



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

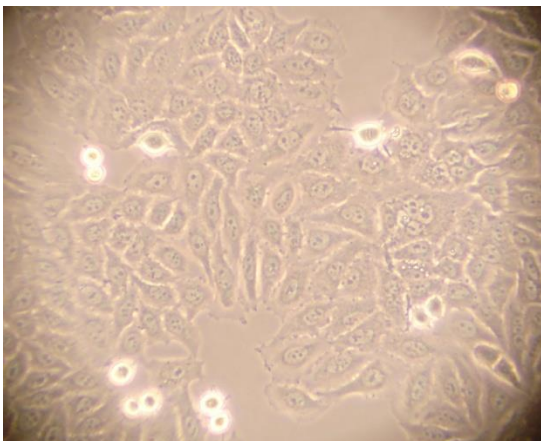
Gabriela Bueno Franco

Análise da expressão gênica em resposta ao tratamento com *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) em carcinoma epidermóide de laringe

São José do Rio Preto
2014

Gabriela Bueno Franco

Análise da expressão gênica em resposta ao tratamento com *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) em carcinoma epidermóide de laringe



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto
2014

Franco, Gabriela Bueno.

Análise da expressão gênica em resposta ao tratamento com *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) em carcinoma epidermóide de laringe / Gabriela Bueno Franco. -- São José do Rio Preto, 2014
114 f. : il., tabs.

Orientador: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Coorientador: Sonia Maria Oliani

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Expressão gênica. 3. *Euphorbia*. 4. Carcinoma de células escamosas. 5. Reação em cadeia de polimerase. 6. Laringe - Câncer. I. Rodrigues-Lisoni, Flávia Cristina. II. Oliani, Sonia Maria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 575.113

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriela Bueno Franco

Análise da expressão gênica em resposta ao tratamento com *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) em carcinoma epidermóide de laringe

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP - Ilha Solteira
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Andréia Machado Leopoldino
USP - Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Cristiane Damas Gil
UNIFESP - São Paulo

São José do Rio Preto
24 de Fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

A Deus, minha família, meus pais, Mary e Adalberto, irmãos, Vinícius e Vivian e esposo Alex, que são sem dúvida meus maiores presentes de Deus, que me apoiaram em todos os momentos e me deram força e sustento para realização dessa conquista.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, que me aceitou e acreditou em meu potencial para realizar esse projeto. Agradeço imensamente por essa oportunidade e pelos ensinamentos, conselhos, amizade, paciência e dedicação constante para fornecer as melhores condições para realização do mestrado. Minha admiração por ser uma pessoa maravilhosa, tanto profissionalmente, quanto pessoalmente.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani, que me acolheu em seu laboratório, dispondo do seu tempo para me ensinar e dar assistência em todos os momentos decisivos. Agradeço pela oportunidade e confiança, com certeza contribuiu muito para minha formação acadêmica e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo o imenso amor de Deus em minha vida, sem Ele nada sou. Em cada momento vivido durante o mestrado, sei que pude contar com Suas bênçãos, proteção, amparo, me guiando, confortando e me ajudando a seguir em frente. Agradeço a Deus também por ter me presenteado com uma família maravilhosa, sem a qual eu jamais teria chegado até o fim dessa jornada.

Sou grata aos meus pais, Adalberto e Mary, simplesmente por existirem em minha vida, o amor incondicional deles me ajudou a vencer todos os obstáculos encontrados ao longo do caminho. Obrigada por cada incentivo, orientação e pelas orações em meu favor.

Aos meus irmãos, Vinícius e Vivian, que sempre confiaram em meu potencial. O amor deles me ajudou a conquistar mais essa vitória.

Agradeço também meu esposo, Alex, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades. Meu sincero agradecimento pelo companheirismo, dedicação e amor.

Aos meus tios, tias e cunhados queridos que também participaram dessa conquista.

Aos amigos que estão comigo há muito tempo e aos que fiz durante o mestrado e que com certeza levo um pouco de cada um em meu coração.

Agradeço o Programa e Professores da Pós-graduação em Genética que auxiliaram na minha formação acadêmica, em especial as professoras Flávia Cristina Rodrigues Lisoni e Sonia Maria Oliani, que com muita paciência e atenção, dedicaram seus valiosos tempos para me orientar em cada passo desse trabalho.

Além de orientar elas compartilharam muitas lições e conhecimentos que levarei para minha vida pessoal e acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida no início do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida em quase todo período do mestrado. Número do processo: 2012/07853-6.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação pela competência e colaboração na resolução de diversos problemas.

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, pela atenção e colaboração.

À Prof^a. Dr^a. Eloiza H. Tajara da Silva, coordenadora do Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelos recursos oferecidos, dos equipamentos e materiais, para realização das técnicas.

À aluna de doutorado Bianca da Cunha Rodrigues, pelo auxílio prestado no desenvolvimento de técnicas, e pela paciência e solicitude.

Ao Prof^o. Dr^o. Wilson Araújo da Silva Junior, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, por me receber em seu laboratório e pelos recursos, equipamentos e materiais oferecidos para realização da Técnica de Hibridização Subtrativa Rápida.

A Auxiliar de Pesquisa Científica e Tecnológica Anemari Ramos Dinarte dos Santos, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo ensino da Técnica de Hibridização Subtrativa Rápida, pela acolhida, paciência e amizade. E a todos do

Hemocentro de Ribeirão Preto que contribuíram com esse trabalho e que me receberam muito bem.

À Prof^a. Dr^a. Paula Rahal, coordenadora do laboratório GENOMA, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, por disponibilizar seu laboratório e recurso para realização desse trabalho.

À aluna de doutorado Marina Curado Valsechi, por me auxiliar com os géis de agarose e realização de PCR e ser sempre solícita.

À Prof^a. Dr^a. Claudia Márcia Aparecida Carareto, coordenadora do Laboratório de Evolução Molecular de insetos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, por disponibilizar seu laboratório e recurso para realização desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva, coordenadora do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, por também ceder seu laboratório.

Aos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia do IBILCE, Alexandre Dantas Gimenes, Aline Camargo Miranda, Ana Paula Girol, Carla Patrícia Carlos, Caroline de Freitas Zanon, Claudia de Mello Bosnich, Cristiane Damas Gil, Jéssica Zani Lacerda, Kallyne Kioko Mimura, Laila Toniol Cardin, Lucas Azevedo, Marina de Paula Silva, Marystela Fávero Oliveira, Rafaela Molás, uma equipe unida que trabalha com disposição e entusiasmo. Agradeço pelos momentos de ajuda, alegria e companheirismo. E em especial, minha querida amiga Janesly Prates, que me acompanhou em todos os momentos, difíceis e alegres, sua amizade e companheirismo me ajudaram muito nessa caminhada.

Sou grata a todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida durante esse período. Essa conquista só foi possível com a ajuda e colaboração dessas pessoas enviadas por Deus.

“O senhor é o meu Pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma, guia-me pelas veredas da justiça, por amor do Seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte não temeria mal algum, porque Tu estás comigo, a Tua vara e o Teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida e habitarei na casa do Senhor por longos dias”.

Salmo, 23

RESUMO

Introdução: O carcinoma epidermóide de laringe é um dos mais comuns a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem essa área e 2% de todas as doenças malignas. Os recursos terapêuticos utilizados são as cirurgias, terapias por irradiação e quimioterapia, porém são considerados altamente invasivos. Por isso, algumas plantas vêm sendo utilizadas no tratamento do câncer, na tentativa de amenizar os danos causados pelos métodos convencionais. Uma dessas tem despertado interesse científico, a *Euphorbia tirucalli*, conhecida popularmente como aveloz. Essa planta é utilizada no tratamento de asma, úlceras, verrugas e possui princípios ativos com atividades biológicas comprovadas cientificamente como, antimutagênica, anti-inflamatória e anticancerígena. **Objetivo:** Em função da importância da fração antitumoral do látex da *E. tirucalli*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência desse fitoterápico nas células de carcinoma epidermóide de laringe (Hep-2), sobre a morfologia, proliferação celular e expressão gênica. **Material e métodos:** As células Hep-2 foram cultivadas em meio completo (MEM 10%), e tratadas nas seguintes concentrações do aveloz (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), para avaliar o possível efeito dessa planta nos tempos de 1, 3, 5 e 7 dias. Após análises estatísticas do teste de proliferação celular, foi efetuado um novo cultivo para extração do RNA e realização da técnica de Hibridização Subtrativa Rápida (RaSH). Os genes com expressão alterada, encontrados na técnica de RaSH, foram analisados por bancos de dados *Gene Ontology (GO)* e *Ingenuity Systems® (IPA)*. A validação de cinco genes encontrados como diferencialmente expressos foi realizada por PCR quantitativo em tempo real. **Resultados:** Após o tratamento com o aveloz, a morfologia das células não sofreu alterações, quando comparada com amostras controles. No teste de proliferação celular, as células apresentaram diminuição do crescimento com o passar do tempo, apresentando resultados mais significantes estatisticamente no 3º dia, na concentração de 25 µg/mL do fitoterápico. Por isso, esses parâmetros foram escolhidos para dar continuidade com a metodologia. Por meio da técnica de RaSH foi constatada alteração na expressão de alguns genes, incluindo *ANXA1*, *TCEA1*,

NGFRAP1, *ITPR1* e *CD55*, os quais estão relacionados respectivamente com a resposta inflamatória, regulação da transcrição, processo apoptótico, transporte do íon cálcio e regulação do sistema complemento. O fitoterápico diminui a expressão do gene *ITPR1*, validado por PCR quantitativo em tempo real e aumenta dos genes *ANXA1* e *CD55*. **Conclusão:** Os dados indicam a participação do aveloz na alteração da expressão de genes envolvidos nos processos tumorigênicos e mostram uma indicação terapêutica para o câncer de laringe.

Palavras-chave: Aveloz, Cultura de células, Hibridização subtrativa rápida (RaSH), Expressão gênica, PCR quantitativo em tempo real.

ABSTRACT

Background: *The larynx squamous cell carcinoma is the most common to hit the head and neck, representing about 25% of malignant tumors that affect this area and 2% of all malignancies. Therapeutic resources used are surgery, chemotherapy and radiation therapies, but are considered highly invasive. Therefore, some plants had been used in the treatment of cancer, in an attempt to soften the damage caused by conventional methods. One of these has attracted scientific interest, the Euphorbia tirucalli, known popularly as aveloz. This plant is used in the treatment of asthma, ulcers, warts and has active principles with activities scientifically proven as antimutagenic, anti-inflammatory and anticancer.*

Aim: *Due of the importance the antitumoral fraction of the latex the E. tirucalli, the present study aimed to evaluate the influence of herbal of the larynx squamous cell carcinoma (Hep-2), on the morphology, cell proliferation and gene expression.*

Methods: *The Hep-2 cells were cultured in complete medium (MEM 10%), and treated in the following concentrations of the aveloz (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) to evaluate the possible effects of this plant in 1, 3, 5 and 7 days. After statistical analysis of the test cell proliferation, was made a new culture for RNA extraction and realization of the Rapid Subtractive Hybridization technique (RaSH). The genes with altered expression, found in RaSH technique, were analyzed databases Gene Ontology (GO) and Ingenuity Systems© (IPA). The validation of the five differentially expressed genes found was performed by real time quantitative PCR.*

Results: *The aveloz treatment did not change the cell morphology compared with control samples and decreased the cell growth, with results more statistically significant on day 3 at a concentration of 25 µg/mL. Therefore, these parameters were chosen to continue with the methods. The RaSH approach detected change in expression of some genes, including ANXA1, TCEA1, NGFRAP1, ITPR1 and CD55, which are respectively associated with the inflammatory response, transcriptional regulation, apoptosis, calcium ion transport regulation and complement system. The aveloz down-regulated ITPR1 gene, validated by real-time quantitative PCR and up-regulated ANXA1 and CD55 genes.*

Conclusions: *The data indicate the involvement of the aveloz in altered expression of genes involved in tumorigenic processes and show a therapeutic indication for larynx squamous cell carcinoma.*

Keywords: *Aveloz, cell culture, Rapid Subtractive Hybridization (RaSH), gene expression, real time quantitative PCR.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem da planta <i>Euphorbia tirucalli</i> .	29
Figura 2: Modelo do experimento do índice de proliferação celular	38
Figura 3: Esquema representativo da técnica de RaSH.	40
Figura 4: Análise morfológica da linhagem celular Hep-2.	52
Figura 5: Efeito do tratamento com aveloz na proliferação das células Hep-2.	53
Figura 6: Efeito da adição do diluente e tratamento com aveloz na proliferação das células Hep-2.	54
Figura 7: Validação da integridade do mRNA.	55
Figura 8: Validação da integridade da primeira fita de cDNA utilizando 10 µg do RNA	55
Figura 9: Validação da integridade da primeira fita de cDNA utilizando 5 µg do RNA	56
Figura 10: Validação da integridade da segunda fita de cDNA.	56
Figura 11: Digestão enzimática do cDNA com <i>Mbo I</i>	57
Figura 12: Ligação dos adaptadores XDPN-14 e XDPN-12 ao cDNA digerido com <i>Mbo I</i> .	58
Figura 13: Rede de interação gênica da via do <i>NFKB</i> obtida na subtração das células Hep-2 controle (Sub A).	62
Figura 14: Rede de interação gênica da via <i>UBC</i> obtida na subtração das células Hep-2 controle (Sub A).	63
Figura 15: Rede de interação dos genes obtidos na subtração das células Hep-2 tratadas com aveloz (Sub B).	64
Figura 16: Curva de eficiência ideal para o iniciador <i>CD55</i> .	65
Figura 17: Expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Experimento do índice de proliferação celular.	38
Tabela 2: Iniciadores desenhados com a ferramenta <i>Primer3</i> para os genes de interesse.	49
Tabela 3: Quantificação em <i>Nanodrop</i> ® do RNA total extraído da linhagem celular Hep-2.	54
Tabela 4: Quantificação em <i>Nanodrop</i> ® dos fragmentos amplificados.	58
Tabela 5: Genes selecionados por RaSH, na biblioteca subtrativa I (Sub A), expressos na linhagem celular Hep-2 controle.	59
Tabela 6: Genes selecionados por RaSH, na biblioteca subtrativa II (Sub B), expressos na linhagem celular Hep-2, com expressão diferencial após o tratamento com aveloz.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

≥: maior ou igual
≤: menor ou igual
>: maior
<: menor
°C: graus Célsius
%: porcentagem
Δ: delta
μL: microlitros
μg: microgramas
μM: micromolar
μFD: microfarad

ACTB: β-actina
ADH: enzima álcool desidrogenase
AKT: proteína quinase
AM10: fração farmacologicamente ativa, extraída do látex do aveloz, padronizada em 70-80% do triterpeno pentacíclico euphol.
ANXA1: anexina A1.
ANXA1 Ac2-26: peptídeo da porção N-terminal da proteína ANXA1
APC: proteína de polipose coli adenomatosa

BAX: proteína pró-apoptótica
BLAST: Ferramenta de pesquisa de alinhamento básico (Basic Local Alignment Search Tool)
Br: Brasil

CA: Califórnia
cdNA: DNA complementar
CD55: fator acelerador de decaimento para o sistema complemento
CECP: carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
c-myc: proteína c-myc
cm²: centímetros quadrados
CO₂: gás carbônico
Ct: cycle threshold
CXCL1/KC: quimiocina (CXC) ligando 1 (CXCL1) é uma pequena citocina que pertence à família das quimiocinas CXC
C3: enzima convertase C3
C5: enzima convertase C5

DAF: fator acelerador de decaimento
DEPC: água ultrapura, tratada com dietil pirocarbonato
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeo fosfatado
DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

FAMERP: Faculdade de medicina de São José do Rio Preto
FHIT: tríade de histidina frágil

g: o grama
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GO: gene ontology

H-ras: homólogo ao oncogene viral v-Ha-ras de sarcoma de rato
Hep-2: linhagem celular humana procedente de carcinoma epidermóide de laringe
HGNC: comitê de nomenclatura gênica (*HUGO Gene Nomenclature Committee*)
HPV: Papilomavirus Humano

IARC: Agência internacional de pesquisa em câncer
IBILCE: Instituto de biociências, letras e ciências exatas
IL-2: interleucina 2
INCA: Instituto nacional do câncer
INF- γ : interferon gama
IPA: Análise Ingenuity Pathways (Systems)
IP3: inositol 1,4,5-trifosfato
IP3R1: receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1
IP3R3: receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3
ITPR1: receptor intracelular inositol 1,4,5-trifosfato (IP3Rs)

Kb: kilobyte
kDa: kilodalton
Kg: quilograma
KV: kilovolt

LGALS1/Gal-1: proteína galectina-1 que, em humanos é codificada pelo gene LGALS1.
Log2: escala logarítmica de base 2
LOTE: tampão de diluição Tris-EDTA

mA: miliampère
Meio MEM (Earle): mistura de sais, enriquecida com aminoácidos, vitaminas e compostos essenciais para crescimento celular
mg: miligrama
min: minutos

(MIP)-2: proteína inflamatória de macrófago-2

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

NCBI: Centro nacional de informações sobre biotecnologia

NF- κ B: fator de crescimento nuclear kappa B

ng: nanograma

NGFRAP1: receptor do fator de crescimento do nervo (TNFRSF16) associado à proteína 1

NH₄OAc: acetato de amônio

NK: Nova York

nm: nanômetro

OHMS: Unidade de medida da resistência elétrica

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PFK-1: enzima 6-fosfofruto-1-quinase

pH: potencial hidrogeniônico

PTEN: homólogo de fosfatase e angiotensina

p16: inibidor p16 de quinase ciclina-dependente

p65: subunidade do fator de transcrição de ubiquitina NF- κ B

RaSH: hibridização subtrativa rápida

Rb: proteína retinoblastoma

RefSeq: sequência de referência

RNA: ácido ribonucleico

RNAP: enzima RNA polimerase II

rpm: rotação por minuto

rRNA: RNA ribossômico

RT: transcriptase reversa

RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real

s: segundos

SAGE: Análise serial da expressão gênica

SOC: meio de cultura usado em biologia molecular para o cultivo de cepas recombinantes de *Escherichia coli*.

