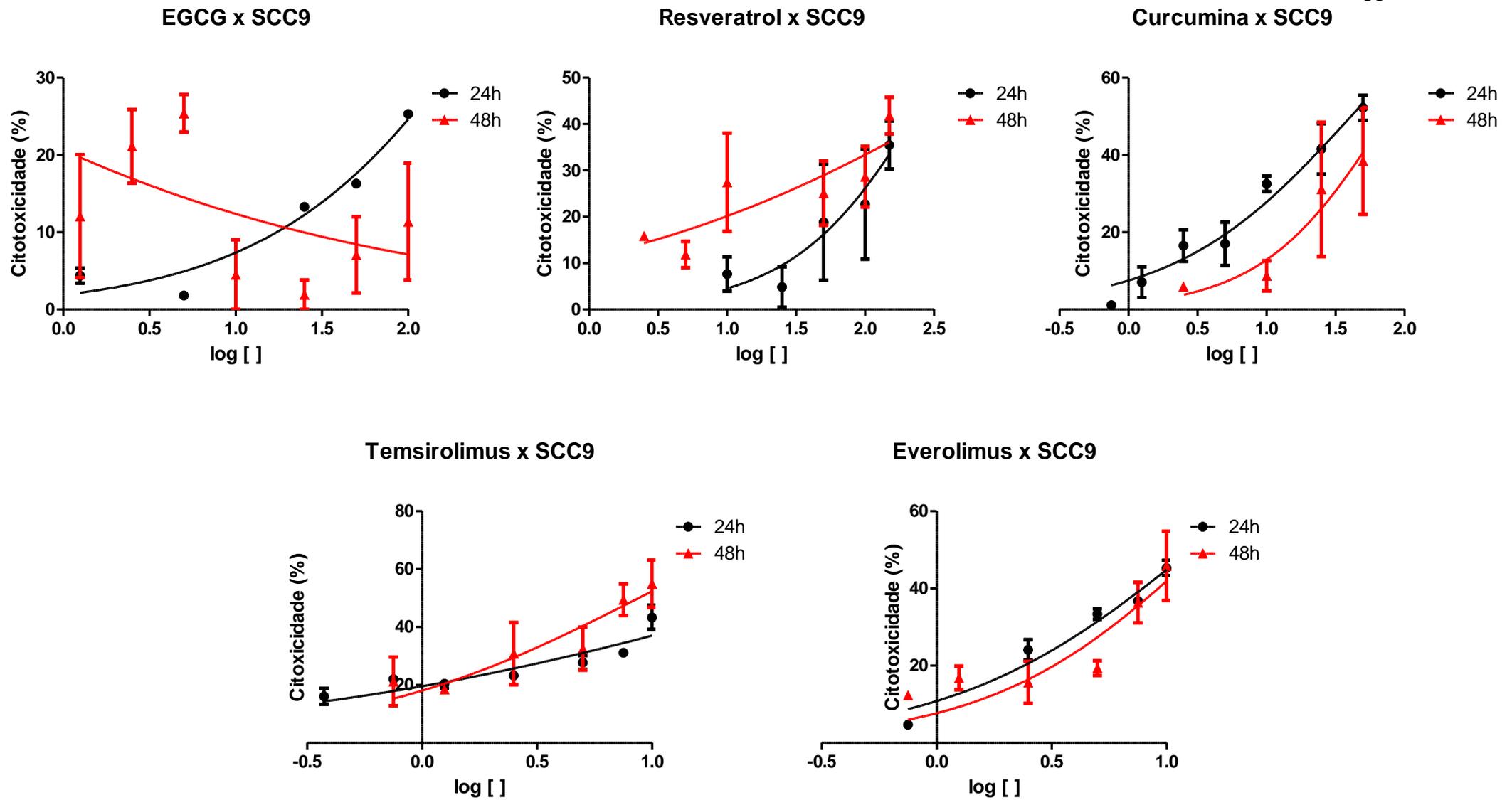


Figura 6 – Curvas dose-resposta dos inibidores de mTOR em SCC-9, em 24h e 48h.

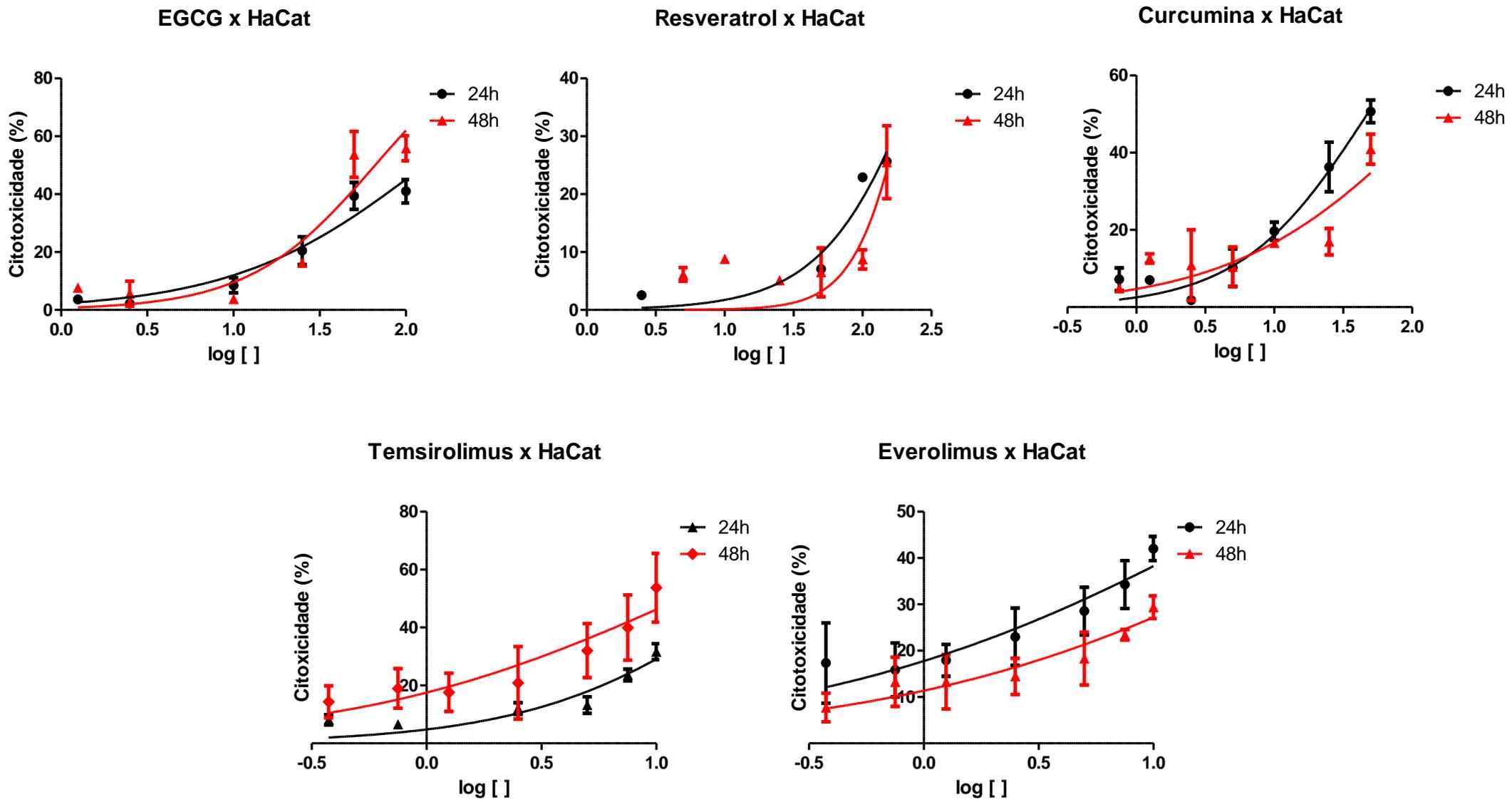


Figura 7 – Curvas dose-resposta dos inibidores de mTOR em HaCaT, em 24h e 48h.

5.2. ÍNDICE DE SELETIVIDADE TUMORAL

Os valores de IC₅₀ permitiram calcular o Índice de Seletividade Tumoral (IST) cada inibidor de mTOR, calculado como a razão entre o IC₅₀ da célula controle (HaCaT) e o das células neoplásicas, FaDu e SCC-9 conforme proposto por Horii *et al.*, 2012 (56). Os valores obtidos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de IST para cada inibidor de mTOR com as linhagens SCC-9 e FaDu em 24h e 48h. # = presença de seletividade

Linhagem Celular	Inibidores de mTOR	IST 24h	IST 48h
SCC-9	EGCG	0,21	-
	Resveratrol	1,08 [#]	0,44
	Curcumina	1,15 [#]	1,89 [#]
	Temsirolimus	0,66	1,47 [#]
	Everolimus	2,22 [#]	5,86 [#]
FaDu	EGCG	0,48	0,69
	Resveratrol	-	0,58
	Curcumina	1,64 [#]	1,61 [#]
	Temsirolimus	0,46	0,31
	Everolimus	1,04 [#]	1,41 [#]

O índice de seletividade igual a 1 significa que não há seletividade entre as linhagens estudadas, menor que 1, significa que o tratamento é mais seletivo para a linhagem de queratinócitos do que para a linhagem neoplásica e maior que 1, significa que há seletividade para a linhagem tumoral estudada.

Assim, pode-se concluir que em 24h, o resveratrol, a curcumina e o everolimus, com IST de 1,08, 1,15 e 2,22, respectivamente, foram seletivos para SCC-9 em relação aos queratinócitos, e somente a curcumina e o everolimus, com IST de 1,64 e 1,04, foram seletivos para FaDu. O EGCG e o temsirolimus mostraram-se mais citotóxicos para os queratinócitos que para as linhagens tumorais em 24h. Com 48h, a curcumina, o temsirolimus e o everolimus, com IST de 1,89, 1,47 e 5,86, respectivamente, foram seletivos para SCC-9, e a curcumina e o everolimus, com IST 1,61 e 1,41 foram mais seletivos para a linhagem FaDu. O EGCG, o resveratrol e o

temsirolimus mostraram-se mais citotóxicos para os queratinócitos que para linhagens tumorais em 48h.

Por não apresentar reprodutibilidade nos resultados, os IST do EGCG em 48h com a SCC-9 e do Resveratrol em 24 com FaDu não foram calculados.

5.3. VIABILIDADE CELULAR EM CONCENTRAÇÕES FIXAS

Para efeito de comparação entre os inibidores de mTOR estudados, foi estabelecida uma concentração fixa, da qual os resultados de viabilidade celular em 24h e 48h foram especificamente avaliados. Consideramos de toxicidade leve os inibidores que resultaram em viabilidade celular entre 50 e 75%, de toxicidade moderada os que resultaram em viabilidade celular entre 25 e 50% e de toxicidade intensa os inibidores que resultaram em viabilidade celular abaixo de 25%.

Para os inibidores derivados da dieta usamos a concentração fixa de 50 μ M, pois esta concentração foi testada nas curvas dose-resposta do EGCG, do resveratrol e da curcumina, e era um valor aproximado ao IC₅₀ da curcumina em SCC-9, FaDu e HaCaT em 24h e do EGCG na HaCaT em 48h. Os valores de viabilidade celular podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Média de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores do mTOR derivados da dieta nas linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT na concentração de 50 μ M (Kruskal-Wallis com Dunn ou OneWay ANOVA com Tukey; * p < 0,05 tratamento *versus* controle negativo).

Inibidores de mTOR 50 μ M	Células Viáveis (%)					
	SCC-9		FaDu		HaCaT	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
EGCG	83,7	89,4	70	58,7*	60,6	46,3*
Resveratrol	81,2	74,9	84,5	88,2	92,9	93,5
Curcumina	47,8*	61,5	41,5*	74,7	49,3*	59,1

Para os rapanálogos usamos a concentração fixa de 10 μ M, pois esta concentração foi testada nas curvas dose-resposta do temsirolimus e do everolimus, e é a maior concentração testada de ambos medicamentos. Os valores de viabilidade celular podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 – Média de células viáveis (%) após o tratamento com os inibidores de mTOR rapanálogos nas linhagens FaDu, SCC-9 e HaCaT na concentração de 10 μM (Kruskal-Wallis com Dunn ou OneWay ANOVA com Tukey; * $p < 0,05$ tratamento *versus* controle negativo).

Inibidores de mTOR 10 μM	Células Viáveis (%)					
	SCC-9		FaDu		HaCaT	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Temsirolimus	56,7	49,6*	66,3*	58*	68,3	46,3*
Everolimus	54,7*	54,1	61,6	68,3	60,4*	70,6*

O efeito dos inibidores de mTOR derivados da dieta na concentração de 50 μM é ilustrado na Figura 8. Houve significância estatística para os resultados de viabilidade celular com EGCG em 48h nas linhagens FaDu e HaCaT com 58,7% e 46,3% de viabilidade celular respectivamente, e a curcumina em 24h nas linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT, com 47,8%, 41,5% e 49,3% respectivamente.