SP: São Paulo

Sub A: tester= células Hep-2 controle (sem tratamento) *versus* driver=células Hep-2 tratadas com o aveloz

Sub B: tester= células Hep-2 tratadas com o aveloz *versus* driver= células Hep-2 controle (sem tratamento)

S-II: proteína estimuladora específica da RNA polimerase II

TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA

TCEA1: fator de extensão da transcrição – TFSII tipo 1

TCEA2: fator de extensão da transcrição – TFSII tipo 2

TCEA3: fator de extensão da transcrição – TFSII tipo 3

TFSII: fator de extensão da transcrição

TGF- β : fator de transformação do crescimento beta

TPA: 12-O- tetradecanoilphorbol-13-acetato

TP53: proteína tumoral p53

Trizol: solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina

T1: tumor primário com menos de 3 cm no seu maior diâmetro porém bastante restrito

T2: tumor primário com mais de 3 cm no maior diâmetro ou invadindo tecidos próximos causando comprometimento moderado

U: unidades

UK: Reino Unido

UNESP: Universidade estadual paulista

USA: Estados unidos da América

USP: Universidade de São Paulo

UV: luz ultravioleta

V: volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Cultivo da linhagem celular Hep-2	35
3.2. Tratamento farmacológico com <i>Euphorbia tirucalli</i>	35
3.3. Análise da morfologia celular e índice de proliferação celular	37
3.4. Hibridização subtrativa rápida (RaSH).....	39
3.5. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Análise da morfologia celular e índice de proliferação celular	52
4.2. Hibridização subtrativa rápida (RaSH).....	54
4.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	65
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. ANEXO.....	95

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma doença multifatorial, resultante da ação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, que atuam conjuntamente com a suscetibilidade individual. Esses fatores contribuem para o acúmulo de mutações em uma única célula, as quais prejudicam os mecanismos básicos de controle, liberando inibidores do ciclo celular ou bloqueando a morte celular, fazendo com que a célula se prolifere descontroladamente (PÉREZ-LÓPEZ; CHENDRAUI; HAYA, 2009).

Os carcinomas são neoplasias malignas derivadas de células epiteliais e representam a forma mais comum de câncer humano, sendo a segunda causa de morte mundial (BHOWMICK; MOSES, 2005). Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) representa tumores malignos que aparecem principalmente na cavidade oral, língua, assoalho da boca, tonsilas palatinas, faringe e laringe (ISLAMI et al., 2011). Esses tumores surgem a partir de diversas estruturas anatômicas, incluindo os ossos craniofaciais, tecidos moles, glândulas salivares, pele e membranas mucosas, sendo a maioria do tipo histológico espinocelular (PAI; WESTRA, 2009). Mundialmente é o quinto tipo de câncer mais comum, compreendendo cerca de 6% entre todos os tipos, com incidência de 540.000 casos novos por ano e mortalidade de 271.000 (MARCUS; YEOH, 2009; ISLAMI et al., 2011). No Brasil, estimam-se 11.280 casos novos em homens e 4.010 em mulheres para o ano de 2014, considerando apenas os tumores da cavidade oral. Esses valores correspondem a um risco estimado de 11 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2013).

Em relação ao câncer de laringe, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelou ser um dos mais comuns a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem essa área e 2% de todas as doenças malignas. Ocorre em uma das três porções que divide o órgão, laringe supraglótica, glote e subglote. Aproximadamente 2/3 dos tumores surgem nas cordas vocais verdadeiras, localizadas na glote, e 1/3 acomete a laringe supraglótica (acima das cordas vocais). No ano de 2010 o INCA registrou no Brasil 3.618 mortes, sendo 3.189 em homens e 429 em mulheres, demonstrando que essa doença acomete preferencialmente o sexo masculino. Recentemente, o INCA divulgou a estimativa para o ano de 2014, prevendo 6.870 novos casos em homens, com um risco estimado de 6 casos a cada 100 mil homens e 770 novos casos em mulheres (INCA, 2013).

Os principais fatores de risco para o carcinoma epidermóide de laringe, são o

tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas (HASHIBE et al., 2009). O tabaco possui a fumaça com mistura de compostos químicos, identificados como cancerígenos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research in Cancer - IARC*). Os carcinógenos mais potentes são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tais como benzopireno e nitrosamina (SUN; SCHILLER; GAZDAR, 2007). O etanol é principalmente metabolizado no fígado, em etapas que envolvem oxidação pela enzima álcool desidrogenase (ADH), formando um mutagênico, o acetaldeído. Segundo Marur; Forastiere (2008) o consumo do tabaco associado ao álcool aumenta o risco do câncer de laringe em até 40 vezes.

O histórico familiar é outro fator de risco importante para essa neoplasia, sugerindo que fatores genéticos podem contribuir com a suscetibilidade dessa doença (NEGRI et al., 2009). Alguns autores relatam que o DNA é constantemente danificado por radicais livres pelos processos endógenos, causando danos mutagênicos ao DNA. O processo de reparação desses danos é um mecanismo fundamental para manter a estabilidade do material genético e se alguns desses mecanismos falham, podem levar à fixação da mutação, além de contribuir para o crescimento celular desregulado, originando o câncer (MATULLO et al., 2006; WANG et al., 2013).

As alterações do DNA responsáveis pelo aparecimento da carcinogênese, geralmente, ocorrem em genes envolvidos com proteínas que regulam o ciclo celular, crescimento e a diferenciação celular. Esses são classificados em oncogenes e genes de supressão tumoral (JORDE et al., 2000). No carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço os oncogenes *H-ras*, *c-myc*, *ciclina D1*, *EGFR* e *TGF- β* estão frequentemente ativados e os genes supressores tumorais inativados, tais como, o *TP53*, *p16*, *FHIT*, *PTEN*, *Rb* e o *APC* (LOTHAIRE et al., 2006; CHOI; MYERS, 2008; DASGUPTA et al., 2012).

Outros fatores que podem contribuir para o câncer de laringe incluem a dieta, higiene oral, em que o risco é superior com cuidado inadequado, levando a infecções crônicas causadas por bactérias responsáveis pela patogênese desse tipo de tumor e a massa corporal, que pode modular a toxina e o metabolismo carcinogênico (PAVIA et al., 2006; GUHA et al., 2007). Platek e colaboradores (2013) relataram que a perda de peso dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos ao tratamento por quimioterapia, está associada com agravamento clínico e diminuição da qualidade de vida, inferindo que o estado

nutricional inadequado diminui a resposta ao tratamento e aumenta as complicações, resultando em toxicidade e prognóstico ruim.

Além desses fatores, a poluição ambiental e certas condições de trabalho associadas a indústrias como a metalurgia e petroquímica, podem contribuir para o desenvolvimento da doença (CHOI; MYERS, 2008). O estudo realizado por Conway e colaboradores (2010) mostrou que o desemprego, baixa renda, classe social, nível educacional e trabalho rural, correlacionam com o risco aumentado do desenvolvimento do tumor.

A ocorrência dessa carcinogênese também está associada com o aumento da idade, porém, durante a última década, observa-se um crescimento significativo desse câncer entre indivíduos mais jovens, mesmo entre aqueles que não consomem álcool e fumo, o que reforça a participação de outros fatores etiológicos nessa carcinogênese como, infecções pelo papilomavírus humano - HPV, principalmente dos tipos 16 e 18, e Epstein-Barr vírus, os quais parecem estar associados ao aparecimento de tumores mais agressivos (GILLISON et al., 2008; MARCU; YEOH, 2009). Lassig e colaboradores (2013) avaliaram as diferenças de sobrevivência entre pacientes jovens e idosos com câncer de cabeça e pescoço e não encontraram diferenças estatisticamente significativas de sobrevivência, inferindo que o aumento da incidência entre indivíduos mais jovens é provavelmente por um efeito secundário do HPV.

Os sintomas das neoplasias, segundo o INCA, são os mais variados possíveis, dependendo do tipo e da localização. Como a laringe é o órgão fonador, está estreitamente ligada à produção da voz, dessa maneira, o primeiro sinal é o aparecimento da rouquidão. Além disso, também se observa a ocorrência da odinofagia (deglutição dolorosa), dispneia (falta de ar) e disfagia (dificuldade de deglutição) (INCA, 2011). No entanto, sua proximidade anatômica e origem embriológica, comum a outras estruturas do aparelho mastigatório e sistema digestório, fazem com que problemas patológicos graves na laringe, afetem de maneira marcante as estruturas circunvizinhas, causando enorme perda funcional, social e psicológica no paciente, alterando sua qualidade de vida (DORNFELD et al., 2007).

Os métodos mais utilizados para correta avaliação da evolução do câncer de laringe são a gradação histológica e estadiamento, importantes para definir o prognóstico e tratamento a ser realizado. A gradação histológica baseia-se no

número de mitoses e na diferenciação das células tumorais em relação as do tecido normal. Três graus descritivos de diferenciação são utilizados, bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (ESTRELA; ELIAS; MARTINS, 2004). Em relação ao estadiamento da lesão, os tumores nos estádios T1 (tumor primário com menos de 3 cm) e T2 (tumor primário com mais de 3 cm, invadindo tecidos próximos) possuem prognóstico, em longo prazo, bastante favorável, com taxas de sobrevida global para 5 anos de 65% a 70% (HASHIBE et al., 2007). Contudo, os pacientes com lesões nos estádios iniciais, em geral apresentam poucos sintomas, o que resulta em atraso do diagnóstico e sobrevida menor. Infelizmente, a maioria dos casos é diagnosticada em estádios avançados da doença (60% nos estádios III e IV), podendo variar consideravelmente em agressividade, metástase potencial e sensibilidade à radioterapia e quimioterapia (HERCHENHORN; DIAS, 2004). Esse fato demonstra a necessidade de melhorias no desenvolvimento de marcadores prognósticos e diagnósticos nos processos complexos da tumorigênese de cabeça e pescoço, em especial de laringe (PEDRERO et al., 2004).

O tratamento para essa neoplasia é definido em função do tipo celular, grau de diferenciação, local, extensão, presença de metástases linfonodais, características macroscópicas e envolvimento ósseo e muscular do tumor. É importante levar em consideração a preservação da fala, salivação, mecanismo da deglutição, condições físicas, sociais e ocupacionais do paciente (HASHIBE et al., 2007). Os métodos convencionais utilizados são as cirurgias, terapias por irradiação e quimioterapia (FRANZI; SILVA, 2003).

As cirurgias são os métodos mais antigos e consistem em remover o tumor do paciente. Altamente invasivas, podem causar lesões estéticas irrecuperáveis, com significativo comprometimento funcional, como perda da voz e olfato e limitação dos movimentos dos ombros. As cirurgias para o câncer de laringe são conhecidas como laringectomias totais ou parciais. As laringectomias totais (remoção de toda laringe) podem causar afonia (perda parcial ou total da voz) do paciente, porém, pesquisas relatam boa qualidade de vida após esse procedimento cirúrgico. As laringectomias parciais (retirada de apenas uma parte da laringe) são chamadas cirurgias conservadoras, pois as funções da laringe são mantidas por vias naturais (ROGERS; AHAD; MURPHY, 2007; BERTINELLI; TOURINHO FILHO; CAPONI, 2008).

A radioterapia ou radiação é um tratamento que utiliza raios X, Gamma ou

elétrons para controlar o câncer mediante inibição das divisões celulares. Pode ser utilizada depois da cirurgia para reduzir o risco de desenvolvimento de um novo tumor. Entre 50% e 60% dos casos requerem radiação em algum momento do tratamento (DORNFELD et al., 2007).

A quimioterapia por sua vez, envolve a utilização de diferentes agentes quimioterápicos, que combinados entre si, tornam-se eficientes em 30% a 40% dos pacientes, com o tempo de progressão do tumor diminuído em aproximadamente 10 vezes (KHURI et al., 2000). As drogas mais utilizadas no tratamento do câncer de laringe são paclitaxel (taxol), cisplatina e 5-fluorouracil (HUANG et al., 2004). A cisplatina é também efetiva no tratamento do câncer de testículo, ovário (LE MOGUEN et al., 2007), bexiga (IAFFAIOLI; MILANO; CAPONIGRO, 2007) e pulmão (BRIA et al., 2007). Essa droga é um agente antineoplásico composto de platina e possui mecanismo de ação com possível ligação cruzada e interferência com a função do DNA. O principal efeito farmacodinâmico é a inibição do crescimento celular. A citotoxicidade é causada pela formação de aductos, ou seja, uniões covalentes produzidas entre a droga e as bases nitrogenadas do DNA. Em pacientes com tumores inoperáveis, o uso da quimioterapia baseada em platina aumenta a taxa de sobrevivência de 15% para até 50%. Pesquisas envolvendo terapias sequenciais de indução de quimioterapia e radiação mostram taxas de sobrevivência alentadoras próximas aos 70% (AWADA; ISMAEL, 2007).

Além desses métodos convencionais, algumas plantas estão sendo aproveitadas pela medicina popular como terapias alternativas para tentar amenizar os danos causados pelos recursos já conhecidos. Uma dessas tem despertado interesse dos cientistas, a *Euphorbia tirucalli* - *E. tirucalli* (Figura 1), conhecida popularmente como aveloz, utilizada no tratamento fitoterápico de asma, úlceras, verrugas e tumores em geral (BETANCUR-GALVIS et al., 2002; MELO et al., 2011).



Figura 1: Imagem da planta *Euphorbia tirucalli*. Originária da África é conhecida popularmente como aveloz (cultivando.com.br®).

Originária da África, a *E. tirucalli* foi posteriormente introduzida em outros países. No Brasil, é encontrada em todas as regiões, principalmente norte e nordeste (CORRÊA, 1994). Essa planta é um arbusto semilenhoso, lactescente, com caules cilíndricos e ramificados, folhas e flores pequenas e raras. Pode ser utilizada para fins ornamentais e para formação de cercas-vivas, podendo atingir 9 metros de altura em seu habitat natural. No país, é considerada uma das plantas medicinais mais utilizadas como agente anticarcinogênico (FAHN, 1990).

A análise do tecido vegetal demonstra que essa planta é rica em cálcio (244,85 g/kg), potássio (13,74 g/kg), magnésio (4,34 g/kg), nitrogênio (9,17 g/kg), fósforo (1,05 g/kg), manganês (102,67 mg/kg), boro (20,28 mg/kg), ferro (62,73 mg/kg), zinco (20,30 mg/kg) e cobre (9,78 mg/kg) (NETZEL; ARAUJO, 2009). Além disso, possui avelosina, euphol, euphorbol, euphone, euphorona, isoeuphoral, tirucalol, triterpenos, hidrocarbonetos, entre outros (DANTAS, 2007). Alguns desses compostos apresentam atividades biológicas comprovadas cientificamente como, antibacteriana, antimicrobiana, antiviral, antisséptica, larvicida, moluscicida, anti-inflamatória, antitumoral, antimutagênica, anticancerígena para câncer de mama, pulmão, cervical, colo, esôfago e boca (JURBERG; CABRAL NETO; SCHALL, 1985; LIRIO; HERMANO; FONTANILLA, 1998; YADAV et al., 2002; MADUREIRA et al., 2004; TIWARI; SINGH, 2005; VALADARES et al., 2006).

Os princípios ativos do aveloz podem variar suas concentrações em função das condições ambientais, como estresse hídrico, solo pobre em nutrientes, alterações da temperatura e luminosidade (FURSTENBERGER; HECKER, 1986).

Wada e colaboradores (2002) demonstraram que a variação na hidrofília de alguns terpenóides é um dos fatores químicos que permite a abrangência das

atividades biológicas descritas para a espécie, algumas até antagônicas, como potencial promotor tumoral e antitumoral.

Em relação à ação promotora do aveloz no processo carcinogênico, Peirce; Roe (1962) estudaram o efeito do látex do aveloz em tumor de pele em ratos, usando diferentes dosagens do látex diluído em acetona. Observaram que o aveloz aumentou o tumor e essa ação pode ser explicada pela existência dos compostos ésteres diterpênicos de phorbol e ésteres ingenol, que tornam o látex irritante e tóxico, podendo causar inflamação (VAN DEN BOSCH et al., 1993), conjuntivites, queratites, uveítes, cegueira (CATALUÑA; RATES, 1999; KAZANIETZ et al., 2000) e também induzir o desenvolvimento de carcinomas nasofaríngeos e linfomas de Burkitt (OSATO et al., 1987; AYA et al., 1991; MACNEIL et al., 2003; OREM et al., 2007).

Apesar de alguns autores designarem uma ação pró-carcinogênica desse fitoterápico, seu potencial antitumorigênico e antimutagênico já foi confirmado, geralmente quando utilizado em pequenas concentrações e frações específicas separadas do seu látex (BETANCUR-GALVIS et al., 2002; REZENDE et al., 2004; VALADARES et al., 2006; AQUINO et al., 2008).

A ação antitumoral do aveloz foi investigada em modelos de tumores ascíticos de Ehrlich. Esse modelo induz alterações profundas nos compartimentos da medula óssea, declinando o número de células progenitoras dos macrófagos e granulócitos (QUEIROZ et al., 2004). Camundongos com esse tipo de tumor quando tratados com o extrato da *E. tirucalli* tiveram direta ou indiretamente atividade moduladora sobre a resposta hematopoiética, reduzindo o crescimento do tumor e prolongando a sobrevivência do animal (VALADARES et al., 2006). Uma alternativa que justifica seu potencial antitumorigênico é a antimutagenicidade, pois substâncias com potencial antimutagênico aumentam a eficiência dos mecanismos de reparo, atuando como agentes protetores que diminuem a frequência de danos no DNA, controlando a multiplicação desordenada das células tumorais (REZENDE et al., 2004). A antimutagenicidade foi testada no sistema metionina em *Aspergillus nidulans* (fungo filamentoso), demonstrando que o látex do aveloz, diminuiu significativamente a frequência de mutação em relação à mutação espontânea obtida para o controle nesses experimentos (REZENDE et al., 2004). Outra justificativa para as propriedades antitumorigênicas dessa *Euphorbiaceae* é a presença de ingenanos, que desestabilizam a organização dos microtúbulos pelo efeito inibitório na

polimerização da tubulina. A baixa estabilidade dos microtúbulos inibe os mecanismos do ciclo celular e as células ficam paradas no final da fase G, inibindo o crescimento celular (KHALEGHIAN et al., 2010).

Em relação às atividades anticarcinogênicas da *E. tirucalli*, alguns autores relatam que sua ação ocorre pela modulação da principal enzima que regula o processo glicolítico, a 6-fosfofruto-1-quinase (PFK-1). Como as células tumorais possuem grande necessidade por glicose, já que seu metabolismo está alterado devido à alta taxa de divisão celular, precisam aumentar a ação dessa enzima, porém, o aveloz age diminuindo a atividade da PFK-1, exercendo mecanismo antineoplásico (GREINER; GUPPY; BRANDY, 1994; MEIRA et al., 2005). Os efeitos anticancerígenos do euphol (álcool triterpeno tetracíclico isolado do látex da *E. tirucalli*) foram avaliados em células humanas de câncer gástrico. O fitoterápico apresentou maior citotoxicidade contra as células oncológicas do que contra as normais e aumentou a expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAX), promovendo a morte celular. Portanto, o euphol inibe o crescimento das células do câncer gástrico e o desenvolvimento do tumor, sendo de grande valor para terapia da doença (LIN et al., 2012).

As propriedades anti-inflamatórias do aveloz também estão sendo estudadas. Bani e colaboradores (2007) observaram que o látex da *E. tirucalli* inibiu a inflamação provocada pela artrite em modelo animal. Os sinais para essa ação foram redução da permeabilidade vascular, migração leucocitária, supressão dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ e citocinas intracitoplasmáticas pró-inflamatórias INF- γ e IL-2. Dutra e colaboradores (2011) relataram que os mecanismos subjacentes à atividade anti-inflamatória do euphol estão provavelmente relacionados com sua capacidade de inibir moléculas de adesão, tais como a expressão de selectina e integrina. Passos e colaboradores (2013) observaram que a aplicação tópica do euphol inibiu acentuadamente a resposta inflamatória induzida por TPA (12-O-tetradecanoilphorbol -13-acetato/TPA), demonstrando que o euphol pode ser utilizado como terapia alternativa em doenças de pele.

Diante dos dados conflitantes na literatura, no qual alguns estudos apontam para efeitos pró-carcinogênicos e outros para atividades antitumorais, tornam-se fundamentais novos trabalhos que explorem as propriedades do aveloz. Dessa maneira, avaliamos seu efeito em células de carcinoma epidermóide de laringe, em busca de marcadores moleculares para possíveis terapias inovadoras.

2. OBJETIVOS

Em função da importância da atividade antitumoral da fração extraída do látex da *Euphorbia tirucalli* (aveloz), incluindo seus elementos químicos, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência desse fitoterápico nas células neoplásicas sobre a morfologia, proliferação celular e expressão gênica, observando como o aveloz modula a expressão gênica e como essas alterações podem participar do processo tumorigênico.

O efeito do extrato do aveloz foi avaliado nas células da linhagem de carcinoma epidermóide de laringe (Hep-2), analisando os seguintes aspectos:

1. a morfologia e o índice de proliferação celular pelo ensaio da curva de crescimento;
2. a análise da expressão gênica pela tecnologia de hibridização subtrativa rápida (RaSH);
3. validação da expressão de cinco genes diferencialmente expressos por PCR Quantitativo em tempo real;
4. identificação das vias de sinalização celular que os genes, modulados pelo aveloz, participam, importantes para o processo tumorigênico e inflamatório, pelo *software Ingenuity Systems*© (IPA).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunomorfologia, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto-SP, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani, no Laboratório de Genética Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto-SP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP com supervisão do Prof^o. Dr^o. Wilson Araújo da Silva Junior e no Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática Médica, Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP (FAMERP) com coordenação da Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Tajara da Silva. O presente estudo não precisou de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa por se tratar de linhagem celular secundária.

3.1. Cultivo da linhagem celular Hep-2

A linhagem celular Hep-2 (linhagem humana originalmente descrita como procedente de carcinoma epidermóide de laringe) (*ATCC Rockville, Maryland, USA*), foi cedida pela Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Tajara da Silva. As células foram semeadas em garrafas de cultura de 75 cm², na concentração de 10⁶ células, cultivadas em meio completo MEM-Earle (Cultilab, Br), pH 7.5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Br), 1% de aminoácidos não essenciais 10 mM (Invitrogen, *Carlsbad, USA, UK*), 1% de piruvato de sódio 10 mM (*Invitrogen, Carlsbad, USA, UK*) e 1% de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, *Carlsbad, USA, UK*) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, até se aderirem na garrafa de cultura. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou até se tornar confluyente. Quando a densidade celular se mostrou alta (80-90%), o material foi submetido à desagregação celular por meio de tripsina e subdividido em duas réplicas, fornecendo quantidade ideal de células para o desenvolvimento das metodologias propostas.

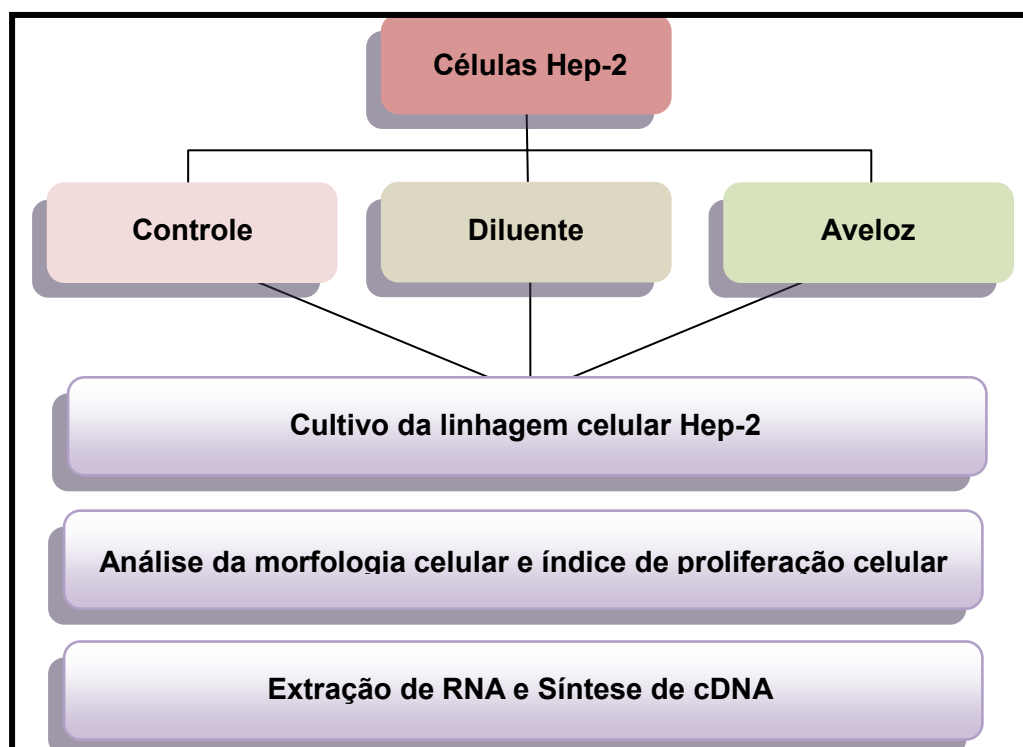
3.2. Tratamento farmacológico com *Euphorbia tirucalli*

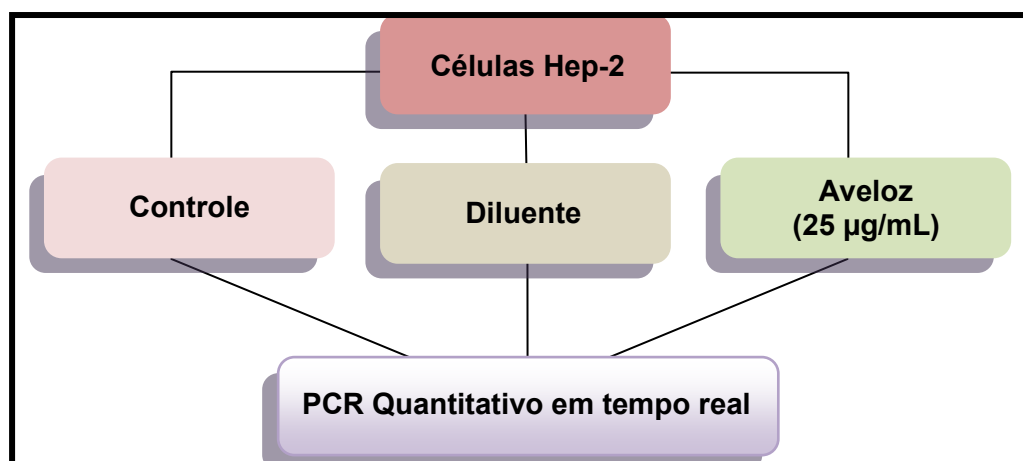
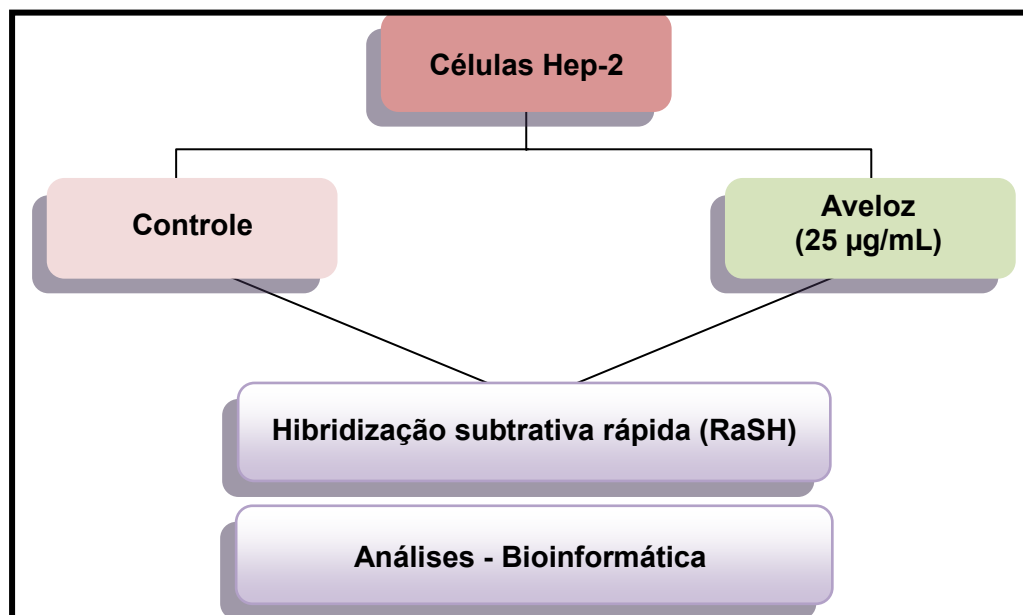
A tintura da *Euphorbia tirucalli* foi cedida gentilmente pelo Dr. Luiz Francisco Pianowski, presidente do laboratório farmacêutico Kyolab. Apenas a porção antitumorigênica farmacologicamente ativa do látex da *Euphorbia tirucalli* foi

preparada, padronizada em 70-80% de triterpeno pentacíclico euphol e patenteada como extrato AM10. Teske e Trentini (1997) relataram que as tinturas vegetais precisam ser preparadas à temperatura ambiente, pela ação do álcool sobre a planta, utilizando o processo de maceração. A tintura utilizada em nossos experimentos foi preparada a 20% (200g de *E. tirucalli* para 1000g de etanol a 70%), utilizando partes aéreas da planta fresca, fracionada em partes menores, imersa em solução hidroalcoólica a 70% e filtrada.

Nos experimentos *in vitro* foi utilizada uma faixa de concentração de 0,25 a 250 $\mu\text{g/mL}$ do extrato do aveloz, as quais foram testadas na linhagem celular Hep-2 (PIANOWSKI; CHAVES; CALIXTO, 2009). Dessa maneira, as células foram semeadas em meio completo (MEM 10%) e subdivididas em três grupos: a) controle, sem manipulação; b) submetidas à adição do diluente e c) tratadas com aveloz nas concentrações de 0,25 a 250 $\mu\text{g/mL}$. O grupo de células que recebeu o diluente foi criado apenas para provar que o efeito obtido, seja no crescimento celular ou na expressão gênica, realmente era por influência do aveloz e não pelo etanol que diluiu o fitoterápico.

Os tratamentos foram adicionados e as quantificações realizadas nos dias 1, 3, 5 e 7 do experimento, para determinar o tempo e concentração do aveloz estatisticamente significantes em relação ao crescimento celular, para continuar os ensaios de análise da expressão gênica diferencial, de acordo com os fluxogramas a seguir.





3.3. Análise da morfologia celular e índice de proliferação celular

O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41*.

Para analisar o índice de proliferação celular, uma curva de crescimento foi realizada para cada concentração do aveloz a ser testada (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). As células Hep-2 foram cultivadas em duas placas de cultura de 6 poços, semeadas na concentração de 5×10^4 em 2mL de meio MEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se aderirem no substrato. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio sem soro (MEM 0%), a fim de deixar todas as células na

mesma etapa celular. Após 24 horas, o meio sem soro foi substituído por meio completo, permanecendo um conjunto de poços somente com meio completo (MEM 10%), outro com diluente (quantidade em μL equivalente as concentrações do aveloz) e outro com aveloz (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$), perfazendo o dia zero do experimento. As células, nas duas placas de cultura foram desagregadas por ação da tripsina e quantificadas em *Countess® Automated Cell Counter* (Invitrogen), utilizando o corante *Trypan Blue*, nos dias 1, 3, 5 e 7 do experimento, realizado em triplicata, esquematizado na Tabela 1 e Figura 2.

Tabela 1: Experimento do índice de proliferação celular. As células Hep-2 foram semeadas com meio completo MEM 10% na concentração de 5×10^4 por poço (placa de 6 poços). Os ensaios foram realizados para três condições (controle, diluente e tratadas com aveloz [0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$]).

Experimento	Controle (4 poços)	Diluente (4 poços)	Aveloz (4 poços)
1	5×10^4 células	5×10^4 células	5×10^4 células
2	-retirar o meio completo -adicionar meio sem soro	-retirar o meio completo -adicionar meio sem soro	-retirar o meio completo -adicionar meio sem soro
3 (0 dia)	-retirar meio sem soro -adicionar meio completo	-retirar meio sem soro -adicionar meio completo e diluente	-retirar meio sem soro -adicionar meio completo e aveloz
4 (1º dia)	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço
5 (3º dia)	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço
6 (5º dia)	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço
7 (7º dia)	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço	-contar as céls de 1 poço

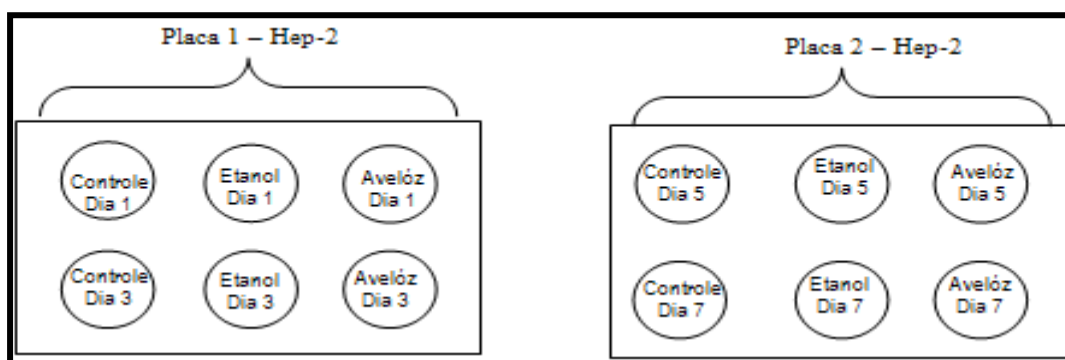


Figura 2: Modelo do experimento do índice de proliferação celular. Nas duas placas com 6 poços foram semeadas em meio completo MEM 10% células Hep-2 na concentração de 5×10^4 por poço em diferentes condições (controle, diluente e aveloz), coletados nos dias 1, 3, 5 e 7, para cada concentração do aveloz a ser testada (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$).

O teste estatístico utilizado para comparar as curvas de crescimento celular foi “Análise de Variância *one-way*”, utilizando o programa *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software*), o qual comparou os grupos em cada tempo experimental. A diferença significativa foi assumida quando o valor de $P < 0,05$.