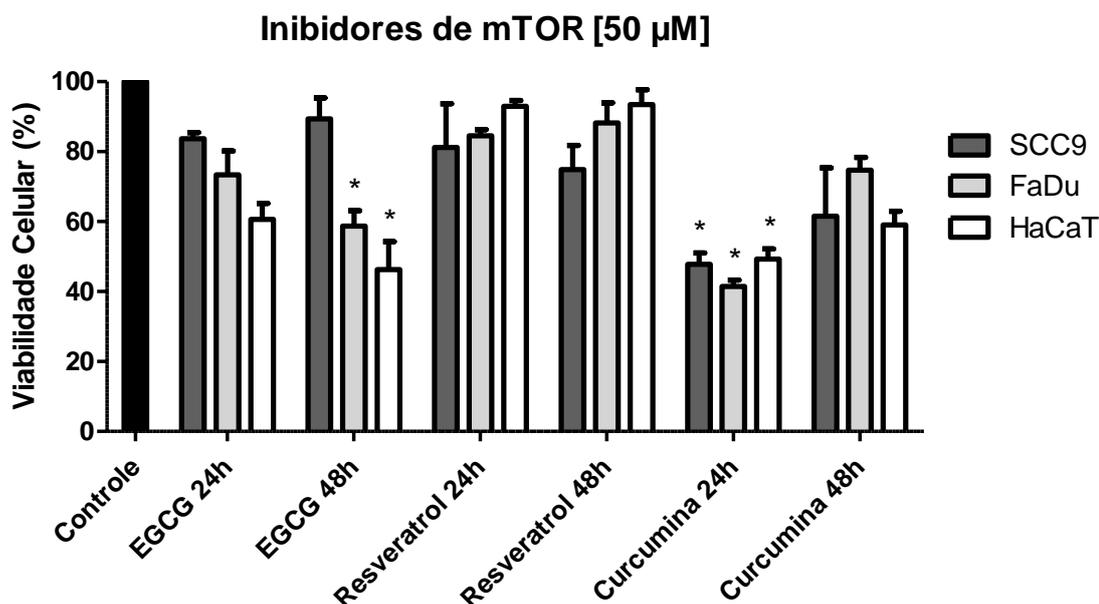


Figura 8 – Efeito dos inibidores de mTOR derivados da dieta em concentração de 50 μM na viabilidade celular nas linhagens FaDu, SCC-9 e HaCaT (Kruskal-Wallis com Dunn ou OneWay ANOVA com Tukey; * $p < 0,05$ tratamento *versus* controle negativo).

O efeito dos inibidores de mTOR rapanálogos na concentração de 10 μM nas linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT é ilustrado na Figura 9. Houve significância estatística para os resultados de viabilidade celular com temsirolimus em 24h na linhagem FaDu, com viabilidade celular de 66,3%, e em 48 com as linhagens SCC-9,

FaDu e HaCaT, com viabilidade de 49,6%, 58% e 46,3% respectivamente. O everolimus também apresentou resultados significantes em 24 horas para a SCC-9 e HaCaT, com viabilidade de 54,7% e 60,4% respectivamente, e em 48 horas para HaCaT, com viabilidade de 70,6%.

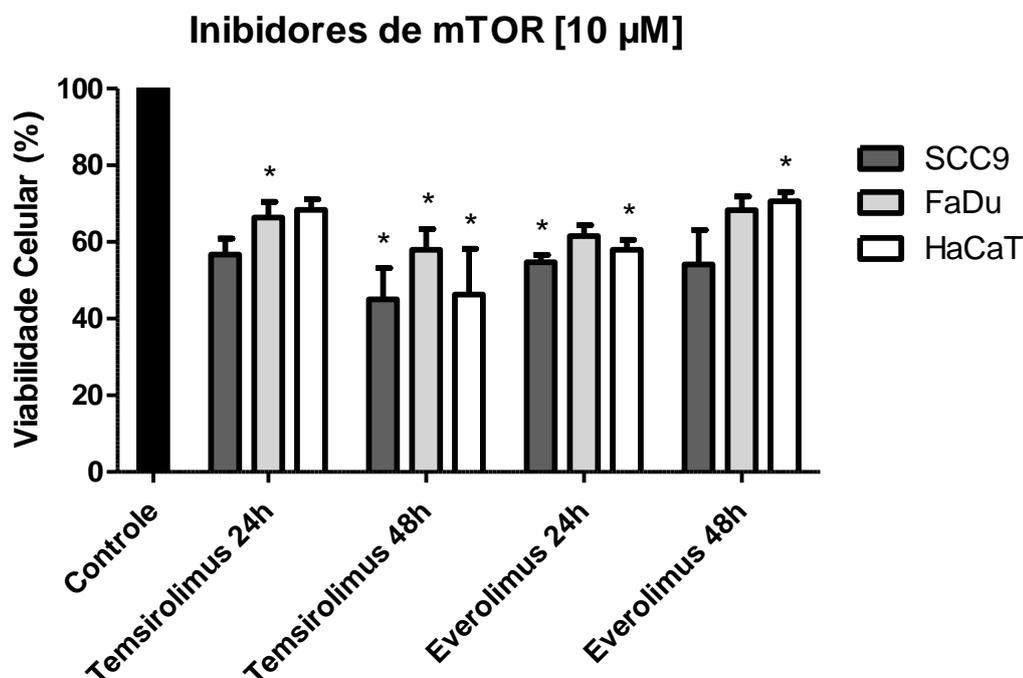


Figura 9 – Efeito dos inibidores de mTOR rapanólogos em concentração de 10 μ M na viabilidade celular nas linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT (Kruskal-Wallis com Dunn ou OneWay ANOVA com Tukey; * $p < 0,05$ tratamento *versus* controle negativo).

5.4. VIABILIDADE CELULAR COM INIBIDORES DE MTOR ASSOCIADOS À RADIOTERAPIA

A viabilidade celular resultante do tratamento com radioterapia em dose única de 2 Gy/min associado ao tratamento com os inibidores do mTOR no IC₅₀ é apresentada na Tabela 5, para avaliar o efeito supra-aditivo dos inibidores de mTOR em associação à radioterapia. O ensaio foi realizado com as três linhagens celulares, mas os resultados referentes à linhagem SCC-9 não foram aqui descritos, por se apresentarem inconsistentes e incongruentes.

Tabela 5 – Avaliação da viabilidade celular com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores de mTOR no IC₅₀ (TwoWay ANOVA com Bonferroni; * p < 0,05 radioterapia *versus* sem radioterapia).

Inibidor de mTOR IC ₅₀	Viabilidade celular %			
	Sem RT		Com RT	
	FaDu	HaCaT	FaDu	HaCaT
Curcumina	52,9	42,4	20*	46,2
Temsirolimus	53,7	54,4	20,2*	48,1
Everolimus	47,4	51,4	19*	39,7

Tais valores de viabilidade celular na linhagem FaDu são graficamente representados na Figura 10, com a qual é possível observar que a viabilidade celular resultante do tratamento com todos os inibidores de mTOR associados à radioterapia é significativamente menor que a viabilidade celular observada após tratamento com os inibidores de mTOR utilizados sozinhos. Não foi identificada diferença entre a viabilidade de células do controle negativo e a de células tratadas somente com a radioterapia.

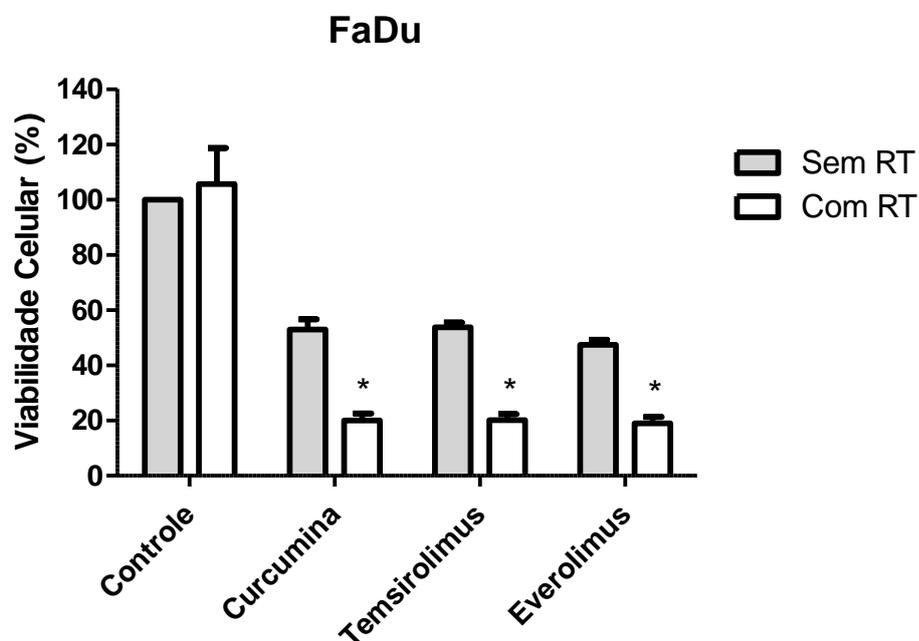


Figura 10 – Viabilidade celular (%) na linhagem FaDu com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores de mTOR no IC₅₀ (TwoWay ANOVA com Bonferroni; * p < 0,05 radioterapia *versus* sem radioterapia).

Na linhagem HaCaT não há diferença estatística entre a viabilidade celular resultante do tratamento com os inibidores de mTOR associados à radioterapia e a viabilidade celular observada após tratamento com os inibidores de mTOR exclusivos, como ilustra a Figura 11. Também não foi encontrada diferença entre a viabilidade de células do controle negativo e a de células tratadas somente com a radioterapia.

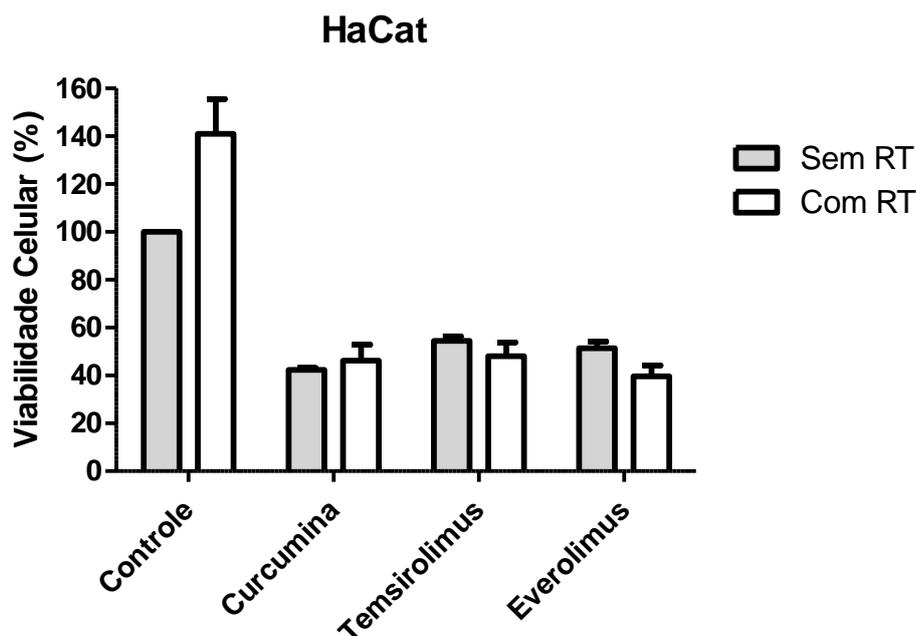


Figura 11 – Viabilidade celular (%) na linhagem HaCaT com e sem radioterapia (RT) associada aos inibidores de mTOR no IC₅₀ (TwoWay ANOVA com Bonferroni; * $p < 0,05$ radioterapia *versus* sem radioterapia).

5.5. TESTE DE LESÃO EM MONOCAMADA – *SCRATCH ASSAY*

O teste de lesão em monocamada foi conduzido com as linhagens FaDu e HaCaT tratadas com os inibidores de mTOR curcumina e everolimus em seus respectivos IC₅₀ para cada linhagem. Foram selecionados esses inibidores por seus resultados nos testes de viabilidade celular serem os mais significativos. O objetivo desse ensaio foi avaliar o efeito dos tratamentos na migração celular.

Observou-se, entretanto, que o tratamento com os inibidores de mTOR no IC₅₀ gerou morte celular, mais evidente na linhagem FaDu, pós-tratamento com a curcumina a partir de 12h. A avaliação da migração celular sofreu interferência decorrente da morte celular, visto que como consequência, as margens da ferida não

poderiam mais ser claramente identificadas. Para esse ensaio, portanto, uma concentração inferior ao IC₅₀ seria mais adequada.

Para a linhagem FaDu, a área da ferida do controle nos tempos de observação em relação à área da ferida na hora 0 variou de 99% a 49%. Com 72 horas, embora ainda fosse possível a visualização de espaços na área da ferida, a determinação precisa das margens já não era possível. Até 12h, nos poços tratados com curcumina e everolimus, as margens da ferida foram mantidas. A área da ferida nos poços tratados com curcumina manteve-se nas 12 primeiras horas de tratamento por volta de 98,5% da área da ferida na hora 0. Por outro lado, a área da ferida no controle nessas mesmas 12 primeiras horas variou entre 98% e 90,6%. Para as horas 8, 10 e 12, essa diferença foi considerada estatisticamente significativa, conforme observado na Figura 12. Como pode ser também observado na Figura 13, com 24 horas de tratamento com curcumina, as células FaDu já estavam inviáveis, não sendo mais possível determinar claramente as margens da ferida. Nos poços tratados com everolimus, observou-se uma tendência ao fechamento da ferida tempo-dependente, diferentemente do observado na curcumina, embora a diferença da área da ferida em relação ao controle só tenha sido estatisticamente significativa a partir de 24h, período em que já é observada morte celular.

Para a linhagem HaCaT, a área da ferida do controle em relação à área da ferida na hora 0 variou de 99% a 64% até 72 horas de observação. As margens da ferida nos poços tratados com curcumina e everolimus foram mantidas até 12 horas. A área da ferida nos poços tratados com curcumina manteve-se nas 12 primeiras horas de tratamento entre 99,7% e 98,9% da área da ferida na hora 0. Por outro lado, a área da ferida no controle nessas mesmas 12 primeiras horas variou entre 99,3% e 94,4%. Para as horas 6 e 12, essa diferença foi considerada estatisticamente significativa, conforme observado na Figura 12. Como pode ser também observado na Figura 14, com 24 horas de tratamento com curcumina, as células HaCaT já se apresentavam bastante inviáveis, não sendo mais possível determinar claramente as margens da ferida. Nos poços tratados com everolimus, observou-se uma tendência ao fechamento da ferida tempo-dependente, com área da ferida em relação à área da hora 0 variando entre 97,4% e 86,9%, durante as 72 horas de observação. A diferença das áreas dos poços tratados com everolimus em relação ao controle foi

estatisticamente significativa com 2, 4, 12, 24, 48 e 72 horas. Como pode ser observado na Figura 14, as células HaCaT mantiveram-se consideravelmente viáveis até 72 horas de tratamento com everolimus.