Após essas análises, foram escolhidos o tempo e a concentração do fitoterápico que deram maior diferença estatística significativa em relação à diminuição do crescimento celular, para dar continuidade com as análises da expressão gênica diferencial, pela tecnologia de hibridização subtrativa rápida (RaSH).

3.4. Hibridização subtrativa rápida (RaSH)

A técnica de RaSH (*Rapid Subtractive Hybridization*), representada na Figura 3 (JIANG et al., 2000), consiste em analisar a expressão diferencial entre duas amostras de cDNA (antes e depois do tratamento com drogas), subtraindo os transcritos comuns e isolando transcritos presentes exclusivamente em uma das amostras.

Nessa tecnologia, o cDNA é sintetizado a partir de mRNA. Uma das amostras, denominada *tester*, é originada a partir do mRNA da linhagem celular cujos genes se quer identificar. A outra, denominada *driver*, é obtida a partir do mRNA da linhagem celular utilizada para comparação e cujos genes, comumente expressos, devem ser subtraídos.

As moléculas de cDNA de ambas amostras são submetidas a digestão por endonuclease de restrição *Mbo I*, para gerar fragmentos de menor tamanho. Sequências adaptadoras (XDPN-14 e XDPN-12), as quais possuem a sequência nucleotídica reconhecida pela endonuclease de restrição *Mbo I*, são ligadas as extremidades das moléculas de cDNA. Após a ligação dos adaptadores, é realizada uma reação de amplificação, por PCR, utilizando oligonucleotídeos complementares a sequência contida nos adaptadores (XDPN-18). Essa etapa permite a obtenção de maior quantidade dos fragmentos representados nas amostras de cDNA, facilitando a etapa de subtração.

Em seguida, somente os *amplicons* originados a partir do *tester* são digeridos com a enzima *Xho I*, gerando extremidades coesivas. Após a digestão enzimática, os produtos amplificados da amostra *tester* são desnaturados e renaturados na

presença de um excesso de fragmentos amplificados a partir da amostra *driver*. Três tipos de fragmentos híbridos são formados: *tester-tester*, *tester-driver* e *driver-driver*. As moléculas *tester-tester* representam transcritos expressos exclusivamente na amostra de interesse, as moléculas *tester-driver* representam transcritos comuns às duas amostras e as moléculas *driver-driver* correspondem a transcritos expressos apenas na amostra utilizada para comparação. Contudo, apenas os híbridos *tester-tester* são selecionados pela clonagem em vetor com extremidades coesivas, o qual também foi previamente digerido por *Xho I*.

Os clones são sequenciados e os resultados analisados pelo programa computacional público BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível na página do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*: www.ncbi.nlm.nih.gov). Os dados obtidos são validados pela técnica de PCR quantitativo em tempo real, identificando o nível de transcrição dos genes, relacionando com os genes expressos na amostra de referência.

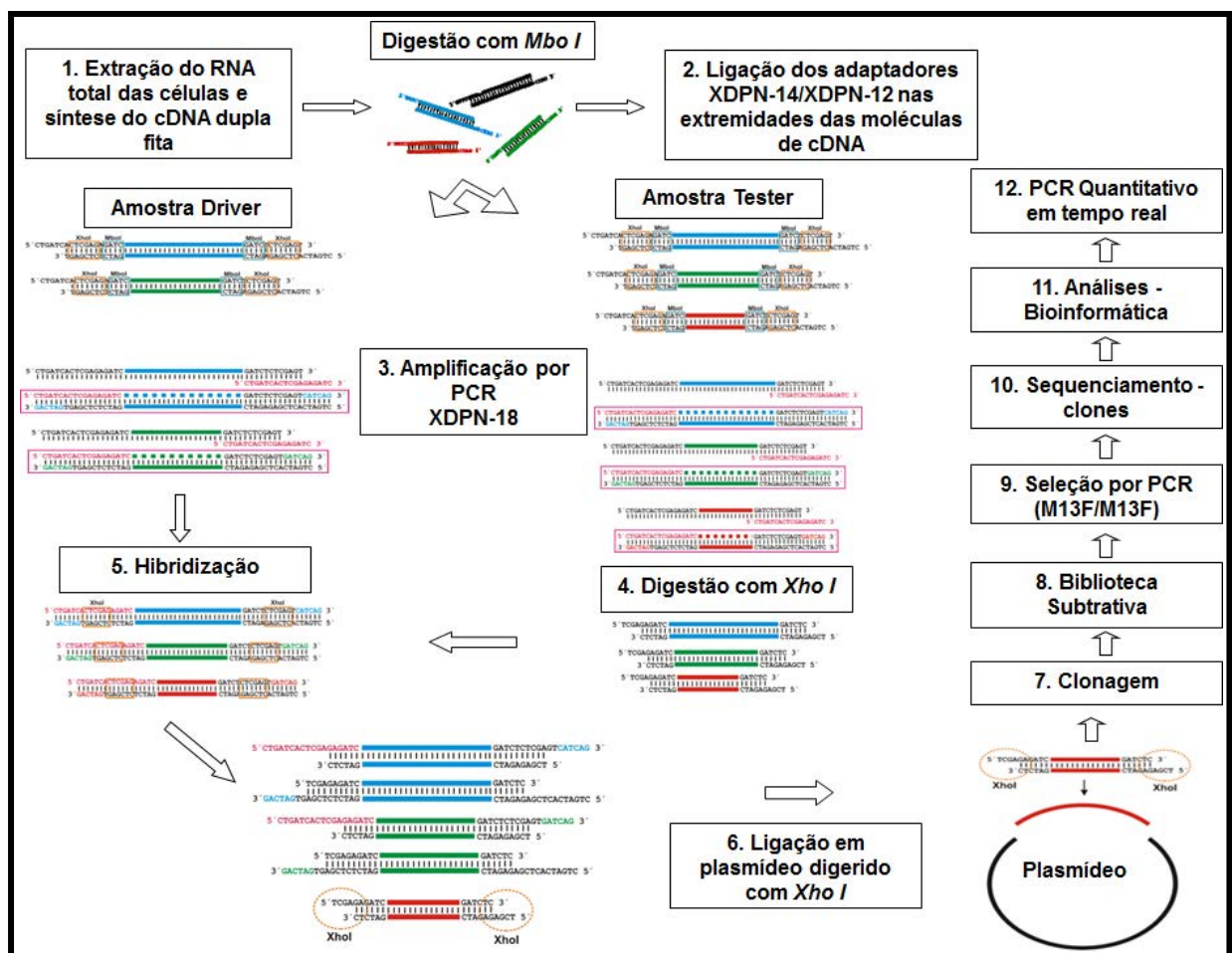


Figura 3: Esquema representativo da técnica de RaSH. O cDNA dupla fita é obtido a partir de mRNA. Adaptadores com sítio para enzima de restrição são ligados aos cDNAs. Somente a amostra utilizada como *tester* sofre digestão com enzima de restrição correspondente. O *tester* é hibridizado

com excesso da amostra *driver*. Assim, transcritos presentes nas duas amostras formam híbridos. Somente transcritos presentes no *tester* apresentarão os sítios complementares nas duas extremidades e poderão ser clonados e posteriormente sequenciados.

3.4.1. Extração de RNA total

Após investigação, pelo teste de proliferação celular, em qual tempo e concentração o tratamento com o fitoterápico apresentou maior diferença estatística significativa em relação à diminuição do crescimento celular, foi extraído o RNA das células Hep-2 submetidas às condições experimentais (controle, diluente e aveloz), pelo método do trizol. As células Hep-2 foram cultivadas em três garrafas de cultura com 75 cm² na concentração de 1x10⁶ células/mL em cada garrafa, durante três dias (72 horas). Na primeira garrafa, as células foram mantidas somente em meio completo MEM 10%, na segunda, além do meio completo MEM 10%, foram acrescentados 150 µL do diluente e na última, adicionou-se 150 µL do aveloz (25 µg/mL) ao meio completo MEM 10%. O meio foi retirado e as células foram lavadas com 5,0 mL de PBS, o qual foi aspirado para adição de 3,0 mL de trizol, solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. O material de cada amostra foi distribuído em três tubos de 1,5 mL, mantidos à temperatura ambiente por 5 min, para adição de 200 µL de clorofórmio gelado. Os tubos foram homogeneizados por 1 min. e incubados à temperatura ambiente por 3 min. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 20 min., para separar a fase aquosa, que contém RNA, da interfase branca e leitosa que contém principalmente proteínas, e da fase orgânica, com DNA e proteínas. O RNA foi transferido para um novo tubo com 400 µL de isopropanol gelado e 10 µg de glicogênio, mantido à -20°C por 30 min. Após essa etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 20 min. e o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento foi lavado três vezes com 1,0 mL de etanol 70% gelado, agitado até soltar do tubo e centrifugado a 4°C, 7.500 rpm por 7 min. O excesso de etanol foi retirado e o material ressuspendido em 20 µL de água livre de nucleases (*DEPC*). As amostras foram colocadas em banho seco a 57°C por 10 min., para evaporação do etanol e posteriormente armazenadas a -80°C (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.4.2. Quantificação e avaliação da integridade do RNA

A concentração do RNA total foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)*, a 260/280 nm. A pureza do RNA em relação à contaminação com proteínas foi avaliada pela razão das absorbâncias. A absorbância máxima dos ácidos nucleicos sob luz UV ocorre no comprimento de onda de 260 nm e das proteínas em 280 nm. A razão dos valores de absorbância a 260 e 280 deve ser entre 1,8 e 2,0. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% pela observação das bandas ribossomais 18S e 28S.

3.4.3. Síntese de cDNA dupla fita

A síntese de cDNA dupla fita (DNA complementar) foi realizada a partir do RNA total obtido da linhagem celular Hep-2 submetida às condições experimentais (controle, diluente e aveloz). A primeira fita de cDNA para utilização na tecnologia de RaSH foi confeccionada utilizando-se o *Kit SuperScript™ - II First-Strand cDNA Synthesis for Reverse Transcriptase (RT-PCR) (Invitrogen)*. Dez microgramas de cada amostra de RNA total foram incubadas com 2,0 µL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/mL) e 2,0 µL de dNTP Mix (10 mM) a 65°C por 5 min. A mistura foi resfriada em gelo para adição de 4,0 µL de 5X *First-Strand Buffer* [250 mM Tris-HCL (pH 8,3), 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂], 2,0 µL de DTT (0,1 mM) e 1,0 µL de RNaseOUT™ (40 U/µL). O material foi incubado a 42°C por 2 min. e adicionado 1,0 µL da enzima transcriptase reversa (RT) *SuperScript™ II* (200 U/µL). A mistura foi incubada novamente a 42°C por 50 min. e, em seguida, a 70°C por 15 min. O cDNA foi armazenado a -20°C.

A síntese da primeira fita de cDNA também foi realizada com *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem™)*, nesse caso, para validação por PCR quantitativo em tempo real, dos genes diferencialmente expressos, encontrados na tecnologia de RaSH. Cinco microgramas de cada amostra de RNA total foram utilizadas com 10 µL de 10X *RT Buffer*, 10 µL de 10X *RT Random Primers*, 4,0 µL de 25X *dNTP Mix* (100 mM), 5,0 µL da enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL) e água *DEPC*, completando 50 µL.

As amostras foram incubadas a 25°C por 10 min., depois a 37°C por 2 horas e a 85°C durante 5 min.

Após sintetizar a primeira fita de cDNA, foi realizada em ambos protocolos, uma reação de PCR com gene constitutivo *β-actina* (ACTB), utilizando os seguintes reagentes: 2,0 µL de 10X PCR *Buffer* [200 mM Tris-HCL (pH 8,4), 500 mM KCL], 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,4 µL de dNTP Mix (10 mM), 1,25 µL de *Forward primer* (10 µM), 1,25 µL de *Reverse primer* (10 µM), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,0 µL do cDNA e 12,2 µL de água *DEPC*. Para cada reação foi realizado controle negativo, o qual continha todos os reagentes, menos o cDNA. A ciclagem utilizada foi constituída de fase inicial a 94°C por 4 min., 30 ciclos a 94°C por 30 s., 60°C por 1 min., 72°C por 1 min. e fase de extensão a 72°C durante 7 min. A visualização da banda que representa a primeira fita de cDNA foi verificada em gel de agarose 1,5% em corrida eletroforética de 100V/80mA por aproximadamente 40 min.

Em seguida, foi realizada a confecção da segunda fita de cDNA somente com as células controle e tratadas com aveloz. À primeira fita de cDNA foram adicionados 30 µL de 5X *Second-Strand Buffer*, 3,0 µL de dNTP Mix (10 mM), 1,0 µL de DNA ligase (10 U/µL), 4,0 µL de Taq DNA polimerase (10 U/µL) (Invitrogen), 1,0 µL de RNase H (2U/µL) e água *DEPC* para completar 150 µL. As amostras foram incubadas a 16°C por 2 horas, adicionados 2,0 µL de T4 DNA polimerase (5U/µL) (Invitrogen) e novamente incubadas a 16°C por 5 min. Após esse período, a ação da enzima foi inibida pela adição de 10 µL de EDTA (0,5 M), seguidos da extração do cDNA com 75 µL de fenol e 75 µL de clorofórmio (1:1) e homogeneização vigorosa. As amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente, 13000 rpm por 5 min. e o sobrenadante (aproximadamente 140 µL) foi transferido para tubos novos, aos quais foram adicionados 70 µL de acetato de amônia - NH₄Oac (7,5 M) e 500 µL de etanol absoluto (100%). A mistura foi incubada a -80°C durante 30 min. e posteriormente centrifugada a 4°C, 13000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se ao DNA precipitado 500 µL etanol 70% gelado, seguindo de centrifugação a 4°C, 13000 rpm por 10 min., repetindo esse processo mais uma vez. O cDNA permaneceu à temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. e o *pellet* foi diluído em 45 µL de água *DEPC*.

Uma reação de PCR foi realizada com gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), utilizando 0,25 µL do cDNA, 2,5 µL de 10X BV

Buffer, 1,5 µL de DMSO, 2,5 µL de dNTP Mix (10 mM), 1,0 µL de *Forward primer GAPDH*, 1,0 µL de *Reverse primer GAPDH*, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 16,0 µL de água *DEPC*. A ciclagem utilizada foi constituída de fase inicial a 95°C por 2 min., 30 ciclos de 95°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 2 min. e fase de extensão a 72°C durante 5 min. Para cada reação foi realizado controle negativo, o qual continha todos os reagentes, menos o cDNA. A visualização da banda que representa a segunda fita de cDNA também foi verificada em gel de agarose 1,5% em corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 min.

Uma alíquota de 3,0 µL do cDNA dupla fita foi separada para checagem da digestão após o tratamento com endonuclease de restrição *Mbo I*.

3.4.4. Digestão enzimática do cDNA pela endonuclease de restrição *Mbo I*

Ao cDNA dupla fita foram adicionados 1,5 µL de água *DEPC*, 2,0 µL da endonuclease de restrição *Mbo I* (10U/µL) (Promega), 5,0 µL de *Restriction Enzyme 10X Buffer*, 0,5 µL de *Acetylated BSA* (10 µg/µL), mantidos a 37°C por 1 hora, com adição de mais 1,0 µL da enzima *Mbo I* e incubação a 37°C *overnight*. Após essa etapa, retirou-se 3,0 µL de cada amostra para confirmação da digestão, comparando-as com 3,0 µL das amostras de cDNA dupla fita antes da digestão. A visualização foi realizada em gel de agarose 1,5% em corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 min.

Em seguida, a purificação do cDNA foi realizada, adicionando o reagente LOTE (tampão de diluição Tris-EDTA) e 100 µL de fenol/clorofórmio (1:1), seguido de centrifugação à temperatura ambiente, 13000 rpm por 5 min. e precipitação do sobrenadante com etanol absoluto (650 µL), acetato de amônia - NH₄Oac 7,5 M (50 µL) e *mussel glycogen* (2,0 µL) a -80°C durante 3 horas. As amostras foram centrifugadas a 4°C, 13000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% gelado, centrifugado a 4°C, 13000 rpm por 10 min. O *pellet* permaneceu à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min. e foi diluído em 20 µL de água *DEPC*.

3.4.5. Ligação dos adaptadores

As sequências adaptadoras XDPN-14 (5' CTGATCACTCGAGA 3') e XDPN-12 (5' GATCTCTCGAGT 3') (JIANG et al., 2000), contendo um sítio de restrição para a enzima *Xho I*, foram adicionadas às amostras digeridas com *Mbo I*, conforme se segue: 4,5 µL de XDPN-12, 4,1 µL de XDPN-14, 8 µL de 5X T4 DNA Ligase (Invitrogen). As reações foram incubadas a 55°C por 1 min. e resfriadas até atingir 14°C. Após resfriamento, foram acrescentados 9U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), incubados a 14°C *overnight* e adicionados 60 µL de LOTE. Para verificar a ligação dos adaptadores e aumentar a quantidade de amostra, foi realizada uma reação de PCR com 2,0 µL do oligonucleotídeo XDPN-18 (5' CTGATCACTCGAGAGATC 3') (JIANG et al., 2000), o qual é complementar às sequências dos adaptadores XDPN-14 e XDPN-12, 2,0 µL da amostra de ligação diluída, 5,0 µL de 10X *Buffer* PCR, 4,0 µL de dNTP mix (10 mM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 35 µL de água *DEPC*. As reações foram submetidas a 72°C por 5 min., 25 ciclos a 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min. e 72°C por 3 min. e visualizadas em gel de agarose 1,5%, em corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 min. Visando obter maior massa, foram realizadas 20 reações de PCR, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, as quais foram unificadas em um mesmo tubo (aproximadamente 1 mL) e checadas em gel de agarose 1,5%, em uma corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 min. Em seguida, cada amostra (controle e aveloz) foi dividida em dois tubos com volume aproximado de 500 µL, submetidas aos procedimentos de purificação, precipitação, com solução fenol/clorofórmio (1:1) e divididas em 4 tubos contendo 250 µL. Aos tubos foram adicionados 900 µL de etanol absoluto 100%, 175 µL de acetato de amônia - NH₄Oac 7,5 M, e 3,0 µL *mussel glycogen*, permanecendo a -80°C por 2 horas e centrifugadas a 4°C, 13000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado, lavado duas vezes com 500 µL etanol 70% gelado e centrifugado a 4°C, 13000 rpm por 10 min. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 15 min. O *pellet* foi diluído em 25 µL de LOTE e o conteúdo de cada tubo unido, resultando em volume de 100 µL para cada amostra.

Após esse procedimento, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) pela determinação da absorbância a 260/280 nm.

3.4.6. Digestão com endonuclease de restrição *Xho I*

A amostra *tester* (10 µg) foi submetida à digestão enzimática com 2,0 µL da endonuclease de restrição *Xho I* (Invitrogen), 5,0 µL de tampão e água *DEPC* para volume final de 50 µL, com incubação a 37°C por 6 horas. Após digestão, foram acrescentados 50 µL de LOTE e os fragmentos foram purificados com solução fenol/clorofórmio (1:1), centrifugados à temperatura ambiente por 5 min., precipitados com 650 µL de etanol absoluto, 50 µL de acetato de amônio NH₄Oac 7,5 M e 4 µL de *Muscel glicogen* a -80°C durante 1 hora e novamente centrifugados a 4°C, 13.200 rpm por 30 min. e lavados três vezes com 500 µL de etanol 70% gelado. Os *pellets* secaram à temperatura ambiente por 15 min. e foram diluídos em 30 µL de LOTE.

3.4.7. Hibridização e construção das bibliotecas subtrativas

A hibridização subtrativa rápida (RaSH) foi realizada com duas subtrações, uma denominada Biblioteca Subtrativa I (Sub A), na qual as células da linhagem Hep-2 controle (sem manipulação) participaram como *tester* e as células da linhagem Hep-2 tratadas com aveloz como *driver*, e outra denominada Biblioteca Subtrativa II (Sub B), em que as células da linhagem Hep-2 controle (sem manipulação) participaram como *driver* e as células da linhagem Hep-2 tratadas com aveloz como *tester*. Dessa maneira, para preparação da “Sub A”, foram utilizados 100 ng do cDNA *tester* (amostra controle), 5 µg de cDNA *driver* (amostra tratada com aveloz) e 16,6 µL de tampão de ligação e para preparação da “Sub B”, 100 ng do cDNA *tester* (amostra tratada com aveloz), 5 µg de cDNA *driver* (amostra controle) e 16,6 µL de tampão de ligação. As amostras foram incubadas a 99,9°C por 5 min., 42°C por 1 hora e 42°C por 48 horas. Ao final, foram acrescentados 80 µL de LOTE em cada mistura de hibridização, purificadas com solução fenol/clorofórmio (1:1), centrifugadas à temperatura ambiente, 13.200 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, purificado com solução

fenol/clorofórmio (1:1), precipitado com etanol 70% e ressuspendido em 20 µL de LOTE.

3.4.8. Ligação ao plasmídeo *pZero*®

As amostras foram submetidas à reação de ligação ao plasmídeo *pZero*®, previamente digerido com endonuclease *Xho I* (Invitrogen). A reação foi composta de 3,0 µL da amostra, 0,5 µL do plasmídeo *pZero*®, 0,5 µL de 10X ligase *Buffer* e 1,0 µL da enzima T4 DNA Ligase (4U) (Invitrogen), submetida a 16°C durante 3 horas. Após período de incubação, foram adicionados 100 µL de LOTE e as amostras purificadas com solução fenol/clorofórmio (1:1), precipitadas com etanol 70% e ressuspendidas em 6µL de LOTE.

3.4.9. Transformação de *E.coli* eletrocompetentes

A reação de ligação ao plasmídeo *pZero*® foi utilizada para transformação de células eletrocompetentes Top-10 (*Escherichia coli*). Para isso, 1,0 µL do produto de ligação foram misturados com 50 µL de bactérias competentes *E.coli* (Top-10). O conteúdo de cada amostra foi transferido para cubeta (*Fischer Biotech - Eletroporation Cubetes, 2 mm Gap, sterile & disposable - CAT. NO.FB102*) e o material submetido à eletroporação a um pulso de 2,5 kV, capacitância de 25 µFD e resistência de 200 OHMS. Imediatamente após o pulso, foram adicionados 500 µL de SOC (meio LB ágar) e o conteúdo transferido para tubos novos, agitado a 37°C, 200 rpm por 1 hora. Após esse período, foi adicionado mais 500 µL de SOC e o material (300 µL) plaqueado em placas de petri grandes identificadas (subtração I [Sub A] e subtração II [Sub B]), contendo 40 mL de meio LB ágar e 20 µL de Zeocin (100 µg/mL), mantidas em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas.

3.4.10. Seleção de clones para sequenciamento

O processo de seleção dos transformantes consistiu em avaliar a presença de colônias brancas, as quais foram selecionadas randomicamente e submetidas à PCR com oligonucleotídeo M13 *forward* (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13 *reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') em uma reação composta de 1,0 µL da

amostra, 1,5 μ L de 10X *Buffer* (Sigma), 1,5 μ L de dNTP (1,25 μ M), 0,63 μ L de M13 *forward*, 0,63 μ L de M13 *reverse*, 0,3 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água *DEPC*, completando 15,0 μ L, sob as seguintes condições: fase inicial a 95°C por 3 min., 35 ciclos a 95°C por 40 s., 60°C por 40 s. e 72°C por 55 s. e fase de extensão a 72°C durante 5 min. A confirmação da presença do inserto nas colônias foi verificada em gel de agarose 1,5%, em corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 min.

As colônias selecionadas foram submetidas a reação para sequenciamento no Sequenciador Automático de DNA, modelo ABI 3700 *PrismABI Analyser* (Applied Biosystems).

3.4.11. Análises das sequências geradas

Após sequenciamento dos clones, as sequências nucleotídicas obtidas, foram submetidas ao programa de alinhamento *blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*: <http://www.ncbi.nih.nlm.gov/blast>). A partir dos resultados do *blast*, apenas com o banco obtido de *RefSeq* (Sequências de Referência) foram selecionadas sequências que no alinhamento apresentaram no mínimo 90% do comprimento da sequência alvo. Devido ao critério de seleção adotado, os genes selecionados do *blast* podem ser considerados homólogos às sequências encontradas nas bibliotecas.

A seleção dos genes para validação por PCR quantitativo em tempo real foi realizada com embasamento no tema do projeto de pesquisa, a partir de estudos das funções e processos que estão envolvidos, de acordo com os termos do *Gene Ontology* (*GO*) e análises realizadas pelo software *Ingenuity Systems*® (*IPA*). Esse por sua vez, possui objetivo de relacionar genes encontrados como diferencialmente expressos com funções biológicas e processos no qual esses genes estão envolvidos e avaliar quais as principais redes de interação entre eles. Esse programa é um banco de dados curado, construído por cientistas altamente qualificados, com base em milhares de artigos científicos, livros e outras bases de dados disponíveis.

Após seleção de cinco genes, os iniciadores foram confeccionados no *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems™) (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e a especificidade verificada no *blat* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). Os genes

escolhidos, após verificação no *blat*, apresentaram complementaridade somente com o gene alvo. Os parâmetros utilizados pelo programa *Primer Express* versão 3.0 para elaboração dos oligonucleotídeos foram: amplificar fragmentos com peso molecular entre 80 e 120 bp, apresentar teor de GC entre 30 e 80%, temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C e não ter complementaridade entre si.

3.5. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Posteriormente às análises por bioinformática dos genes diferencialmente expressos, encontrados pela técnica de RaSH, cinco deles foram escolhidos para validação por RT-qPCR e os iniciadores específicos para cada transcrito (gene) foram desenhados com a ferramenta *Primer3*, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores desenhados com a ferramenta *Primer3* para os genes de interesse.

Oligonucleotídeos	Sequências
ANXA1 Left	5` TAAGGGTGACCGATCTGAGG 3`
ANXA1 Right	5` ACGTCTGTCCCCTTTCTCCT 3`
ITPR1 Left	5` GCTCTATGAGCAGGGGTGAG 3`
ITPR1 Right	5` GGAACACTCGGTCACTGGAT 3`
CD55 Left	5` CAGCACCACCACAAATTGAC 3`
CD55 Right	5` TGCTCTCCAATCATGGTAA 3`
NGFRAP1 Left	5` GGGGGAGCTCTCTAATCACC 3`
NGFRAP1 Right	5` AAAGAAAACAGCGGGAATCA 3`
TCEA1 Left	5` AGCTGAAAGAGATGCGGAAA 3`
TCEA1 Right	5` TGCCACATGTGAACAAGTCA 3`

A eficiência de amplificação para os iniciadores utilizados foi estimada por meio de reações de RT-qPCR, contendo cDNA (correspondente ao grupo controle) submetido a diluições seriadas (1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5). A partir dos Ct (*Cycle threshold*) obtidos, foi possível determinar os valores de eficiência de amplificação, os quais devem ser de 100%. Variações de 10% a mais ou a menos são toleráveis (RASMUSSEN, 2001).

As reações, tanto para o teste de eficiência dos iniciadores, quanto para validação dos genes, foram realizadas em termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™) com o sistema *SYBR Green*, preparadas em triplicatas.

Para validação, foram utilizados como controles endógenos o gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e beta actina (*ACTB*), também preparados em triplicatas, e reações processadas em volumes finais de 20 μ l com 100 a 500 ng de cDNA (controle, com adição de 150 μ L do diluente e tratada com 25 μ g/mL do aveloz), SYBR® Green PCR Master Mix e 100 nM de cada iniciador, segundo protocolo da Applied Biosystems™. As condições de termociclagem compreenderam incubação a 50°C por 2 min., desnaturação inicial a 95°C por 10 min., 40 ciclos a 95°C por 15 s., 60°C por 1 min. para anelamento dos iniciadores e extensão das cadeias e 65°C por 35 s. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 s. a 95°C e 1 min. a 60°C.

A comparação entre a expressão gênica das amostras foi realizada pela comparação entre os Cts (*Cycle threshold*), os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção.

O fator de normalização utilizado foi a média geométrica dos genes constitutivos, utilizados como controles endógenos. Os valores de expressão gênica foram novamente normalizados pelo resultado da quantificação da amostra controle escolhida como calibrador de todas as amostras. Dessa forma, a partir dos valores do Ct de cada amostra, foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o Δ Ct a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle endógeno. Para o cálculo do Δ - Δ Ct, foi escolhida a amostra controle (sem manipulação) como calibrador, atribuído valor de zero como resultado da subtração com seu próprio Δ Ct. Nas demais amostras (com diluente e tratadas com aveloz), o resultado do Δ - Δ Ct foi calculado a partir das diferenças dos valores de Δ Ct de cada um deles em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o $2^{-(\Delta-\Delta Ct)}$, que representa o quanto a transcrição do gene de interesse foi aumentada ou diminuída, após o tratamento com aveloz. Finalmente, para melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em escala logarítmica de base 2 (Log2). Foi considerado aumento ou redução significativa de expressão quando o valor de expressão foi duas vezes maior ou menor, respectivamente, em relação à amostra controle ou quando esteve acima ou abaixo de 1 quando apresentado na forma de Log2 (PFAFFL, 2001).

4. RESULTADOS

4.1. Análise da morfologia celular e índice de proliferação celular

Em relação à morfologia celular (Figura 4), as células Hep-2 são caracterizadas por uma monocamada de células nucleadas, com prolongamentos citoplasmáticos e vários nucléolos, no grupo controle, sem alterações após o tratamento com aveloz e adição de diluente.

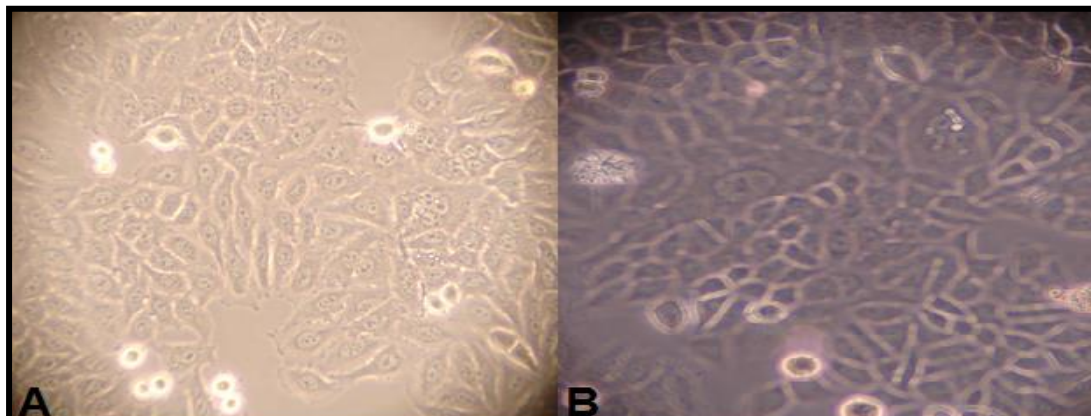


Figura 4: Análise morfológica da linhagem celular Hep-2. A morfologia celular observada no grupo controle (A), caracterizada por uma monocamada de células nucleadas, não foi alterada no grupo tratado com 25 µg/ml do aveloz por 3 dias (B). As células Hep-2 foram semeadas com meio completo MEM 10% na concentração de 5×10^4 por poço (placa de 6 poços). Os ensaios foram realizados em triplicatas para confirmar os resultados.

No experimento do índice de proliferação celular (Figura 5), foi possível observar o efeito inibidor do crescimento pela ação do aveloz. No primeiro dia, ou seja, 24 horas após aplicação do fitoterápico, foi observado crescimento inferior das células tratadas, independente da concentração. Outro relato interessante, é que do quinto para o sétimo dia ocorreu morte celular em todas as condições, provavelmente devido ao pequeno espaço para o crescimento celular e escassez de nutrientes, por isso, o sétimo dia do experimento não foi escolhido para a extração do RNA e continuação dos ensaios de hibridização subtrativa.

As quatro concentrações do fitoterápico testadas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) reduziram o crescimento das células tumorigênicas. A concentração de 0,25 µg/mL diminuiu o crescimento celular em relação ao controle nos três primeiros dias de tratamento, mas nos dias 5 e 7 já não se observou diferença estatisticamente significativa. Na concentração de 2,5 µg/mL, houve diferença estatística significativa em todos os dias do experimento. Na concentração de 25 µg/mL, também houve diminuição do crescimento celular, com diferença estatística significativa em relação ao controle em todos os dias. Enquanto na concentração de 250 µg/mL, não houve

crescimento celular, possivelmente pela alta concentração do fitoterápico.

A análise estatística mostrou que a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ foi a que apresentou maior diferença estatisticamente significativa para ser utilizada nos demais ensaios e o RNA foi extraído no terceiro dia, certificando que o fitoterápico estava interagindo diretamente com as células e que o meio de cultura estava com quantidade suficiente de nutrientes.

Observamos também que a adição do diluente (Figura 6) reduziu a proliferação celular, porém, não foi considerado estatisticamente significativo em relação ao controle, confirmando que a diminuição do crescimento das células Hep2 ocorreu em função do aveloz e não do seu diluente (etanol).

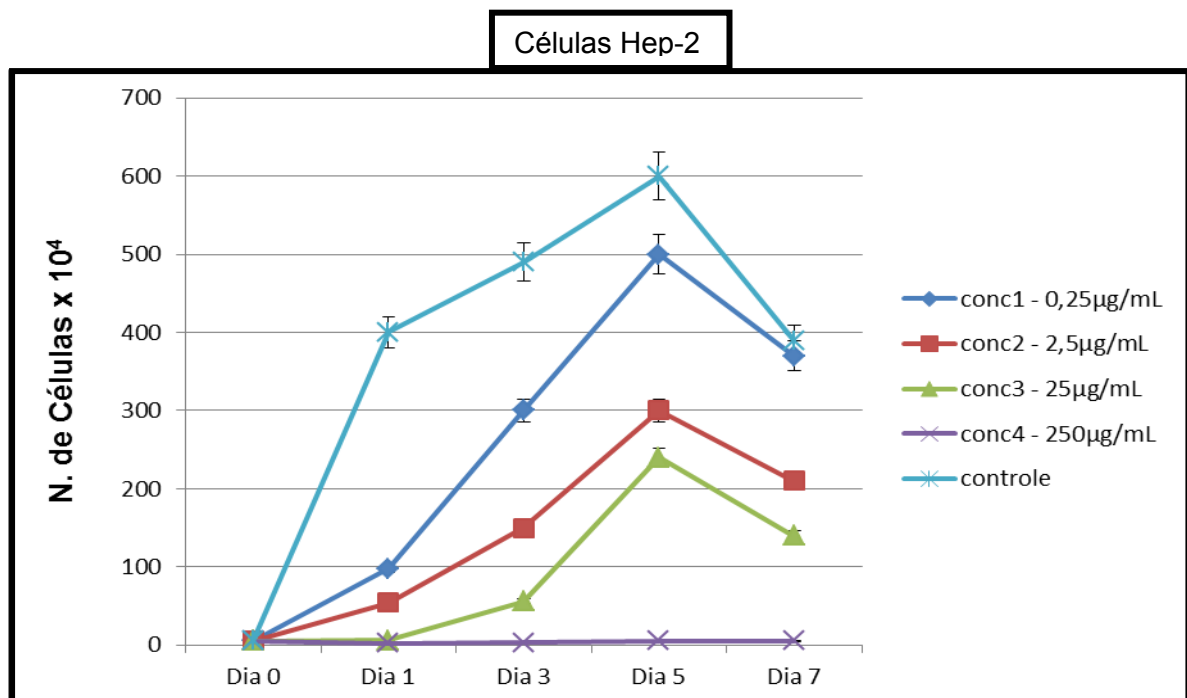


Figura 5: Efeito do tratamento com aveloz na proliferação das células Hep-2. O crescimento das células diminuiu entre os períodos estudados, apresentando diferenças entre os grupos experimentais. As células Hep-2 foram semeadas com meio completo MEM 10% na concentração de 5×10^4 por poço (placa de 6 poços) e tratadas com aveloz [0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$] por 1, 3, 5 e 7 dias. Os ensaios foram realizados em triplicatas para confirmar os resultados. Gráfico com x= tempo (dias) e y= número de células $\times 10^4$. Valores $P < 0,05$ foram significantes.