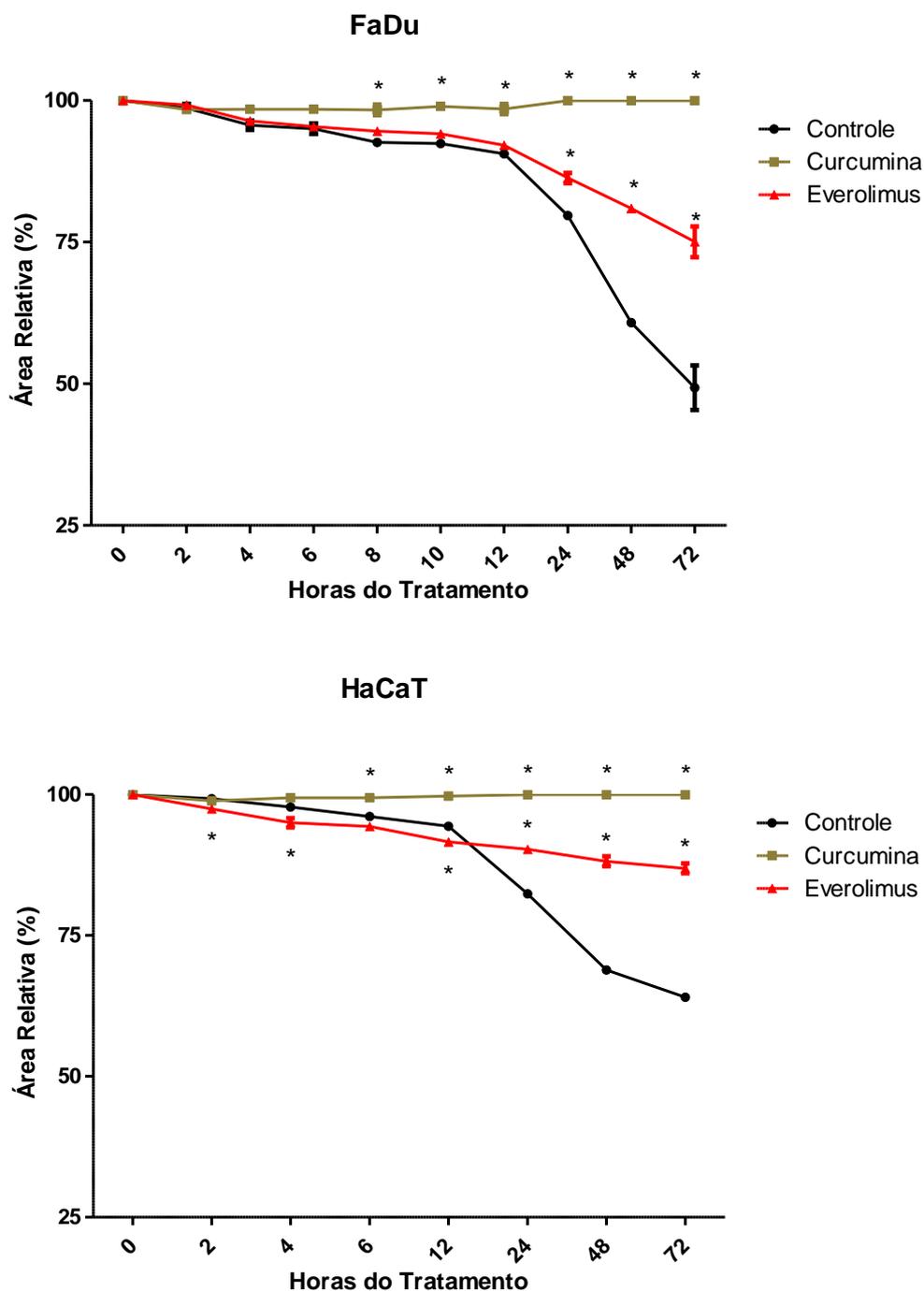


Figura 12 – Avaliação do fechamento de lesão em monocamada das linhagens FaDu e HaCaT após tratamento com curcuma e everolimus. Cálculo do tamanho da área da ferida expresso em porcentagem (TwoWay ANOVA com Bonferroni; * $p < 0,05$ tratamento *versus* controle).

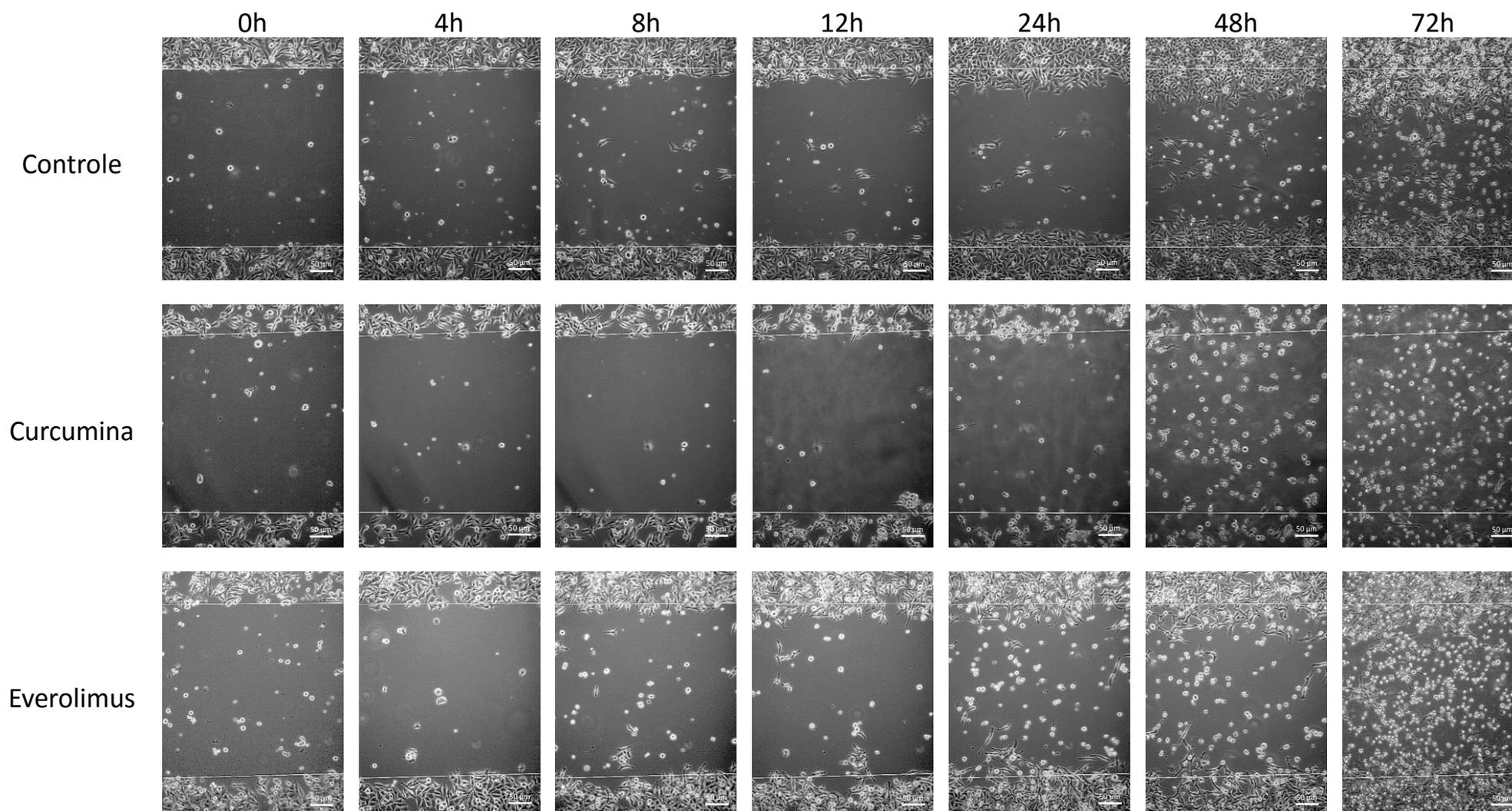


Figura 13 – Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem FaDu pós-tratamento com os inibidores de mTOR curcumina e everolimus. Os poços foram acompanhados até 72 horas após o tratamento.

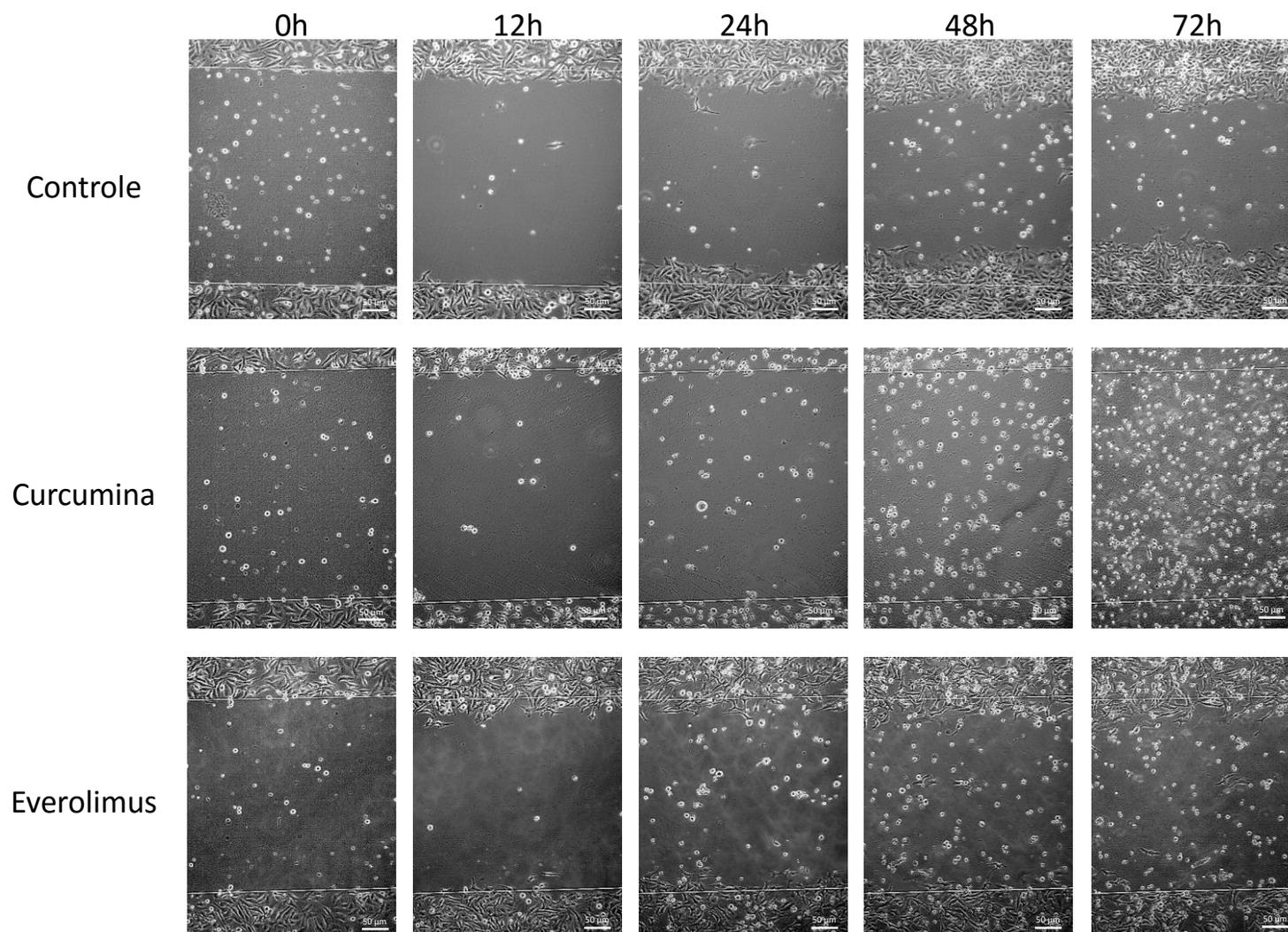


Figura 14 – Avaliação do fechamento de lesão em monocamada da linhagem HaCaT pós-tratamento com os inibidores de mTOR curcumina e everolimus. Os poços foram acompanhados até 72 horas após o tratamento.

5.6. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo foi utilizada para a avaliação do tipo de morte celular causado pelo tratamento de células de HNSCC com os inibidores de mTOR. Para esse ensaio, as linhagens SCC-9 e FaDu foram tratadas por 24 horas com os inibidores com melhores resultados no teste de viabilidade celular, que foram a curcumina, o everolimus e o temsirolimus, e marcadas com anexina V-FITC e 7-AAD. Adicionalmente, a técnica também foi empregada na investigação dos efeitos dos medicamentos no ciclo celular. Para essa avaliação, as linhagens SCC-9 e FaDu foram tratadas também por 24 horas com curcumina, temsirolimus e everolimus e marcadas com iodeto de propídeo.

5.6.1. Morte Celular

Ao serem analisadas no citômetro de fluxo, as células foram distribuídas em quatro quadrantes, de acordo com a marcação para anexina V-FITC e 7-AAD. O quadrante R1 refere-se a células intactas, viáveis, não marcadas com anexina V-FITC nem com 7-AAD (A- 7-AAD-). O quadrante R2 refere-se às células em apoptose inicial, marcadas somente com anexina V-FITC (A+ 7-AAD-). O quadrante R3 refere-se às células necróticas, marcadas somente com 7-AAD (A- 7-AAD+). O quadrante R4 refere-se às células tardiamente apoptóticas ou necróticas, marcadas com ambos anexina V-FITC e 7-AAD (A+ 7-AAD+).