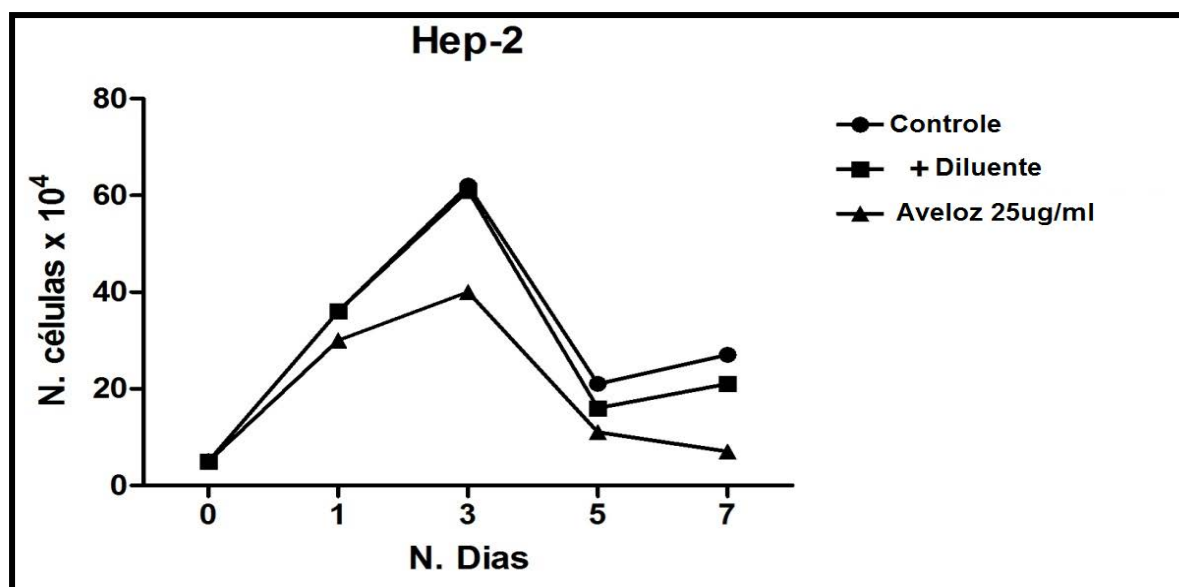


Figura 6: Efeito da adição do diluente e tratamento com aveloz na proliferação das células Hep-2. O crescimento das células diminuiu entre os períodos estudados, apresentando diferenças entre os grupos experimentais. As células Hep-2 foram semeadas com meio completo MEM 10% na concentração de 5×10^4 por poço (placa de 6 poços), tratadas com $150 \mu\text{L}$ do aveloz $25 \mu\text{g/mL}$ e $150 \mu\text{L}$ do diluente por 1, 3, 5 e 7 dias. Os ensaios foram realizados em triplicatas para confirmar os resultados. Gráfico com $x =$ tempo (dias) e $y =$ número de células $\times 10^4$. Valores $P < 0,05$ foram significantes.

4.2. Hibridização subtrativa rápida (RaSH)

4.2.1. Extração de RNA total e análise da integridade

O RNA, obtido da linhagem celular Hep-2, após realização da técnica de extração, foi quantificado em *Nanodrop*[®] (Tabela 3) e analisado sua integridade com visualização das bandas ribossomais 28S (superior) e 18S (inferior) em gel de agarose a 1% (Figura 7).

Tabela 3: Quantificação em *Nanodrop*[®] do RNA total extraído da linhagem celular Hep-2.

Células Hep-2	Quantificação (ng/ μL)
Controle	1029,00
Tratadas com aveloz	376,80
Tratadas com diluente	684,60

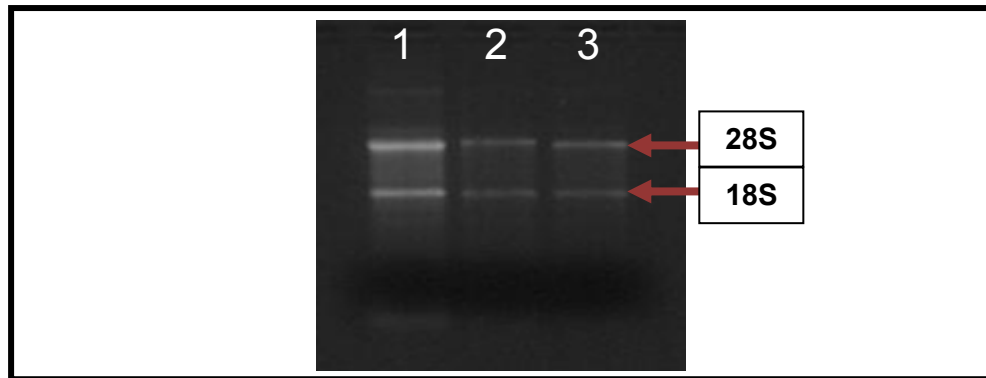


Figura 7: Validação da integridade do mRNA. A integridade do mRNA foi avaliada pela observação das bandas ribossomais 18S e 28S corridas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. As células Hep-2 foram cultivadas em três garrafas de cultura com 75 cm² na concentração de 1x10⁶ células/ml, durante três dias (72 horas) e realizada extração do mRNA das três condições experimentais: controle (1), tratadas com 150µL do aveloz [25 µg/mL] por 3 dias (2) e 150µL do diluente (3).

4.2.2. Síntese de cDNA dupla fita

Posteriormente a extração do RNA e análise da integridade do mesmo, foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA. Dois protocolos foram utilizados, com 10 µg do RNA total, para utilização na tecnologia de RaSH (Figura 8) e com 5 µg de RNA total, para validação dos genes por PCR quantitativo em tempo real (Figura 9). A comprovação da síntese da primeira fita do cDNA foi pela amplificação por PCR, utilizando gene constitutivo *β-actina* (ACTB).

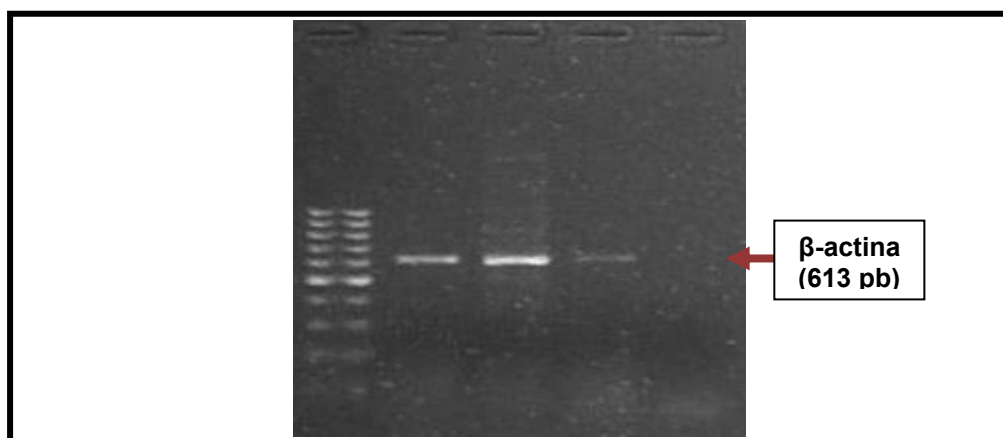


Figura 8: Validação da integridade da primeira fita de cDNA utilizando 10 µg do RNA. A integridade da primeira fita do cDNA foi observada pela reação de PCR do gene constitutivo *β-actina* - ACTB (banda de 613 pares de base) em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Após realização da extração do mRNA total das células Hep-2, foi realizada síntese da primeira fita de cDNA utilizando 10 µg do RNA das três condições experimentais: controle (1), tratadas com 150µL de aveloz [25 µg/mL] por 3 dias (2) e 150µL do diluente (3). Controle negativo (4) e marcador molecular de 100 pb (M).

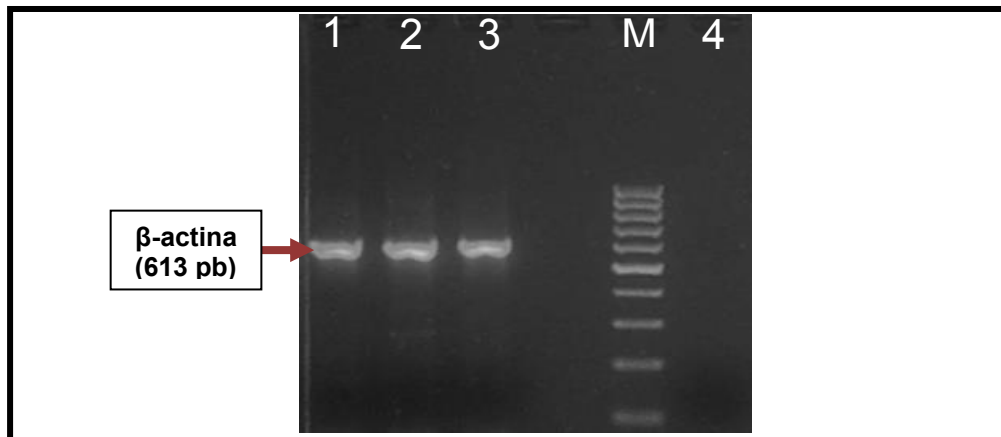


Figura 9: Validação da integridade da primeira fita de cDNA utilizando 5 µg do RNA. A integridade da primeira fita do cDNA foi observada pela reação de PCR do gene constitutivo *β-actina* - ACTB (banda de 613 pares de base) em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Após realização da extração do mRNA total das células Hep-2, foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA utilizando 5 µg do RNA das três condições experimentais: controle (1), tratadas com 150µL de aveloz [25 µg/mL] por 3 dias (2) e 150µL do diluente (3). Controle negativo (4) e marcador molecular de 100 pb (M).

A partir da primeira fita do cDNA foi sintetizada a segunda fita, com as amostras controle (sem manipulação) e tratadas com aveloz (25 µg/mL). A comprovação da segunda fita de cDNA foi realizada pela amplificação por PCR, utilizando gene constitutivo *GAPDH* (Figura 10).

As fitas de cDNA foram confirmadas pela corrida eletroforética de 80V/80mA por aproximadamente 40 min. em gel de agarose 1,5%.

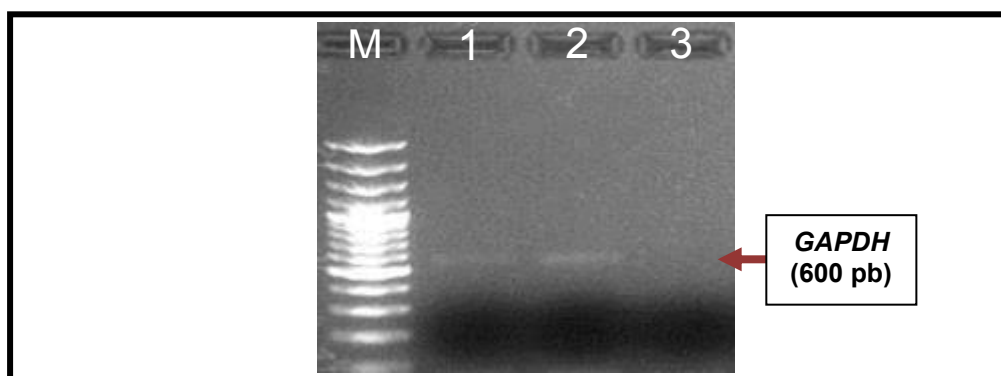


Figura 10: Validação da integridade da segunda fita de cDNA. A integridade da segunda fita do cDNA foi observada pela reação de PCR do gene constitutivo *GAPDH* (banda de 600 pares de base) em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Após a síntese da primeira fita de cDNA das células Hep-2, foi realizada a confecção da segunda fita, das seguintes condições experimentais: controle (1), tratadas com 25 µg/mL do aveloz por 3 dias (2). Controle negativo (4) e marcador molecular de 100 pb (M).

4.2.3. Digestão enzimática do cDNA pela endonuclease de restrição *Mbo I*

Após a síntese do cDNA fita dupla, esses foram submetidos a digestão enzimática com endonuclease de restrição *Mbo I*. Observou-se a presença de um arraste como demonstrado no gel de agarose 1,5% (Figura 11).

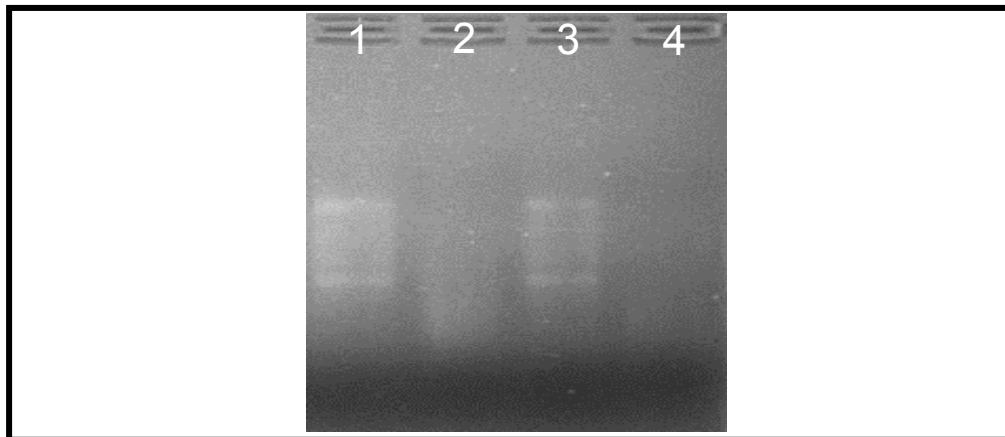


Figura 11: Digestão enzimática do cDNA com *Mbo I*. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando um arraste correspondente aos fragmentos gerados após digestão com endonuclease de restrição *Mbo I*. 1: Células Hep-2 controle (antes da digestão); 2: Células Hep-2 controle (depois da digestão); 3: Células Hep-2 tratadas com 25 µg/mL do aveloz por 3 dias (antes da digestão); 4: Células Hep-2 tratadas com 25 µg/mL do aveloz por 3 dias (depois da digestão).

4.2.4. Ligação dos adaptadores

Logo após a digestão do cDNA com *Mbo I* das células Hep-2 controle e tratadas com 25 µg/mL do aveloz, sequências adaptadoras XDPN-14 [5' CTGATCACTCGAGA 3'] e XDPN-12 [5' GATCTCTCGAGT 3'] (JIANG et al., 2000), contendo um sítio de restrição para a enzima *Xho I*, foram adicionadas às amostras digeridas, com intuito de inserir na amostra *tester* um sítio de corte para outra enzima utilizada posteriormente.

A ligação foi confirmada pela amplificação por PCR com oligonucleotídeo específico XDPN-18 (5' CTGATCACTCGAGAGATC 3') (JIANG et al., 2000), o qual apresenta complementaridade com os adaptadores XDPN-14 e XDPN-12. Foi observada uma intensificação das bandas correspondentes aos fragmentos gerados (Figura 12).

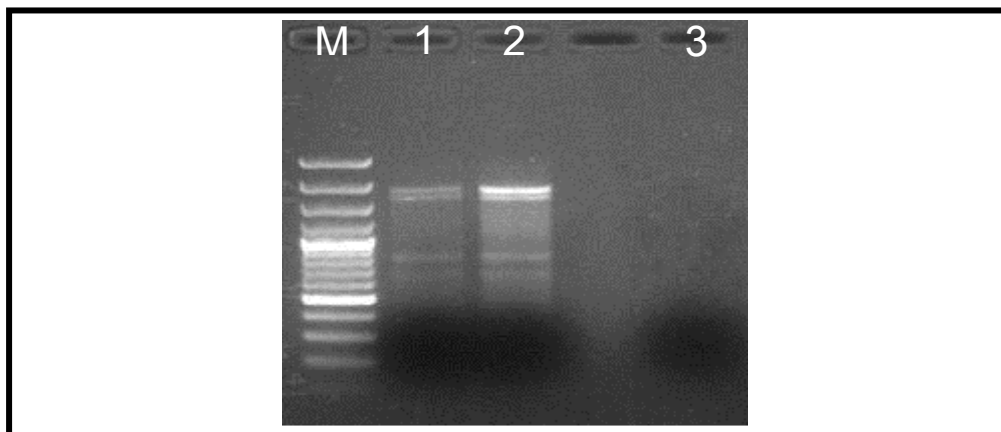


Figura 12: Ligação dos adaptadores XDPN-14 e XDPN- 12 ao cDNA digerido com *Mbo I*. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando bandas referentes às amostras de cDNA fragmentados, ligados aos adaptadores XDPN-12 e XDPN- 14 e amplificados. M: marcador molecular ϕ X174; 1: Células Hep-2 controle; 2: Células Hep-2 tratadas com 25 μ g/mL do aveloz por 3 dias; 3: Branco.

Após a obtenção de maior massa do produto, realizada com 20 reações de PCR (oligonucleotídeo XDPN-18), essas foram misturadas e quantificadas em *Nanodrop*®, obtendo os seguintes resultados:

Tabela 4: Quantificação em *Nanodrop*® dos fragmentos amplificados.

Amostras	Quantificação ng/ μ L
Controle	101,9
Aveloz	175,0

4.2.5. Hibridização e construção das bibliotecas subtrativas

Em função da importância no entendimento do efeito do aveloz na expressão gênica, utilizamos a técnica de hibridização subtrativa rápida (RaSH), para identificarmos genes diferencialmente expressos em amostras de células Hep-2 controle (sem manipulação) e tratadas com aveloz. Para isso, foram utilizados 5 μ g de amostra *driver*, para 100 ng de *tester*. Assim, cada molécula *tester* teve 50 vezes mais chances de hibridizar com moléculas *driver* do que com outras *tester*. Isso foi realizado para diminuir a geração de falso-positivos e obter genes que estivessem presentes exclusivamente na amostra *tester*.

A mistura de hibridização foi ligada ao plasmídeo *pZero*® também digerido com enzima *Xho I*, os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* (Top 10) e para verificar se as colônias selecionadas

continham o inserto, foi realizada reação de PCR, utilizando o oligonucleotídeo M13 *Foward e Reverse*.

A metodologia de RaSH formou 85 sequências gênicas, que após rigorosas seleções e classificações resultaram em 19 genes indicados como diferencialmente expressos, sendo 15 na Sub A (*tester*= Hep-2 controle X *driver*= Hep-2 tratada com aveloz) e 4 na Sub B (*tester*= Hep-2 tratada com aveloz X *driver*= Hep-2 controle), com diferentes funções e processos, descritos nos bancos de dados do *Gene Ontology (GO)*, como mostrado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Genes selecionados por RaSH, na biblioteca subtrativa I (Sub A), expressos na linhagem celular Hep-2 controle.

NM	Nome	Sigla	Localização cromossômica	Funções e processos
NM_006930.3	Homo sapiens S-phase kinase-associated protein 1	SKP1	5q31	Ligante de proteína; participa da regulação do ciclo celular mitótico.
NM_001099952.2	Homo sapiens inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1	ITPR1	3p26.1	Ligante de proteína; regula o transporte e a liberação do íon cálcio; participa da via de sinalização intrínseca do processo de apoptose e da transdução de sinal.
NM_006420.2	Homo sapiens ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)	ARFGEF2	20q13.13	Ligante de proteína, regulando seu transporte; regula a produção do fator de necrose tumoral; está envolvido na transdução de sinal intracelular.
NM_000574.3	Homo sapiens CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	CD55	1q32	Atividade inibitória de enzimas; regulação da concentração citosólica do íon cálcio, da resposta imune inata e da ativação do sistema complemento.
NM_002093.3	Homo sapiens glycogen synthase kinase 3 beta	GSK3B	3q13.3	Ligante de proteína, do fator de transcrição da RNA polimerase II; participa da migração celular e da transdução de sinal intracelular, da regulação do processo apoptótico e estabelece a polaridade celular.
NM_206917.1	Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFRSF1) associated protein	NGFRAP1	Xq22.2	Ligante de proteína; participa da indução do processo apoptótico.

1				
NM_018321.3	Homo sapiens BRX1, biogenesis of ribosomes, homolog (S. cerevisiae)	BRX1	5p13.2	Regula a biogênese do ribossomo e possui função molecular.
NM_006756.2	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII), 1	TCEA1	8q11.2	Ligante de DNA e de proteína; participa do reparo do DNA; regula a transcrição a partir do promotor de RNA polimerase II e a expressão gênica.
NM_006918.4	Homo sapiens sterol-C5- desaturase	SC5D	11q23.3	Ligante de íon ferro; participa do metabolismo lipídico e do processo de biossíntese do colesterol.
NM_004708.3	Homo sapiens programmed cell death 5	PDCD5	19q13.11	Ligante de DNA e participa da indução do processo apoptótico.
NM_001130440.1	Homo sapiens SRP9 signal recognition particle 9kDa	SRP9	1q42.12	Ligante de RNA; participa do processo de tradução e expressão gênica.
NM_006055.2	Homo sapiens LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	LANCL1	2q33-q35	Ligante de íon zinco; regula a atividade catalítica.
NM_000700.1	Homo sapiens annexin A1	ANXA1	9q21.13	Ligante de proteína e de íon cálcio; regula o ciclo celular, a proliferação celular; está envolvido na resposta inflamatória, na liberação de neutrófilos; é receptor de via de sinalização da superfície celular e regula negativamente o processo apoptótico.
NM_000661.4	Homo sapiens ribosomal protein L9	RPL9	4p13	Ligante de RNA; faz parte do componente estrutural do ribossoma; participa do processo metabólico do RNA e do processo celular metabólico de proteínas; regula a tradução e a expressão gênica.
NM_139207.2	Homo sapiens nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	12q21.2	Ligante de proteína; participa da replicação do DNA, da montagem do nucleossoma e regula positivamente a proliferação celular.

Tabela 6: Genes selecionados por RaSH, na biblioteca subtrativa II (Sub B), expressos na linhagem celular Hep-2, com expressão diferencial após o tratamento com aveloz.

NM	Nome	Sigla	Localização cromossômica	Funções e processos
NM_001001484.2	Homo sapiens phosphotriesterase related	PTER	10p12	Participa do processo catalítico e é ligante de íon zinco.
NM_001717.3	Homo sapiens basonuclin 1	BNC1	15q25.2	Ligante de DNA e de íon zinco; participa da regulação da transcrição e da proliferação celular; está envolvido com a organização cromossômica e na cicatrização de feridas.
NM_001142935.1	Homo sapiens MAX dimerization protein 3	MXD3	5q35.3	Ligante de DNA; participa da regulação negativa da transcrição dependente de DNA.
NM_001207008.1	Homo sapiens myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	MLLT4	6q27	Atua na adesão celular, montagem de junção celular e sinalização célula-célula e regula a transdução de sinal.

Os genes selecionados pela técnica de RaSH também foram analisados pelo *software Ingenuity Systems*® (IPA), o qual relacionou várias funções e permitiu a interação dos genes com diferentes redes funcionais, mostrando como eles interagem uns com os outros e com genes importantes nos processos tumorigênicos e inflamatórios. Em relação à biblioteca subtrativa I (Sub A), os genes apresentaram funções relacionadas com câncer, tumor de células epidermóides, neoplasia benigna, apoptose, proliferação, agregação, morfologia, viabilidade, desenvolvimento e sinalização celular, controle do ciclo celular, fusão da membrana celular, clivagem do fragmento de RNA, transporte de proteínas, angiogênese, ativação do sistema complemento, resposta imune inata, liberação e ativação do íon cálcio, resposta inflamatória, resposta antimicrobiana, distúrbios hereditários, hipoplasia do órgão, câncer oral e processo de câncer de laringe, formando duas redes de interações importantes (Figuras 13 e 14). Em relação à biblioteca subtrativa II (Sub B), os genes formaram redes funcionais associadas principalmente ao câncer, controle do ciclo celular, proliferação, morfologia e desenvolvimento celular, reparo, replicação e recombinação do DNA, expressão gênica, formação de tumor secundário e organização dos cromossomos (Figura 15).

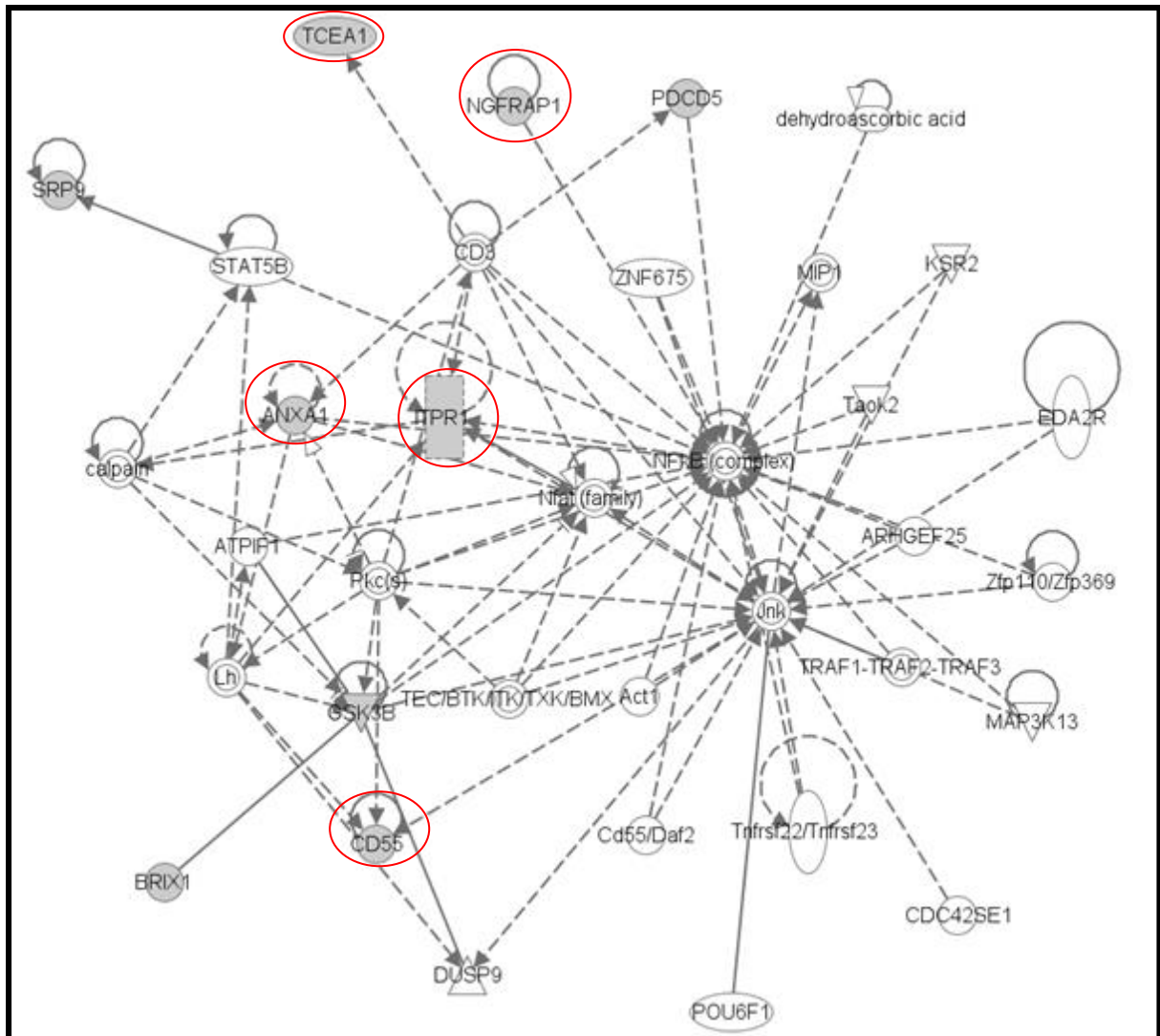


Figura 13: Rede de interação gênica da via do *NFKB* obtida na subtração das células Hep-2 controle (Sub A). O software *Ingenuity Systems*® (*IPA*) revela uma rede de interações gênicas relacionados com a via do *NFKB* e com câncer, tumor de células epidermóides, neoplasia benigna, apoptose, proliferação, agregação, morfologia, viabilidade, desenvolvimento e sinalização celular, controle do ciclo celular, fusão da membrana celular, clivagem do fragmento de RNA, transporte de proteínas, angiogênese, ativação do sistema complemento, resposta imune inata, liberação e ativação do íon cálcio, resposta inflamatória, resposta antimicrobiana, distúrbios hereditários, hipoplasia do órgão, câncer oral e processo de câncer de laringe. Em vermelho, destacam-se os cinco genes selecionados para validação por PCR quantitativo em tempo real.

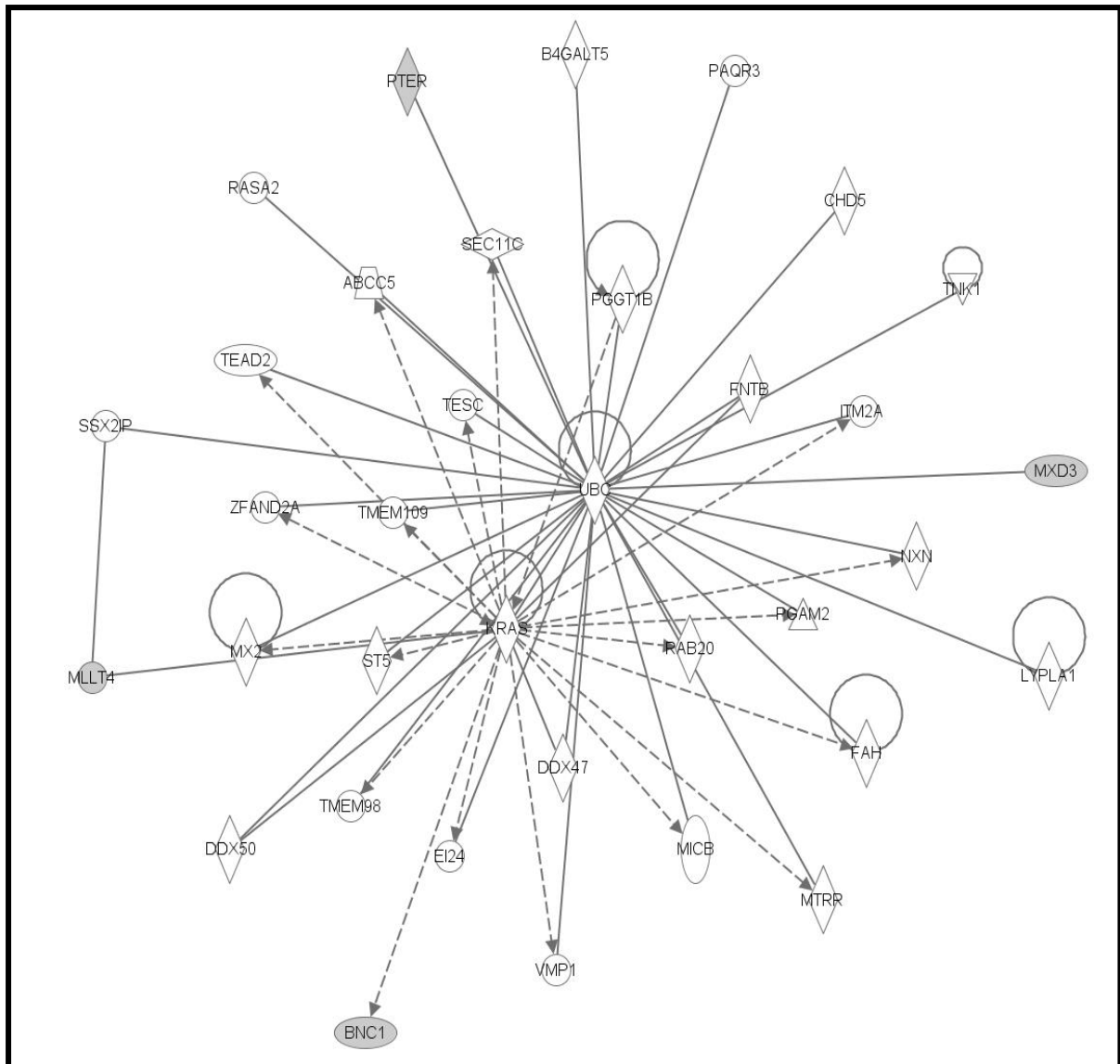


Figura 15: Rede de interação dos genes obtidos na subtração das células Hep-2 tratadas com aveloz (Sub B). O software Ingenuity Systems® (IPA) revela uma rede de interações gênicas relacionados com câncer, controle do ciclo celular, proliferação, morfologia e desenvolvimento celular, reparo, replicação e recombinação do DNA, expressão gênica, formação de tumor secundário e organização dos cromossomos.

Após essas análises, foram escolhidos cinco genes (*ITPR1*, *ANXA1*, *TCEA1*, *CD55* e *NGFRAP1*) para validação por PCR quantitativo em tempo real, pois fazem parte da mesma rede de interação e estão relacionados com funções importantes do ponto de vista do projeto, como demonstrado no *Gene Ontology (GO)* e *Ingenuity Systems® (IPA)*. Entre as principais funções do gene *ITPR1*, destacam-se as relacionadas com proliferação e apoptose celular, ativação e liberação do íon cálcio, do gene *ANXA1*, controle do ciclo celular, proliferação, crescimento e apoptose celular, resposta inflamatória, liberação do íon cálcio, processos de neoplasia benigna, câncer oral e câncer de laringe, do *TCEA1*, regulação da transcrição a partir do promotor de RNA polimerase II, reparação do DNA e regulação da

expressão gênica, do *CD55*, apoptose, sinalização, proliferação e crescimento celular, resposta inflamatória, distúrbios hereditários, elevação da concentração citosólica do íon cálcio, resposta imune inata e regulação do sistema complemento e do gene *NGFRAP1*, processos de apoptose celular e ligante de proteína.