Os resultados para a linhagem SCC-9 podem ser analisados na Figura 15, com as células distribuídas pelos quatro quadrantes após tratamento com cada inibidor de mTOR. No controle, a mediana das porcentagens de eventos em R1 foi de 95,28% (compreendida entre 94,59% e 95,29%), em R2 foi de 0,68% (compreendida entre 0,35% e 0,82%), em R3 foi de 9,33% (compreendida entre 8,35% e 9,39%) e em R4 foi de 2,61% (compreendida entre 2,13% e 3,19%). Para as células tratadas com curcumina, a mediana em R1 foi de 83,3% (compreendida entre 82,1% e 90,36%), em R2 de 0,56% (compreendida entre 0,38% e 0,74%), em R3 de 1,18% (compreendida entre 0,87% e 1,25%) e em R4 de 0,08% (compreendida entre 0,07% e 0,1%). Para as células tratadas com temsirolimus, a mediana em R1 foi de 97,61% (compreendida entre 84,12% e 97,63%), em R2 de 0,36% (compreendida entre 0,30% e 1,59%), em R3 de 4,51% (compreendida entre 1,25% e 6%) e em R4 de 29,02%

(compreendida entre 26,74% e 35,9%). Para as células tratadas com everolimus, a mediana em R1 foi de 92,48% (compreendida entre 91,67% e 92,76%), em R2 de 0,67% (compreendida entre 0,48% e 0,73%), em R3 de 15,3% (compreendida entre 14,37% e 16,95%) e em R4 de 4,93% (compreendida entre 4,35% e 5,09%).

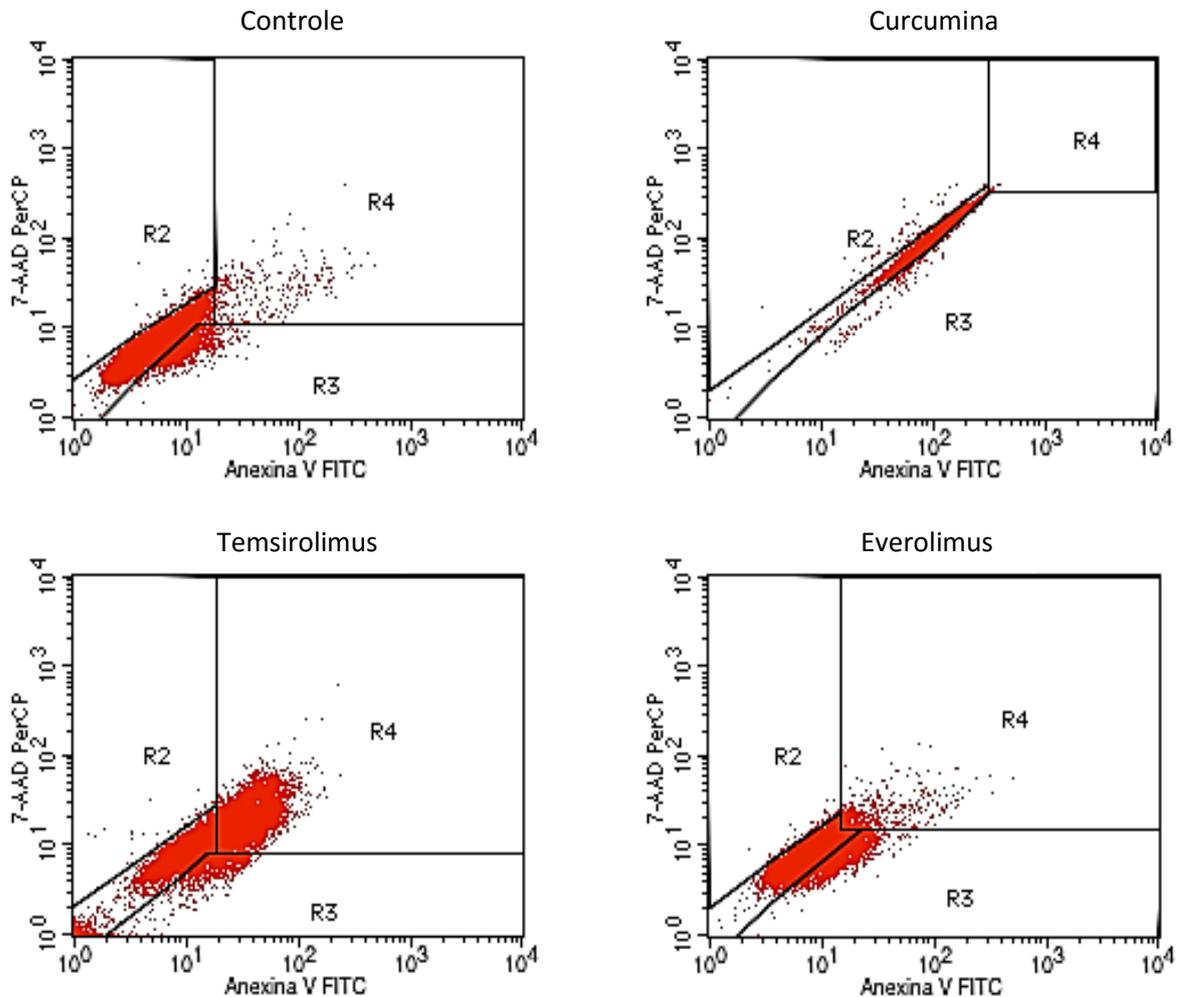


Figura 15 – Distribuição das células da linhagem SCC-9 após tratamento com curcumina, tensirolimus e everolimus por 24h.

Os resultados para a linhagem FaDu são apresentados na Figura 16, com as células distribuídas pelos quatro quadrantes após tratamento com cada inibidor de mTOR. No controle, a mediana das porcentagens de eventos em R1 foi de 91,94% (compreendida entre 89,13% e 92,59%), em R2 foi de 0,6% (compreendida entre 0,48% e 0,71%), em R3 foi de 1,73% (compreendida entre 1,65% e 2,4%) e em R4 foi de 1,73% (compreendida entre 1,19% e 2,08%). Para as células tratadas com curcumina, a mediana em R1 foi de 61,22% (compreendida entre 60,49% e 68,47%), em R2 de 0,09% (compreendida entre 0,03% e 0,14%), em R3 de 1,54%

(compreendida entre 0,87% e 1,94%) e em R4 de 0,25% (compreendida entre 0,19% e 0,29%). Para as células tratadas com temsirolimus, a mediana em R1 foi de 78,05% (compreendida entre 77,53% e 78,49%), em R2 de 0,81% (compreendida entre 0,6% e 0,93%), em R3 de 0,69% (compreendida entre 0,34% e 1,09%) e em R4 de 7,76% (compreendida entre 7,64% e 8,17%). Para as células tratadas com everolimus, a mediana em R1 foi de 83,38% (compreendida entre 80,9% e 83,85%), em R2 de 0,5% (compreendida entre 0,42% e 0,6%), em R3 de 0,49% (compreendida entre 0,38% e 0,64%) e em R4 de 3,18% (compreendida entre 3,06% e 3,76%).

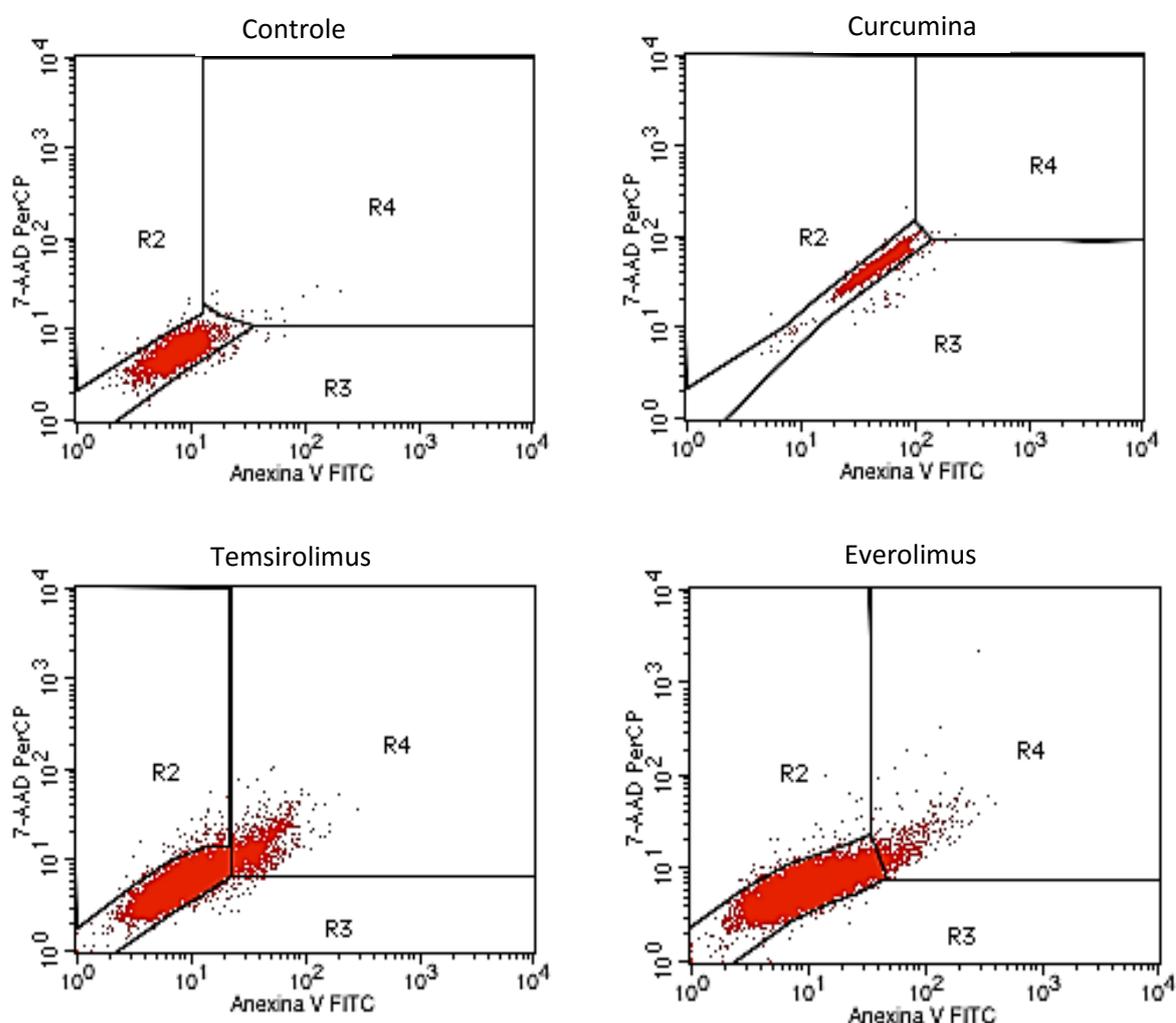


Figura 16 – Distribuição das células da linhagem FaDu após tratamento com curcumina, temsirolimus e everolimus por 24h.

Os resultados do perfil de morte celular acima apresentados sintetizados em forma de gráficos de coluna e apresentados na Figura 17.

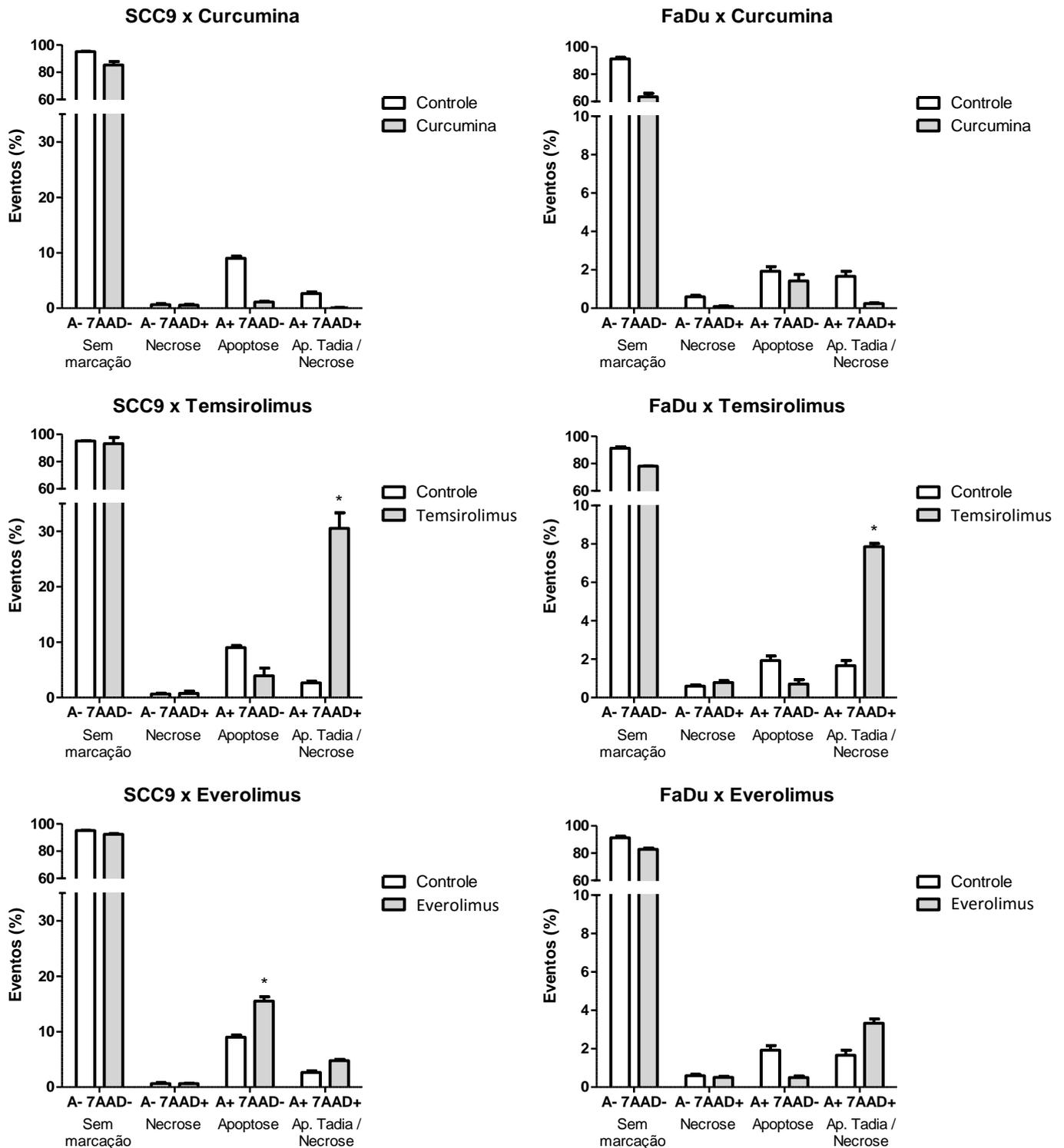


Figura 17 – Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos inibidores de mTOR curcumina, temsirolimus e everolimus no IC₅₀ nas linhagens SCC-9 e FaDu. Marcação de eventos com Anexina e/ou 7AAD após 24 horas de tratamento com os inibidores (Mann Whitney; *p<0,05 tratamento *versus* controle). A= Anexina V-FITC; Ap. Tardia = Apoptose Tardia.

Como pode ser observado na Figura 17, não houve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de células tratadas com curcumina e o controle para nenhum padrão de marcação, o que indicaria que a curcumina não causa nem apoptose nem necrose nas linhagens SCC-9 e FaDu. É descrito na literatura, entretanto, que a curcumina imprime nas células um padrão de fluorescência semelhante ao da anexina V-FITC (57), o que poderia inviabilizar os resultados obtidos e justificar a utilização de um outro método ou protocolo de análise de dados para a avaliação do perfil de morte celular causado pela curcumina.

O temsirolimus resultou nas duas linhagens celulares estudadas em um aumento considerável de células marcadas com ambos anexina V-FITC e 7-AAD, indicativo de apoptose tardia ou necrose. Na linhagem SCC-9, a porcentagem de células tratadas com marcação dupla foi de 11,12 vezes a porcentagem de células controle duplamente marcadas. Já para a linhagem FaDu, essa razão foi de 4,5 vezes.

Na linhagem SCC-9, o everolimus resultou em um aumento significativo de células marcadas com Anexina V-FITC, o que indica um aumento de células em apoptose. A porcentagem de células tratadas marcadas com Anexina V-FITC foi de 1,6 vez a porcentagem de células controle com a mesma marcação.

5.6.2. Ciclo Celular

As linhagens celulares SCC-9 e FaDu foram tratadas com curcumina, temsirolimus e everolimus. As células tratadas e seus respectivos controles foram corados com iodeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo. Foram identificadas células que, no momento da leitura, estavam nas fases G₁, S ou G₂ do ciclo celular, como consequência da diferença de intensidade da fluorescência de cada núcleo celular após marcação com o iodeto de propídeo.

Os histogramas que ilustram a distribuição no ciclo celular de células SCC-9 controle e tratadas com cada inibidor de mTOR são apresentados na Figura 18. No controle, a mediana das porcentagens de eventos marcados em G₁ foi de 66,43% (compreendida entre 66,23% e 66,58%), em S foi de 20,06% (compreendida entre 18,91% e 20,62%) e em G₂ foi de 13,36% (compreendida entre 12,95% e 14,85%). Para as células tratadas com curcumina, a mediana em G₁ foi de 67,78% (compreendida entre 65,66% e 69,63%), em S de 13,39% (compreendida entre

12,11% e 15,24%) e em G₂ de 19,09% (compreendida entre 16,97 % e 20,1%). Para as células tratadas com temsirolimus, a mediana em G₁ foi de 63,87% (compreendida entre 61,24% e 66,69%), em S de 21,63% (compreendida entre 19,7% e 23,99%) e em G₂ de 14,5% (compreendida entre 13,61% e 14,77%). Para as células tratadas com everolimus, a mediana em G₁ foi de 60,37% (compreendida entre 59,76% e 61,07%), em S de 25,86% (compreendida entre 25,33% e 26,29%) e em G₂ de 13,77% (compreendida entre 12,64% e 14,91%).

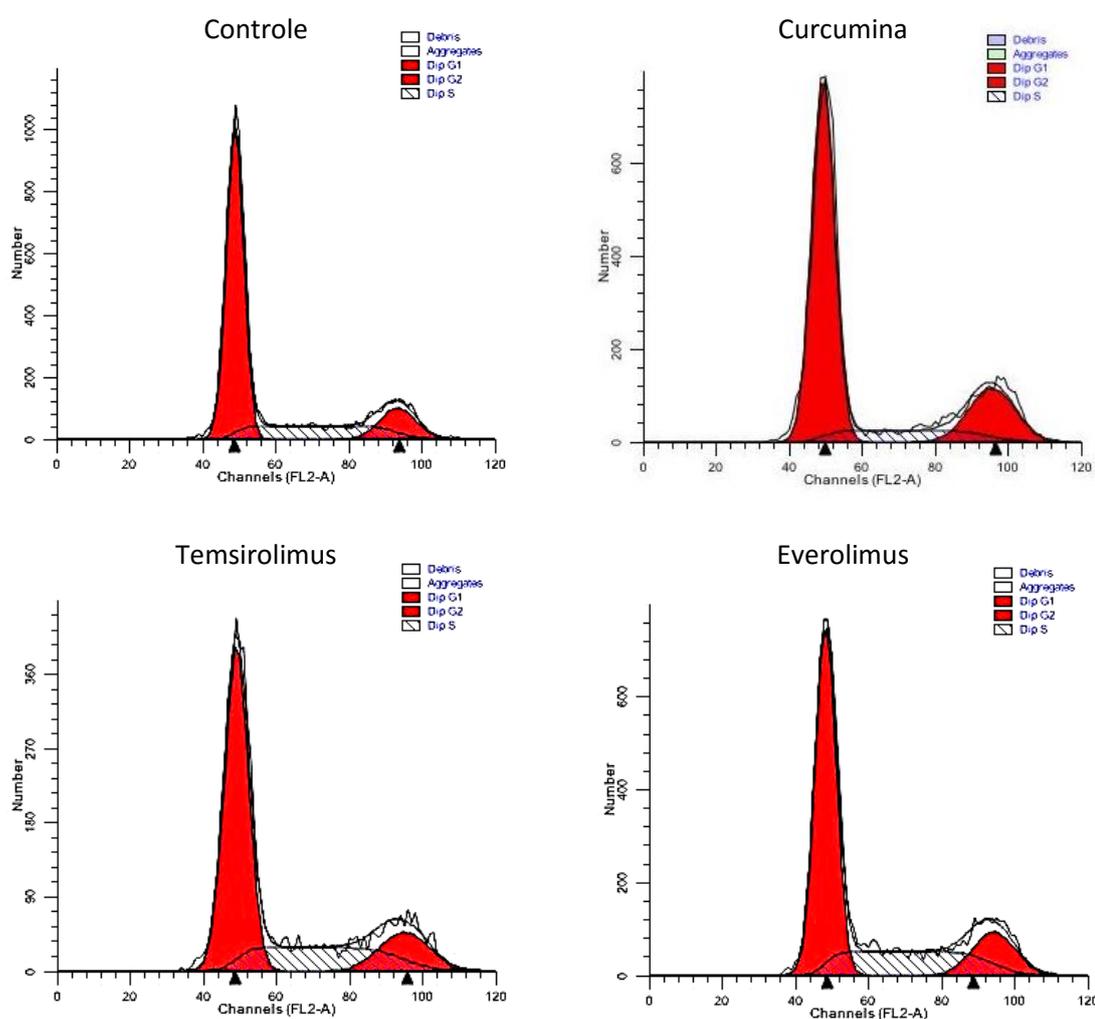


Figura 18 – Distribuição de eventos em SCC-9 marcados com iodeto de propídeo nos histogramas: o primeiro pico vermelho representa os eventos na fase G₁, o segundo pico vermelho (à direita) representa os eventos na fase G₂, a região tracejada representa o número de eventos na fase S.

Os histogramas que ilustram a distribuição no ciclo celular de células FaDu controle e tratadas com cada inibidor de mTOR são apresentados na Figura 19. No controle, a mediana das porcentagens de eventos marcados em G₁ foi de 67,06% (compreendida entre 65,46% e 67,48%), em S foi de 20,72% (compreendida entre

19,13% e 21,68%) e em G₂ foi de 12,86% (compreendida entre 11,76% e 13,81%). Para as células tratadas com curcumina, a mediana em G₁ foi de 43,38% (compreendida entre 38,35% e 50,62%), em S de 19,5% (compreendida entre 11,64% e 20,14%) e em G₂ de 37,75% (compreendida entre 37,38% e 41,35%). Para as células tratadas com temsirolimus, a mediana em G₁ foi de 63,51% (compreendida entre 61,44% e 68,71%), em S de 22,89% (compreendida entre 18,2% e 24,5%) e em G₂ de 13,6% (compreendida entre 13,09% e 14,07%). Para as células tratadas com everolimus, a mediana em G₁ foi de 50,26% (compreendida entre 47,85% e 60,53%), em S de 9,03% (compreendida entre 34,62% e 39,52%) e em G₂ de 10,71% (compreendida entre 4,85% e 12,64%).

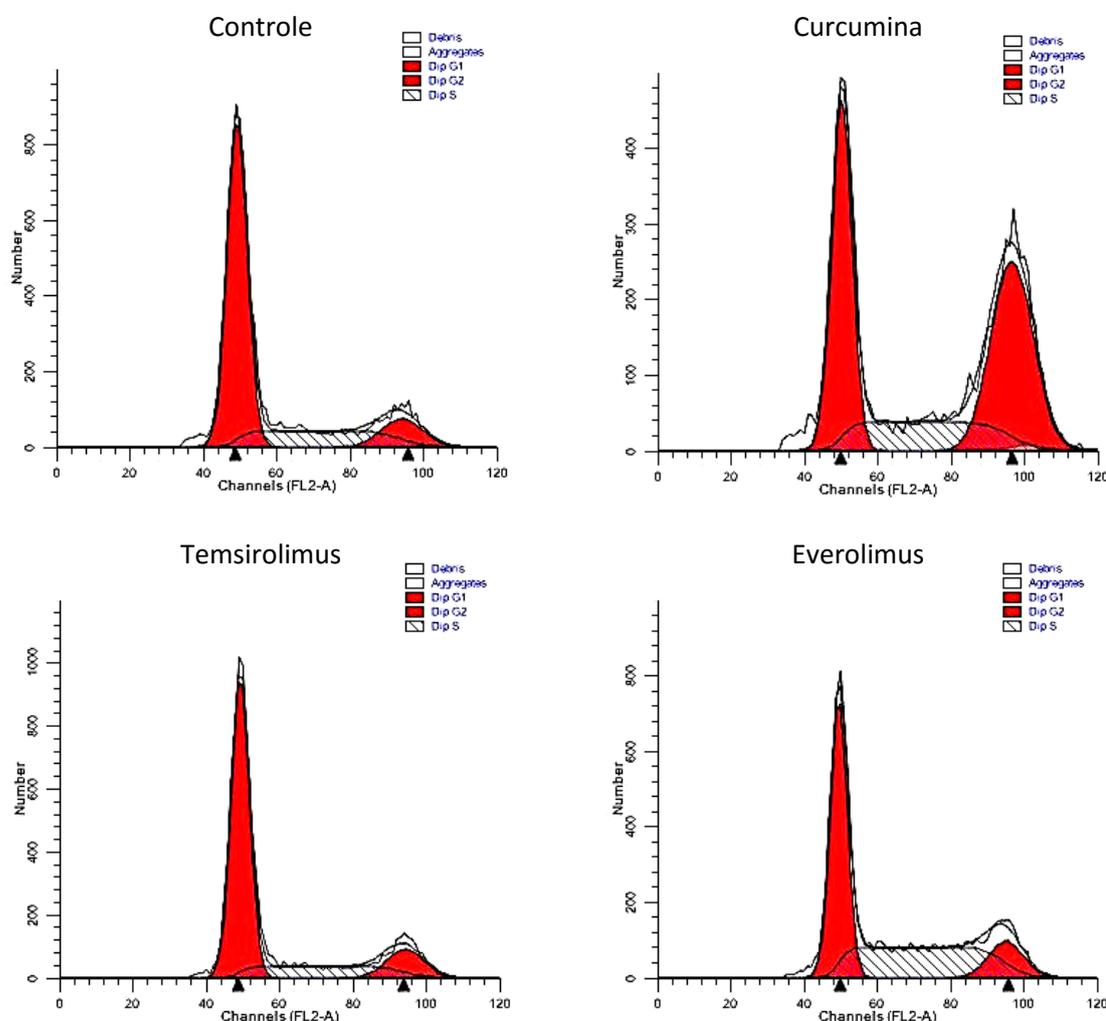


Figura 19 – Distribuição de eventos em FaDu marcados com iodeto de propídeo nos histogramas: o primeiro pico vermelho representa os eventos na fase G₁, o segundo pico vermelho (à direita) representa os eventos na fase G₂, a região tracejada representa o número de eventos na fase S.

Os resultados acima apresentados, sintetizados na forma de gráficos de colunas, podem ser observados na Figura 20, de maneira que a comparação entre a distribuição das células controle no ciclo celular e a distribuição das células tratadas com cada inibidor de mTOR possa ser realizada.

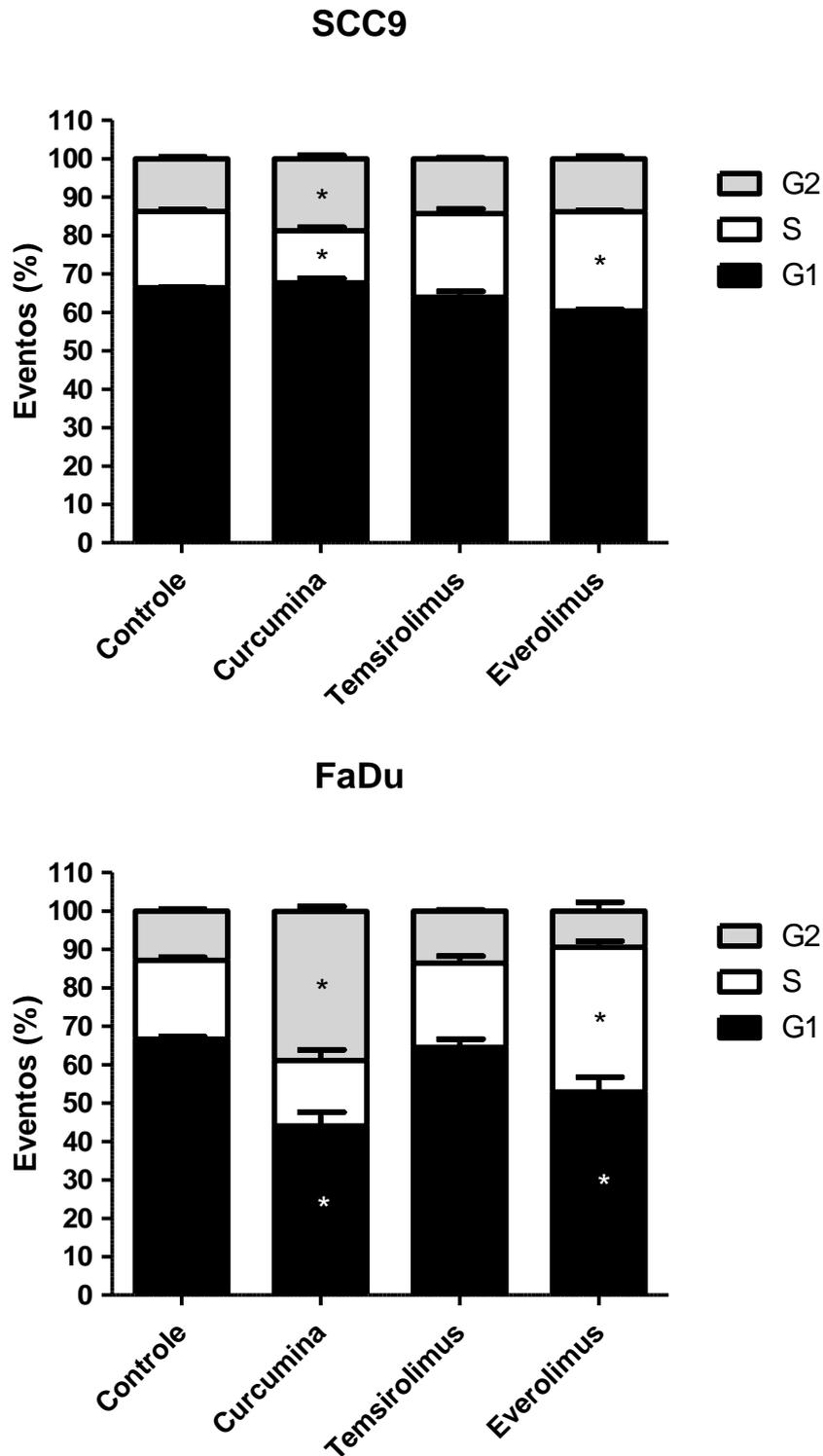


Figura 20 – Distribuição das células SCC-9 e FaDu controle e tratadas nas fases do ciclo celular (Mann Whitney; * $p < 0,05$ porcentagem no controle *versus* porcentagem no tratamento).

Observa-se em células da linhagem SCC-9 tratadas com curcumina um aumento estatisticamente significativo de células acumuladas na fase G₂ e uma redução na quantidade de células na fase S. Ainda na linhagem SCC-9, tratada com everolimus, é significativo o aumento de células em fase S. Não foram constatadas alterações no perfil de distribuição no ciclo celular de células SCC-9 tratadas com temsirolimus.

Na linhagem FaDu, é considerável e também significativo o aumento de células acumuladas na fase G₂ e a redução da quantidade de células em G₁ depois do tratamento com curcumina. Com everolimus também foi possível observar redução de células em G₁, mas o aumento da quantidade de células foi na fase S. Como na SCC-9, células da linhagem FaDu tratadas com temsirolimus não apresentaram alterações no perfil de distribuição no ciclo celular.

É possível concluir, diante de tais resultados, que o tratamento de células de HNSCC das linhagens SCC-9 e FaDu, quando tratadas com curcumina, são paralisadas na transição G₂/M do ciclo celular. Da mesma maneira, também pode-se propor que o tratamento dessas linhagens com everolimus resultam em acúmulo de células na fase S do ciclo celular.

5.7. WESTERN BLOT

O *western blot* foi realizado com a linhagem FaDu tratadas com curcumina e everolimus em seus respectivos IC₅₀. Objetivou-se com esse experimento avaliar a expressão da proteína mTOR fosforilada (p-mTOR) após o tratamento com os inibidores supracitados.

A Figura 21 mostra as bandas de p-mTOR, bem como da β -actina, que foi utilizada como proteína controle. Observa-se a expressão de p-mTOR somente no controle. Não há banda visível nas colunas de tratamento com a curcumina ou com o everolimus. Esses resultados sugerem que os inibidores de mTOR testados podem causar a inibição da fosforilação do mTOR. Entretanto seria também necessário analisar os resultados do *western blot* com a proteína mTOR não fosforilada.

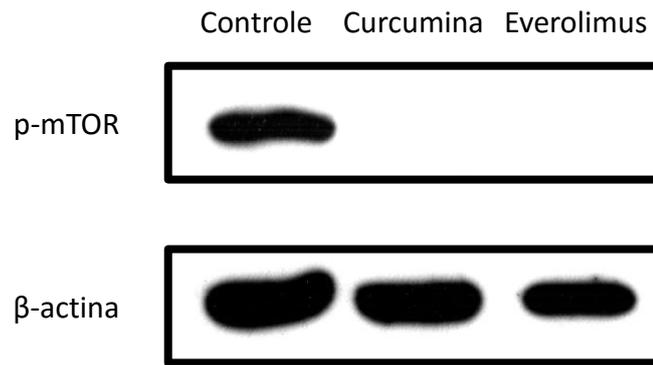


Figura 21 – *Western blot* para a detecção da p-mTOR (mTOR fosforilado) e β -actina na linhagem FaDu após 24 horas de tratamento com curcumina e everolimus.

6. DISCUSSÃO

A superexpressão de proteínas reguladoras da via do mTOR é reportada para diversos tipos de câncer, e essa realidade instiga a pesquisa e o desenvolvimento de terapias antineoplásicas que têm por alvo a proteína mTOR (58). Esse trabalho segue essa tendência, ao propor a investigação dos efeitos biológicos dos inibidores de mTOR em culturas celulares de carcinomas originários na língua e hipofaringe. Os rapanálogos temsirolimus e everolimus, bem como as substâncias derivadas da dieta, curcumina, resveratrol e EGCG, que também apresentam atividade inibitória sobre a via do mTOR, foram utilizados para a realização dos diversos experimentos nesse trabalho.

6.1. INIBIDORES DE mTOR RAPANÁLOGOS

O everolimus foi aprovado recentemente pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão norte-americano responsável pelo controle de medicamentos, para tratamento do câncer renal avançado, do câncer de mama e do tumor neuroendócrino de pâncreas (59), e o temsirolimus também foi aprovado para tratamento do câncer renal (60). Portanto, tais rapanálogos já são recomendados e utilizados na prática clínica oncológica. Há ainda estudos clínicos de publicação recente que avaliaram os efeitos desses medicamentos em pacientes com diversos outros tipos de câncer (61-66). Foi reportada em estudo clínico randomizado de fase II a ação aditiva do temsirolimus quando associado ao selumetinib, um inibidor da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MEK), na sobrevida livre de doenças (DFS) em pacientes com leiomiomasarcoma (61). Uma notável melhora na DFS também foi observada com a associação do temsirolimus ao bevacizumab, um inibidor de VEGF, em pacientes com tumor neuroendócrino pancreático (62) e com carcinoma hepatocelular avançado (63). Everolimus em combinação com capecitabina, pró-droga convertida a 5-fluorouracil no organismo, resultou em níveis de toxicidade aceitáveis e aumento de DFS e sobrevida global em pacientes com adenocarcinoma pancreático avançado (64).

Estudos clínicos em HNSCC com o temsirolimus ou o everolimus, em associação a outras terapias ou utilizados sozinhos, são poucos e inconclusivos quanto ao potencial uso dos inibidores de mTOR, sugerindo não haver benefícios ao paciente consequentes do tratamento com esses inibidores (67, 68).

São poucos também os estudos *in vitro* dos efeitos do temsirolimus e do everolimus em células de HNSCC. Niehr *et al.*, 2015 (69), realizaram estudo com 10 linhagens de HNSCC, dentre as quais a SCC-9, e identificaram padrões de resposta distintos dessas linhagens ao tratamento com temsirolimus. A viabilidade celular variou de 16% a 95% após tratamento com temsirolimus em concentração fixa de 100 ng/mL ($\approx 0,1 \mu\text{M}$). Nathan *et al.*, 2007 (70), observaram uma resposta dose-dependente de FaDu ao temsirolimus até a concentração de 100 ng/mL ($\approx 0,1 \mu\text{M}$). Schedel *et al.*, 2011 (71), reportaram para as linhagens de HNSCC PCI-1 e PCI-13 em 24h aproximadamente 42% e 32% de viabilidade celular para o temsirolimus a 30 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 29,12 \mu\text{M}$), respectivamente. Os valores de viabilidade celular ficaram inferiores a 10% em ambas as linhagens quando a concentração do inibidor de mTOR foi aumentada para 35 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 33,97 \mu\text{M}$). Em nosso trabalho, foram encontrados IC_{50} para os rapanálogos relativamente próximos ou inferiores a esses valores de concentração em linhagens de HNSCC (Tabela 1), com IC_{50} de 27,4 μM para o everolimus em SCC-9 e de 12,85 μM para everolimus em FaDu em 24h e de 8,74 μM para temsirolimus e 14,18 μM para everolimus em FaDu em 48h.

Comparando os valores de IC_{50} resultantes de 24 e 48h de tratamento, observou-se que tais valores foram menores em 48h que em 24h para as três linhagens estudadas, quando tratadas com temsirolimus. Esse resultado indica uma tendência de comportamento tempo-dependente do temsirolimus com as linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT. Já o everolimus não apresentou comportamento semelhante, resultando em valores de IC_{50} maiores em 48h que em 24h para todas as linhagens. Isso pode ser justificado por diferenças de propriedades farmacológicas entre everolimus e temsirolimus, especialmente relativas ao metabolismo, absorção e farmacodinâmica desses medicamentos (72). Tais diferenças também justificam as variações entre valores de IC_{50} encontrados para everolimus e temsirolimus em uma mesma linhagem celular.

Nosso trabalho também demonstrou a seletividade dos inibidores de mTOR (Tabela 2). O everolimus mostrou-se seletivo para as células tumorais SCC-9 e FaDu em relação à linhagem de queratinócitos, HaCaT, em 24 e 48h. O temsirolimus mostrou-se seletivo somente com 48h para a linhagem FaDu.

Para efeito de comparação, os valores de viabilidade celular resultantes do tratamento com os rapanálogos também foram considerados em uma concentração fixa de 10 μM (Tabela 4 e Figura 9). Nessas condições, é interessante destacar que a redução da viabilidade celular causada pelo temsirolimus nas células FaDu foi significativa em 24 e 48h, o que não foi observado com o everolimus. Classificando-os quanto ao grau de toxicidade, nenhum dos rapanálogos foi considerado de toxicidade intensa em concentração de 10 μM , embora o temsirolimus tenha apresentado toxicidade moderada para as células SCC-9 e HaCaT em 48h.

A associação dos rapanálogos (em IC_{50}) à radioterapia (2 Gy/min) também foi investigada (Tabela 5 e Figuras 10 e 11). Interessantemente, quando há associação de tratamentos, os valores de viabilidade celular das células FaDu são significativamente reduzidos. Tal diferença estatisticamente significativa não foi observada nas células HaCaT, podendo sugerir seletividade da associação entre radioterapia e rapanálogos para as células malignas em relação à linhagem de queratinócitos. Ekshyyan *et al.*, 2009 (73), avaliaram os efeitos da associação do temsirolimus em concentração de até 100 ng/mL ($\approx 0,1 \mu\text{M}$) à radioterapia em dose única de 2 Gy/min em linhagens celulares de HNSCC, incluindo a FaDu, e não encontraram alterações significantes na proliferação celular. Já Yu *et al.*, 2014 (21), investigaram a associação de everolimus em concentrações de 30 nM e 300 nM à radioterapia em doses de 2 a 8 Gy/min em linhagens de HNSCC e observaram significativa redução da proliferação celular após tratamento com a associação.

O teste de lesão em monocamada foi realizado com o everolimus em IC_{50} (Figuras 12, 13 e 14). Nos poços tratados, observou-se uma tendência ao fechamento da ferida tempo-dependente com a linhagens FaDu durante todo o ensaio, com o padrão comparável ao controle até 12h de tratamento. A partir de 24h houve diferença estatisticamente significativa da área da ferida em relação ao controle. Com a célula HaCaT também foi observado o padrão de fechamento da ferida, até significativamente mais intenso que o controle nas 12 primeiras horas. A partir de 48h, o fechamento da ferida passou a ocorrer mais intensamente no controle, com diferença significativa entre as áreas das feridas em poços controle e tratamento. Naruse *et al.*, 2015 (74), realizaram o teste de lesão em monocamada com everolimus nas concentrações 1nM, 10nM e 100nM em 7 linhagens de HNSCC, observando redução significativa da intensidade de fechamento da ferida em 12h. Outro estudo

mostrou que a superexpressão de mTOR e dos efetores da sinalização aumentam o potencial de invasão e migração, enquanto a inibição da sinalização da via do mTOR com inibidores do mTOR diminui a invasão e a migração das linhagens de câncer de esôfago após tratamento com everolimus na concentração de 20 nM (75).

O perfil de morte celular induzido pelos rapanálogos temsirolimus e everolimus em seus IC_{50} foi avaliado por citometria de fluxo (Figuras 15, 16 e 17). Observou-se tanto em SCC-9 quanto em FaDu que, quando tratadas com temsirolimus, houve um aumento significativo de células marcadas com anexina V-FITC e 7-AAD, o que poderia indicar tanto apoptose tardia quanto necrose. Como não houve diferença nos outros padrões de marcação, não foi possível distinguir entre um ou outro tipo de morte celular com esses resultados de citometria de fluxo. Em células da linhagem SCC-9 tratadas com everolimus foi observado um aumento significativo de marcação com anexina V-FITC, indicando apoptose. Tal resultado é importante, no sentido de que não é descrita na literatura indução de apoptose por everolimus em linhagens de HNSCC. A apoptose é relatada para células de linhagens de câncer de mama, carcinoma de nasofaringe e linfoma não-Hodgkin tratadas com o rapanálogo (76-78).

Quanto à distribuição das células tratadas com os inibidores de mTOR rapanálogos no ciclo celular (Figuras 18, 19 e 20), não foi identificada diferença significativa resultante do tratamento com temsirolimus em IC_{50} para SCC-9 ou para FaDu. Um aumento na quantidade de células na fase S do ciclo celular foi constatado na linhagem SCC-9 tratada com everolimus, que também aumentou a porcentagem celular na fase S e diminuiu a quantidade de células na fase G_1 na linhagem FaDu. Uma interrupção do ciclo celular na fase S foi descrita por Pinto-Leite *et al.*, 2012 (79), em linhagens celulares de câncer de bexiga tratadas com a combinação de everolimus em concentrações de 0,5 μ M a 2 μ M e gencitabina em concentração de 100 nM.

6.2. INIBIDORES DE mTOR DERIVADOS DA DIETA

A curcumina, o resveratrol e o EGCG são substâncias derivadas da dieta com potencial interferência na via PI3K/AKT/mTOR através da atividade inibitória de mTOR e de outras proteínas constituintes do complexo mTORC1 e integrantes da via (40, 80). A curcumina induziu diminuição de p-mTOR, assim como das proteínas Raptor e

Rictor, integrantes do complexo mTORC1, bem como das proteínas p70S6K e 4E-BP1, efetoras do final da via PI3K/AKT/mTOR, em células de câncer colorretal (81). Também em linhagens de rhabdomiossarcoma, câncer de próstata, câncer de mama e câncer cervical foi descrita a inibição da fosforilação de p70S6K e 4E-BP1 após o tratamento com a curcumina (82). O resveratrol também interfere na via PI3K/AKT/mTOR, como indica estudos com linhagens de câncer de mama nos quais foi constatada a redução de fosforilação de mTOR, p70S6K e 4E-BP1 e da tradução de mRNA referente a essas proteínas (83, 84). A supressão de mTOR e de 4E-BP1, assim como a redução da tradução de mRNA, já foi observada em células de carcinoma hepatocelular tratadas com EGCG (85), e em fibroblastos de quelóide o EGCG inibiu a fosforilação de p70S6K e 4E-BP1 (86). No nosso estudo, uma subexpressão da proteína mTOR, ou mesmo uma inibição de sua fosforilação, foi constatada através do teste de *western blot* na linhagem FaDu tratada com curcumina (Figura 21), o que está de acordo com os estudos supracitados e evidencia a atividade inibitória do mTOR pela curcumina.

Para a curcumina são descritos na literatura valores de IC₅₀ que variam de 3 µM (87) até 271,5 µM (88). Chiang *et al.*, 2014 (89), e Jeon *et al.*, 2012 (90), apresentaram em seus estudos valores de IC₅₀ próximos de 30 µM para linhagens celulares de HNSCC, compatíveis com os valores obtidos em nosso estudo, de 40,93 µM para SCC-9, 24,84 µM para FaDu e 47,25 µM para HaCaT em 24h (Tabela 1).

Lin *et al.*, 2015 (91), relataram que o resveratrol não apresentou redução de viabilidade significativa na linhagem SCC-9, mesmo quando utilizado na maior concentração, de 100 µM. Em nosso estudo, a concentração máxima utilizada foi de 150 µM, que não resultou em viabilidade celular inferior a 70% em 24h ou 48h nas linhagens SCC-9, FaDu e HaCaT. Adicionalmente, os valores de IC₅₀ obtidos com o ensaio da viabilidade celular por MTT foram altos, todos excedendo em muito a dose máxima utilizada. O MTT é um ensaio que possui limitações, podendo a viabilidade celular ser sub ou superestimada, devido às adaptações metabólicas e reprogramação das mitocôndrias que sofrem influência dos efeitos inibitórios e estresse mediado pelos tratamentos. Alguns medicamentos como o imatinib, o resveratrol, a genisteína mostraram interferência com a taxa de redução do MTT levando a resultados inconsistentes entre os ensaios de MTT e outros testes de viabilidade celular (92).

Lin *et al.*, 2012 (93), descreveram uma variação de IC₅₀ de 6,26 µM a 18,1 µM para linhagens de HNSCC tratadas com EGCG em 24h, a depender de cada linhagem, enquanto Irimie *et al.*, 2015 (94), já apresentaram um valor de IC₅₀ maior, de 52,3 µM. Logicamente que cada linhagem celular, ainda que originária de um mesmo tipo tumoral, muitas vezes apresentam comportamentos distintos diante de um mesmo estímulo ou tratamento. Foram encontrados valores de IC₅₀ para o EGCG também bastante altos em nosso trabalho, variando de 128 µM a 618,8 µM em 24h e de 66,29 µM e 96,52 µM em 48h (Tabela 1). Um estudo de Wang *et al.*, 2010 (95), compararam diferentes métodos para a avaliação da viabilidade celular em diferentes linhagens tumorais tratadas com o EGCG, e constatou-se que o uso do MTT como indicador de mitocôndrias metabolicamente ativas superestimou o número de células viáveis em comparação às determinações com ATP, DNA ou azul tripan. Como resultado, o IC₅₀ para o EGCG determinado pelo ensaio do MTT foi duas vezes maior quando comparado com corantes para quantificar ATP e DNA. Por essa razão, os ensaios baseados em MTT podem subestimar o efeito antiproliferativo do EGCG, o que pode ter ocorrido no presente estudo.

Dos inibidores de mTOR derivados da dieta, somente a curcumina foi seletiva para a célula SCC-9 e FaDu em relação à linhagem HaCaT (Tabela 2). Ainda para efeito de comparação, os valores de viabilidade celular após tratamento com os inibidores de mTOR derivados da dieta em concentração fixa de 50 µM foram considerados (Tabela 3 e Figura 8). Com 24h de tratamento, a curcumina foi a única substância a apresentar redução de viabilidade significativa. Quanto ao grau de toxicidade, o EGCG não foi considerado tóxico para a célula SCC-9, embora tenha sido moderadamente tóxico para HaCaT com 48h. O resveratrol não foi considerado tóxico para as linhagens estudadas e a curcumina foi moderadamente tóxica em 24h e levemente tóxica em 48h para todas as linhagens.

A associação da curcumina (em IC₅₀) à radioterapia (2 Gy/min) também foi investigada (Tabela 5 e Figuras 10 e 11), observando-se significativa redução de viabilidade celular em FaDu quando tratada com a associação. Tal diferença estatisticamente significativa não é observada na linhagem HaCaT, o que pode sugerir seletividade da associação entre radioterapia e curcumina para a célula FaDu em relação à linhagem de queratinócitos. O efeito sinérgico da curcumina e da

radioterapia já foi descrito para linhagens celulares de HNSCC na literatura (89, 96, 97).

O teste de lesão em monocamada foi realizado com a curcumina em IC₅₀ (Figuras 12, 13 e 14). Nas linhagens FaDu e HaCaT, enquanto as áreas das feridas no controle progressivamente reduziam com o tempo, as áreas das feridas tratadas com curcumina mantiveram-se estáveis nas 12 primeiras horas, sem tendência ao fechamento. A partir da 6^a hora de tratamento a diferença entre as áreas das feridas de curcumina e do controle tornaram-se estatisticamente significantes. Com 24h de tratamento, entretanto, as células de ambas linhagens estavam inviáveis, não sendo mais possível determinar as margens da ferida. Embora Wang *et al.*, 2015 (98), tenham observado claramente a inibição de migração celular em linhagem de glioma tratada com curcumina em seu IC₅₀, sugere-se a realização do ensaio de lesão em monocamada com uma concentração menor de curcumina.

Ainda que a presença de apoptose seja relatada na literatura como consequência do tratamento com a curcumina, avaliada por expressão de proteínas relacionadas ao processo apoptótico, testes com intercalantes nucleares, kits para detecção de apoptose ou citometria de fluxo (57, 97, 99-103), o presente estudo não constatou nenhuma alteração no perfil de morte celular em células tratadas com curcumina (Figuras 15, 16 e 17). A distribuição das células no gráfico gerado após análise das amostras no citômetro ocorreu de maneira pouco convencional. A curcumina pode imprimir nas células tratadas uma fluorescência, cujo padrão é semelhante ao da anexina V-FITC, o que pode causar uma alteração nos resultados (57).

Quanto à distribuição das células tratadas com a curcumina no ciclo celular (Figuras 18, 19 e 20), foi identificado um grande e significativo aumento na quantidade de células da linhagem FaDu acumuladas na fase G₂ após tratamento com curcumina em IC₅₀, assim como uma igualmente significativa diminuição de células em G₁. Na linhagem SCC-9 também foi observado um aumento significativo de células em G₂, em menor proporção que o observado em FaDu. Houve também redução de células na fase S na linhagem SCC-9. Tais dados possibilitam propor que o tratamento com curcumina induziu interrupção do ciclo celular na fase G₂/M nas linhagens FaDu e

SCC-9. Interrupções em G₂/M também são descritas em outros estudos para linhagens celulares de HNSCC tratadas com curcumina (87, 101, 104-107).

6.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados apresentados neste trabalho e em diversos outros suportam os inibidores de mTOR como potenciais opções terapêuticas para o câncer de cabeça e pescoço. Os rapanólogos, já utilizados em situações clínicas específicas, apresentaram nos experimentos *in vitro* bons resultados para o câncer de cabeça e pescoço, que justificam a continuidade de estudos com esses medicamentos. Com a curcumina resultados significativos também foram obtidos, em especial quanto a sua interferência no ciclo celular, a sua seletividade tumoral e a sua capacidade de indução de toxicidade nas células neoplásicas. Tais resultados indicam estudos dos efeitos biomoleculares da curcumina em câncer de cabeça e pescoço, e mesmo de estudos clínicos, indispensáveis peças para o desenvolvimento de medidas terapêuticas que sejam mais efetivas, mais específicas e menos deletérias aos pacientes.

7. CONCLUSÃO

Diante dos objetivos propostos, é possível concluir que:

- Os inibidores de mTOR avaliados apresentaram efeito citotóxico nas linhagens celulares de carcinomas de hipofaringe (FaDu) e de língua (SCC-9), bem como em queratinócito humano (HaCaT);
- A curcumina e o everolimus foram seletivos para as linhagens SCC-9 e FaDu em relação à linhagem HaCaT com 24h e 48h de tratamento;
- A associação da curcumina, do temsirolimus ou do everolimus com a radioterapia resultou em efeito sinérgico para a célula FaDu, o que não foi observado na linhagem HaCaT, e permite inferir que os efeitos da associação foram seletivos para a linhagem neoplásica;
- O everolimus causou a inibição da migração celular nas linhagens FaDu e HaCaT, bem como levou ao aumento significativo de marcação com anexina V-FITC, indicando apoptose na linhagem SCC-9;
- O temsirolimus induziu um perfil incerto de apoptose tardia ou necrose nas células SCC-9 e FaDu;
- A curcumina causou interrupção no ciclo celular na fase G₂/M nas células SCC-9 e FaDu. Diferentemente, o everolimus interrompeu o ciclo celular das linhagens SCC-9 e FaDu na fase S;
- Observou-se ainda a inibição da expressão ou da fosforilação da proteína mTOR linhagem FaDu tratada com curcumina, inferindo sobre a atividade inibitória do mTOR por essa substância.

Tais resultados instigam novos estudos que aprofundem o conhecimento sobre a ação e mecanismos dos inibidores de mTOR e viabilizem sua aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Cancer. Fact sheet N 297. Geneve: World Health Organization; 2014.
2. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA oncology*. 2015;1(4):505-27.
3. Sobin LG, MK.; Wittekind, C. UICC TNM classification of malignant tumours. 7th ed. New York: Wiley-Liss; 2009.
4. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians. Part 2: Epidemiology. *Dental update*. 2015;42(4):354-6, 8-9.
5. Pezzuto F, Buonaguro L, Caponigro F, Ionna F, Starita N, Annunziata C, et al. Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies. *Oncology*. 2015;89(3):125-36.
6. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015.
7. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*. 2011;64(4):308-12.
8. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical oncology*. 2014;19(3):423-30.
9. Bernier J, Bentzen SM, Vermorken JB. Molecular therapy in head and neck oncology. *Nature reviews Clinical oncology*. 2009;6(5):266-77.
10. Kundu SK, Nestor M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2012;33(3):707-21.
11. Pancari P, Mehra R. Systemic therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Surgical oncology clinics of North America*. 2015;24(3):437-54.
12. Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rego DF, Simeoni LA, Silveira D, et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. *Clinical oral investigations*. 2015;19(3):637-46.
13. Elias ST, Salles PM, de Paula JE, Simeoni LA, Silveira D, Guerra EN, et al. Cytotoxic effect of Pouteria torta leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2013;9(4):601-6.
14. Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *The British journal of nutrition*. 2015;113 Suppl 2:S102-10.
15. Banerjee M, Tripathi LM, Srivastava VM, Puri A, Shukla R. Modulation of inflammatory mediators by ibuprofen and curcumin treatment during chronic inflammation in rat. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2003;25(2):213-24.
16. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2014;46(1):2-18.

17. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer letters*. 2008;269(2):199-225.
18. Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med*. 2007;13(10):433-42.
19. Cash H, Shah S, Moore E, Caruso A, Uppaluri R, Van Waes C, et al. mTOR and MEK1/2 inhibition differentially modulate tumor growth and the immune microenvironment in syngeneic models of oral cavity cancer. *Oncotarget*. 2015.
20. Kishore TK, Ganugula R, Gade DR, Reddy GB, Nagini S. Gedunin abrogates aldose reductase, PI3K/Akt/mToR, and NF-kappaB signaling pathways to inhibit angiogenesis in a hamster model of oral carcinogenesis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015.
21. Yu CC, Hung SK, Liao HF, Lee CC, Lin HY, Lai HC, et al. RAD001 enhances the radiosensitivity of SCC4 oral cancer cells by inducing cell cycle arrest at the G2/M checkpoint. *Anticancer research*. 2014;34(6):2927-35.
22. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, et al. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012 [acesso em 20/10/2015]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
23. INCA. Estimativa 2016 / 2017: Instituto Nacional do Câncer; 2015 [cited 2015 14/12/2015]. Available from: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>.
24. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer – an appraisal of controversies. *British Dental Journal*. 2009;207(10):4.
25. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral oncology*. 2010;46(6):407-10.
26. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2014;50(5):380-6.
27. Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *British journal of cancer*. 2002;87(2):129-33.
28. Khan Z, Bisen PS. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1836(1):123-45.
29. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International journal of cell biology*. 2010;2010:215158.
30. Mishra R. Cell cycle-regulatory cyclins and their deregulation in oral cancer. *Oral oncology*. 2013;49(6):475-81.
31. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
32. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):2942-55.

33. Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(7):527-35.
34. Jain A, Bundela S, Tiwari RP, Bisen PS. Oncoapoptotic markers in oral cancer: prognostics and therapeutic perspective. *Molecular diagnosis & therapy.* 2014;18(5):483-94.
35. Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral oncology.* 2008;44(4):315-24.
36. Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Grimaldi C, Ognibene A, Manzoli L, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin signaling network and the control of normal myelopoiesis. *Histology and histopathology.* 2010;25(5):669-80.
37. Willems L, Tamburini J, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep.* 2012;14(2):129-38.
38. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(6):596-603.
39. Chiarini F, Evangelisti C, McCubrey JA, Martelli AM. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(2):124-35.
40. Zhou H, Luo Y, Huang S. Updates of mTOR inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 2010;10(7):571-81.
41. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(4):393-412.
42. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* 2008;11(1-2):32-50.
43. Fasolo A, Sessa C. Targeting mTOR pathways in human malignancies. *Curr Pharm Des.* 2012;18(19):2766-77.
44. Moschetta M, Reale A, Marasco C, Vacca A, Carratu MR. Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. *British journal of pharmacology.* 2014;171(16):3801-13.
45. Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et biophysica acta.* 2010;1804(3):433-9.
46. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene.* 2000;19(23):2739-44.
47. Dancy J. mTOR signaling and drug development in cancer. *Nature reviews Clinical oncology.* 2010;7(4):209-19.
48. Afzal M, Safer AM, Menon M. Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology.* 2015;23(4):151-61.

49. Li W, Nie S, Yu Q, Xie M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(15):6685-91.
50. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275(5297):218-20.
51. Jiang H, Shang X, Wu H, Gautam SC, Al-Holou S, Li C, et al. Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J Exp Ther Oncol*. 2009;8(1):25-33.
52. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules*. 2015;20(5):9183-213.
53. Marchiani A, Rozzo C, Fadda A, Delogu G, Ruzza P. Curcumin and Curcumin-like Molecules: From Spice to Drugs. *Current Medicinal Chemistry*. 2014;21(2):204-22.
54. ATCC. SCC-9 (ATCC CRL-1629) <http://www.atcc.org/Products/All/CRL-1629.aspx2015>.
55. ATCC. FaDu (ATCC HTB-43) <http://www.atcc.org/Products/All/HTB-43.aspx2015>.
56. Horii H, Suzuki R, Sakagami H, Umemura N, Ueda JY, Shirataki Y. Induction of non-apoptotic cell death in human oral squamous cell carcinoma cell lines by *Rhinacanthus nasutus* extract. *In Vivo*. 2012;26(2):305-9.
57. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *International Journal of Cancer*. 2004;111(5):679-92.
58. Saran U, Foti M, Dufour JF. Cellular and molecular effects of the mTOR inhibitor everolimus. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2015;129(10):895-914.
59. NIH. FDA Approval for Everolimus Bethesda: National Cancer Institute at the National Institute of Health; 2015 [cited 2015]. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-everolimus>.
60. NIH. FDA Approval for Temsirolimus Bethesda: National Cancer Institute at the National Institute of Health; 2015 [cited 2015]. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-temsirolimus>.
61. Eroglu Z, Tawbi HA, Hu J, Guan M, Frankel PH, Ruel NH, et al. A randomised phase II trial of selumetinib vs selumetinib plus temsirolimus for soft-tissue sarcomas. *British journal of cancer*. 2015;112(10):1644-51.
62. Hobday TJ, Qin R, Reidy-Lagunes D, Moore MJ, Strosberg J, Kaubisch A, et al. Multicenter Phase II Trial of Temsirolimus and Bevacizumab in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(14):1551-6.
63. Knox JJ, Qin R, Strosberg JR, Tan B, Kaubisch A, El-Khoueiry AB, et al. A phase II trial of bevacizumab plus temsirolimus in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Investigational new drugs*. 2015;33(1):241-6.
64. Kordes S, Klumpen HJ, Weterman MJ, Schellens JH, Richel DJ, Wilmink JW. Phase II study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with

advanced pancreatic cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2015;75(6):1135-41.

65. Wainberg ZA, Soares HP, Patel R, DiCarlo B, Park DJ, Liem A, et al. Phase II trial of everolimus in patients with refractory metastatic adenocarcinoma of the esophagus, gastroesophageal junction and stomach: possible role for predictive biomarkers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2015;76(1):61-7.

66. Witzig TE, Reeder C, Han JJ, LaPlant B, Stenson M, Tun HW, et al. The mTORC1 inhibitor everolimus has antitumor activity in vitro and produces tumor responses in patients with relapsed T-cell lymphoma. *Blood*. 2015;126(3):328-35.

67. Bauman JE, Arias-Pulido H, Lee SJ, Fekrazad MH, Ozawa H, Fertig E, et al. A phase II study of temsirolimus and erlotinib in patients with recurrent and/or metastatic, platinum-refractory head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2013;49(5):461-7.

68. Massarelli E, Lin H, Ginsberg LE, Tran HT, Lee JJ, Canales JR, et al. Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26(7):1476-80.

69. Niehr F, Weichert W, Stenzinger A, Budach V, Tinhofer I. CCI-779 (Temsirolimus) exhibits increased anti-tumor activity in low EGFR expressing HNSCC cell lines and is effective in cells with acquired resistance to cisplatin or cetuximab. *Journal of translational medicine*. 2015;13:106.

70. Nathan CO, Amirghahari N, Rong X, Giordano T, Sibley D, Nordberg M, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitors as possible adjuvant therapy for microscopic residual disease in head and neck squamous cell cancer. *Cancer research*. 2007;67(5):2160-8.

71. Schedel F, Pries R, Thode B, Wollmann B, Wulff S, Jocham D, et al. mTOR inhibitors show promising in vitro activity in bladder cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2011;25(3):763-8.

72. Klumpen HJ, Beijnen JH, Gurney H, Schellens JH. Inhibitors of mTOR. *The oncologist*. 2010;15(12):1262-9.

73. Ekshyyan O, Rong Y, Rong X, Pattani KM, Abreo F, Caldito G, et al. Comparison of radiosensitizing effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 to cisplatin in experimental models of head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(8):2255-65.

74. Naruse T, Yanamoto S, Yamada S, Rokutanda S, Kawakita A, Kawasaki G, et al. Anti-tumor effect of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2015;21(3):765-73.

75. Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, Karashima RI, Sato N, Imamura Y, et al. Aberrant activation of the mTOR pathway and anti-tumour effect of everolimus on oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2012;106(5):876-82.

76. Cai Y, Xia Q, Su Q, Luo R, Sun Y, Shi Y, et al. mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces apoptotic, not autophagic cell death, in human nasopharyngeal carcinoma cells. *International journal of molecular medicine*. 2013;31(4):904-12.

77. Hurvitz SA, Kalous O, Conklin D, Desai AJ, Dering J, Anderson L, et al. In vitro activity of the mTOR inhibitor everolimus, in a large panel of breast cancer cell lines and analysis for predictors of response. *Breast cancer research and treatment*. 2015;149(3):669-80.
78. Mendes J, Goncalves AC, Alves R, Jorge J, Pires A, Ribeiro A, et al. L744,832 and Everolimus Induce Cytotoxic and Cytostatic Effects in Non-Hodgkin Lymphoma Cells. *Pathology oncology research : POR*. 2015.
79. Pinto-Leite R, Arantes-Rodrigues R, Palmeira C, Gaivao I, Cardoso ML, Colaco A, et al. Everolimus enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in bladder-cancer cell lines. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2012;75(13-15):788-99.
80. Tan HK, Moad AI, Tan ML. The mTOR signalling pathway in cancer and the potential mTOR inhibitory activities of natural phytochemicals. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(16):6463-75.
81. Johnson SM, Gulhati P, Arrieta I, Wang X, Uchida T, Gao T, et al. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/mTOR signaling. *Anticancer research*. 2009;29(8):3185-90.
82. Beevers CS, Li F, Liu L, Huang S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;119(4):757-64.
83. Lin JN, Lin VC, Rau KM, Shieh PC, Kuo DH, Shieh JC, et al. Resveratrol modulates tumor cell proliferation and protein translation via SIRT1-dependent AMPK activation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(3):1584-92.
84. He X, Wang Y, Zhu J, Orloff M, Eng C. Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. *Cancer letters*. 2011;301(2):168-76.
85. Huang CH, Tsai SJ, Wang YJ, Pan MH, Kao JY, Way TD. EGCG inhibits protein synthesis, lipogenesis, and cell cycle progression through activation of AMPK in p53 positive and negative human hepatoma cells. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(9):1156-65.
86. Zhang Q, Kelly AP, Wang L, French SW, Tang X, Duong HS, et al. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/AkT signaling pathways. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(12):2607-13.
87. Lin Y, Chen H, Kuo Y, Chang Y, Lee Y, Hwang J. Therapeutic Efficacy Evaluation of Curcumin on Human Oral Squamous Cell Carcinoma Xenograft Using Multimodalities of Molecular Imaging. *American Journal of Chinese Medicine*. 2010;38(2):343-58.
88. Mazzarino L, Loch-Neckel G, Bubniak LS, Mazzucco S, Santos-Silva MC, Borsali R, et al. Curcumin-Loaded Chitosan-Coated Nanoparticles as a New Approach for the Local Treatment of Oral Cavity Cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015;15(1):781-91.
89. Chiang IT, Liu Y, Hsu FT, Chien YC, Kao CK, Lin W, et al. Curcumin synergistically enhances the radiosensitivity of human oral squamous cell carcinoma

via suppression of radiation-induced NF-kappa B activity. *Oncology reports*. 2014;31(4):1729-37.

90. Jeon HS, Jo MH, Kim HJ, Lee MH, Yu SK, Kim CS, et al. Anticancer Activities of Diphenyl Difluoroketone, a Novel Curcumin Analog, on KB Human Oral Cancer Cells. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2012;55(4):451-6.

91. Lin FY, Hsieh YH, Yang SF, Chen CT, Tang CH, Chou MY, et al. Resveratrol suppresses TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the inhibition of MAPK pathways in oral cancer cells. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2015;44(9):699-706.

92. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015;574(2):193-203.

93. Lin HY, Hou SC, Chen SC, Kao MC, Yu CC, Funayama S, et al. (-)-Epigallocatechin gallate induces Fas/CD95-mediated apoptosis through inhibiting constitutive and IL-6-induced JAK/STAT3 signaling in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(10):2480-9.

94. Irimie AI, Braicu C, Zanoaga O, Pileczki V, Gherman C, Berindan-Neagoe I, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis and autophagy in oral cancer SSC-4 cells. *OncoTargets and therapy*. 2015;8:461-70.

95. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS one*. 2010;5(4):e10202.

96. Khafif A, Lev-Ari S, Vexler A, Barnea I, Starr A, Karaush V, et al. Curcumin: A Potential Radio-Enhancer in Head and Neck Cancer. *The Laryngoscope*. 2009;119(10):2019-26.

97. Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P, Tudela-Mulero MR. Synergic effect of curcumin or lycopene with irradiation upon oral squamous cell carcinoma cells. *Oral diseases*. 2013;19(5):465-72.

98. Wang L, Ye X, Cai X, Su J, Ma R, Yin X, et al. Curcumin suppresses cell growth and invasion and induces apoptosis by down-regulation of Skp2 pathway in glioma cells. *Oncotarget*. 2015;6(20):18027-37.

99. LoTempio MM, Veena MS, Steele HL, Ramamurthy B, Ramalingam TS, Cohen AN, et al. Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(19):6994-7002.

100. Lin YT, Wang LF, Hsu YC. Curcuminoids suppress the growth of pharynx and nasopharyngeal carcinoma cells through induced apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(9):3765-70.

101. Liao S, Xia J, Chen Z, Zhang S, Ahmad A, Miele L, et al. Inhibitory Effect of Curcumin on Oral Carcinoma CAL-27 Cells Via Suppression of Notch-1 and NF-kappa B Signaling Pathways. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(4):1055-65.

102. Lu Y, Ding N, Yang C, Huang L, Liu J, Xiang G. Preparation and in vitro evaluation of a folate-linked liposomal curcumin formulation. *Journal of Liposome Research*. 2012;22(2):110-9.
103. Rak S, Cimboraz-Zovko T, Gajski G, Dubravcic K, Domijan AM, Delas I, et al. Carboplatin resistant human laryngeal carcinoma cells are cross resistant to curcumin due to reduced curcumin accumulation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2013;27(2):523-32.
104. Khafif A, Schantz SP, Chou TC, Edelstein D, Sacks PG. Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1998;19(3):419-24.
105. Clark CA, McEachern MD, Shah SH, Rong Y, Rong X, Smelley CL, et al. Curcumin inhibits carcinogen and nicotine-induced Mammalian target of rapamycin pathway activation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2010;3(12):1586-95.
106. Ip SW, Wu SY, Yu CC, Kuo CL, Yu CS, Yang JS, et al. Induction of apoptotic death by curcumin in human tongue squamous cell carcinoma SCC-4 cells is mediated through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways. *Cell Biochemistry & Function*. 2011;29(8):641-50.
107. Zhen L, Fan D, Yi X, Cao X, Chen D, Wang L. Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(10):6438-46.