4.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Os genes selecionados para validação (*ITPR1*, *ANXA1*, *TCEA1*, *CD55* e *NGFRAP1*), tiveram seus iniciadores desenhados pelo programa *Primer3*, os quais foram submetidos à análise da eficiência, calculada pela “curva de eficiência dos primers”. Os resultados para esse experimento foram satisfatórios, com eficiência variando de 97,3 a 99,8% (Figura 16), por isso foi utilizado o cálculo do $\Delta\text{-}\Delta\text{Ct}$, segundo Pfaffl (2001).

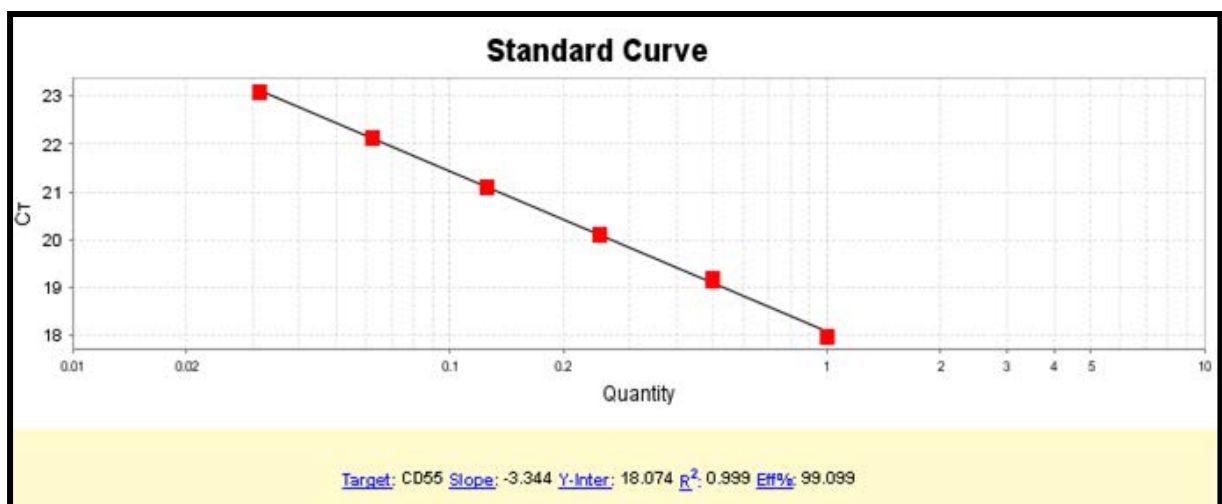


Figura 16: Curva de eficiência ideal para o iniciador *CD55*. A reta média traçada a partir da média de Cts de cada diluição do cDNA deve apresentar R^2 mais próximo de 1,00, indicando 100% de eficiência.

Entre os genes utilizados como controle endógeno (*GAPDH* e *ACTB*), o *GAPDH* apresentou-se como melhor candidato a normalizador. Os resultados obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção.

Os resultados obtidos de acordo com a técnica de PCR quantitativo em tempo real demonstraram que as células Hep-2 que receberam o diluente apresentaram resultados similares aos da amostra controle, que foram utilizadas como calibrador

na comparação com as células tratadas com o aveloz. Dessa maneira utilizamos os Cts da amostra controle para os cálculos da análise da expressão gênica e observamos que o gene *ITPR1* apresentou redução significativa da expressão, os genes *ANXA1* e *CD55* apresentaram aumento da expressão e os genes *TCEA1* e *NGFRAP1* não tiveram resultados significantes, já que para isso, deveriam apresentar valores ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 na base de log 2 (Figura 17). Esses resultados se confirmaram mesmo após repetição.

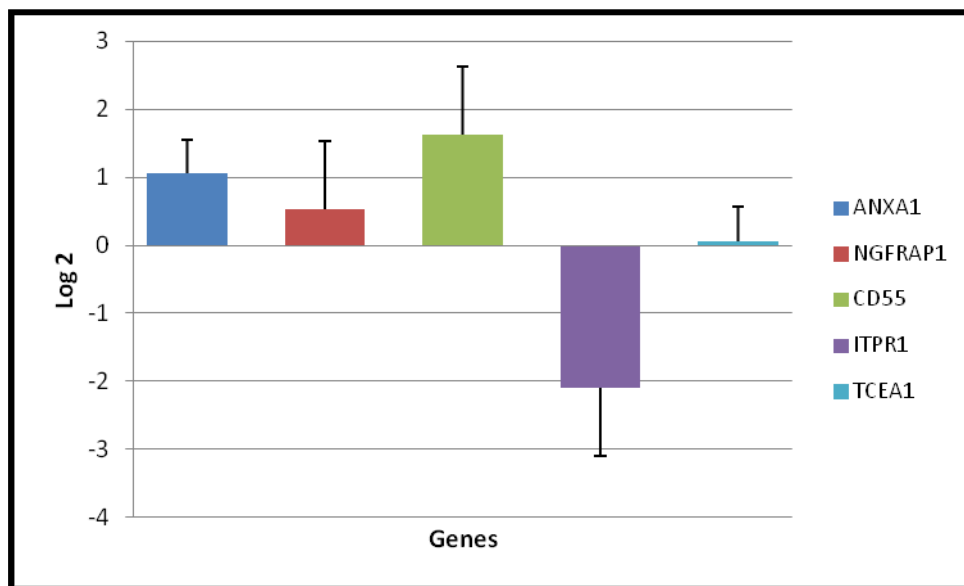


Figura 17: Expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real. Redução da expressão de *ITPR1* nas células Hep-2 tratadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ do aveloz, comparadas com células controle. Os dados representam logaritmo de base 2. Foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

A molécula presente no látex da *Euphorbia tirucalli* (aveloz), batizada como extrato AM10, foi utilizada em nossos experimentos, pois age inibindo enzimas relacionadas à multiplicação dos tumores, além de apresentar potencial anti-inflamatório e analgésico (PIANOWSKI, 2010).

Devido à importância da ação antitumorigênica do aveloz, analisamos o efeito desse fitoterápico na linhagem celular de carcinoma epidermóide de laringe (Hep-2). Para isso, as células foram cultivadas e tratadas com o extrato AM10 do aveloz. Dessa maneira, observamos que após o tratamento, a morfologia das células não foi modificada, no entanto a proliferação celular diminuiu significativamente. Os dados de Aquino e colaboradores (2008) corroboram com esses resultados, pois eles também observaram que o tratamento com aveloz em linhagem celular de câncer de mama, não alterou a morfologia dessas células, independente do diluente utilizado.

Em relação à proliferação reduzida, o látex do aveloz deve agir nas células tumorigênicas causando morte celular, fazendo com que o crescimento dessas células diminua. *In vitro*, sabe-se que o látex funciona no combate as colônias de células do câncer de mama, melanoma e gástrico (AMIRGHOFRAN et al., 2006, KUO et al., 2006; LIN et al., 2012). Caseiro e colaboradores (2006) estudando a atividade antitumoral do látex do aveloz em câncer de mama, utilizou o fitoterápico nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/Kg e, além disso, um grupo de camundongos recebeu associação do látex com um medicamento quimioterápico. Os resultados estão de acordo com nosso trabalho, mostrando que ocorreu diminuição da proliferação das células cancerígenas e o grupo tratado com associação do quimioterápico e aveloz obteve diminuição dos efeitos colaterais induzidos pelo quimioterápico.

Os avanços na compreensão da biologia molecular do câncer de laringe têm aberto novas direções na ciência. O aumento das pesquisas está sendo direcionado para o desenvolvimento de terapias com alvos em marcadores moleculares úteis na predição dos tratamentos e seleção de terapias específicas baseadas nas características dos tumores (ANG et al., 2002).

No nosso trabalho, com objetivo de investigar o efeito do aveloz na expressão gênica, utilizamos a técnica de Hibridização Subtrativa Rápida (RaSH), que isola genes diferencialmente expressos, incluindo novos genes e transcritos raros, como é possível observar em alguns artigos do nosso grupo (RODRIGUES-LISONI et al., 2006; RODRIGUES-LISONI et al., 2010) e de outros que também utilizam essa

tecnologia (CALMON et al., 2009; MEOLA et al., 2010). É possível gerar bibliotecas genômicas expressivas, auxiliando na busca de genes diferencialmente expressos em linhagens celulares tratadas ou não com o fitoterápico, de maneira mais rápida e menos onerosa do que às demais técnicas de hibridização (JIANG et al., 2000).

As bibliotecas subtrativas geraram 85 sequências gênicas, as quais, após rigorosas seleções e classificações resultaram em 19 genes indicados como diferencialmente expressos. Os resultados mostraram pela primeira vez na literatura, que nas células de carcinoma epidermóide de laringe, a expressão gênica foi alterada após tratamento com aveloz.

Na modificação da expressão gênica, o aveloz foi utilizado em células de câncer gástrico, demonstrando aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAX), promovendo a morte celular, inibindo, dessa maneira, o crescimento das células do câncer gástrico e o desenvolvimento do tumor (LIN et al., 2012). Em outro estudo, a aplicação do euphol (álcool triterpeno tetracíclico isolado do látex da *E. tirucalli*) foi investigada na inflamação de pele induzida por 12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetato (TPA) em ratos, e verificou-se redução da expressão de uma quimiocina (CXCL1/KC) e proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP)-2, desencadeando uma série de reações, as quais levaram a inibição acentuada da resposta inflamatória induzida por TPA (PASSOS et al., 2013).

Os genes escolhidos para a validação por PCR quantitativo em tempo real foram *ITPR1*, *ANXA1*, *TCEA1*, *CD55* e *NGFRAP1*, por possuírem funções importantes relacionadas com processos tumorigênicos e inflamatórios, como transporte do íon cálcio, resposta inflamatória, regulação da transcrição, regulação do sistema complemento e processo apoptótico, respectivamente. Esses genes foram escolhidos da biblioteca subtrativa I (Sub A), pois estavam na mesma rede de sinalização gênica relacionada pelo *software Ingenuity Systems*® (*IPA*), o que foi importante para correlacionar com a via de processos tumorigênicos e inflamatórios. Não foram escolhidos genes pertencentes à biblioteca subtrativa II (Sub B), pois não apresentaram qualidade eficiente das sequências.

Liang e colaboradores (2013) utilizaram o *software IngenuityPathway* (*IPA*) para identificar as atividades biológicas dos genes que distinguem as ervas medicinais chinesas entre suas propriedades térmicas, quentes (efeitos amornantes, dispersa o frio) ou frias (efeito refrescante, remove o calor). Demonstraram que as principais redes biológicas gênicas das ervas com propriedades quentes incluem a

inflamação e a regulação da imunidade, e os genes das ervas com propriedades frias afetam o crescimento, proliferação e desenvolvimento celular.

O tratamento com o aveloz diminuiu significativamente a expressão do gene *ITPR1*, validado por PCR quantitativo em tempo real e aumentou a expressão dos outros genes, sendo que dois deles (*ANXA1* e *CD55*) apresentaram aumento significativo da expressão. Isso pode ter acontecido por que o aveloz possui propriedades anticancerígenas, dessa maneira, após o tratamento, as células podem ter liberado fatores para controlar a proliferação e crescimento do tumor, por isso, ocorreu aumento da expressão de genes relacionados com processos anti-inflamatórios como *ANXA1* e genes que participam na regulação do sistema complemento como *CD55*.

Nos experimentos realizados com RaSH, os genes mostraram expressão diferencial nas células Hep-2 de maneira dependente do tratamento com aveloz, observando que o gene *ITPR1* pode ser considerado bom marcador molecular para o carcinoma epidermóide de laringe e *ANXA1*, *CD55*, *TCEA1* e *NGFRAP1* ainda exigem novos ensaios.

A seleção do gene validado *ITPR1* (gene para o receptor inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1) pode contribuir de forma significativa para o entendimento dos processos tumorigênicos, inclusive o câncer de laringe, já que apresenta funções relacionadas com a tumorigênese de células epidermóides, proliferação e apoptose celular, ativação e liberação do íon cálcio (WOJCIKIEWICZ; TOBIN; NAHORSKI, 1994; SOGHOIAN et al., 2005; LENCESOVA et al., 2013).

Esse gene, localizado na região cromossômica 3p26.1, foi inicialmente clonado e sequenciado a partir do cérebro de roedores (MIGNERY et al., 1990), verificando que ele codifica uma proteína de 2749 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 313 kDa que possui um local de ligação para o IP3Rs perto de sua região amino terminal (WOJCIKIEWICZ; TOBIN; NAHORSKI, 1994). O receptor IP3R, possui várias isoformas e por estimulação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) media a liberação de cálcio a partir do retículo endoplasmático e vesículas secretoras (FOSKETT et al., 2007).

Como moduladores principais da concentração de cálcio, os receptores IP3Rs têm sido intensamente estudados em uma variedade de processos celulares controlados pelo cálcio, incluindo, a proliferação e apoptose celular, importantes para o desenvolvimento do tumor, bem como o metabolismo, secreção e contração

do músculo liso, sinais neurais e fertilização (BERRIDGE, 1993; DEMAUREX; DISTELHORST, 2003; VANDERHEYDEN et al., 2009).

Em nosso trabalho, observamos expressão reduzida do gene *ITPR1* nas células Hep-2 após o tratamento com aveloz. Um estudo realizado por Khan e colaboradores (2006) corrobora com esses resultados, mostrando que a baixa expressão dos receptores IP3Rs em células cancerígenas pode fornecer um mecanismo para restringir a ação da enzima quinase Akt, ativando a apoptose e diminuindo o crescimento das células do câncer, já que os receptores de IP3Rs são substratos para a ação dessa enzima, a qual, tem papel fundamental de suprimir a apoptose.

Por outro lado, alguns trabalhos encontraram superexpressão de IP3R1, a qual induziu o aumento do nível de cálcio citosólico, ativando a apoptose celular (SZALAI; KRISHNAMURTHY; HAJNÓCZKY, 1999).

A expressão de IP3R1 também foi avaliada em linhagens celulares de câncer de bexiga resistentes à cisplatina e em células parentais sensíveis à cisplatina. Foi verificada expressão reduzida de IP3R1 em células resistentes à cisplatina. A supressão da expressão de IP3R1 nas células parentais, usando pequenos RNAs de interferência, impediu a apoptose e resultou em diminuição da sensibilidade à cisplatina. Ao contrário, a superexpressão de IP3R1 em células resistentes induziu a apoptose e aumentou a sensibilidade à cisplatina. Esses resultados sugerem que a baixa regulação da expressão de IP3R1 é relacionada com resistência à cisplatina em células de câncer de bexiga e sugerem que o IP3R1 mediado pela sinalização de cálcio é importante no processo de apoptose induzida por cisplatina. Isso demonstra a possibilidade do uso de IP3R1 como marcador molecular para prever a sensibilidade à cisplatina e alvo molecular terapêutico para o câncer de bexiga (TSUNODA et al., 2005).

Além disso, alguns trabalhos mostram que a indução do receptor IP3R1, pode desempenhar papel relevante na transdução de sinal de radiação, sendo, portanto, importante para o tratamento do câncer por irradiação (YAN; KHANNA; LAVIN, 1996).

Portanto, de acordo com nossos ensaios podemos inferir que o aveloz diminui a expressão de *ITPR1* restringindo a ação da enzima quinase Akt, ativando a apoptose e diminuindo o crescimento das células de carcinoma epidermóide de laringe.

Outro gene estudado, *ANXA1* (Anexina A1), porém com expressão aumentada nas células Hep-2 tratadas com aveloz em relação às células controle, foi escolhido por possuir funções importantes para o processo carcinogênico, tais como, controle do ciclo celular, regulação do processo apoptótico, proliferação e crescimento celular, resposta inflamatória e liberação do íon cálcio (CROXTALL; FLOWER; PERRETTI, 1993; OLIANI et al., 2001; D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008).

Esse gene está localizado no cromossomo 9, em 9q21.13, apresenta 13 éxons e codifica uma proteína de aproximadamente 37kDa, a *ANXA1*, que foi originalmente descrita como lipocortina 1, a qual foi o primeiro membro dessa família que teve seu gene clonado e é considerada o seu protótipo (WALLNER et al., 1986).

Modificações pós-traducionais foram descritas, e podem ser consideradas importantes consequências intracelulares, alterando as propriedades da *ANXA1*. Uma das modificações é a clivagem do domínio N-terminal da proteína, a qual pode ser considerada um evento regulatório para sua ação, formando uma molécula truncada com alteração da sensibilidade ao cálcio (GERKE; MOSS, 2002).

Ações anti-inflamatórias e antiproliferativas têm sido mostradas em estudos *in vivo* e *in vitro*, após administração da *ANXA1* exógena ou seu peptídeo mimético da porção N-terminal (Ac2-26) (DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012).

Uma nova descoberta relacionada com a sinalização da *ANXA1* é que essa proteína pode ser associada diretamente com a subunidade p65 do fator de transcrição de ubiquitina NF- κ B, uma chave regulatória da proliferação celular e da expressão dos genes de inflamação (ZHANG et al., 2010). Esse fato destaca caminhos alternativos pelos quais a *ANXA1* pode modular localmente os processos inflamatórios e tumorigênicos (HUTCHINSON et al., 2011).

Alterações da expressão da *ANXA1* têm sido relatadas em vários tipos de câncer e, além disso, sua expressão vem sendo comparada com a de outras proteínas. Nesse contexto, Jorge e colaboradores (2013) investigaram a relação entre a expressão gênica e proteica de Anexina A1 (*ANXA1/AnxA1*) e Galectina-1 (*LGALS1/Gal-1*) em gastrite crônica e adenocarcinoma gástrico. Níveis elevados da expressão da *ANXA1* foram observados em 90% dos casos de gastrite crônica e 80% dos casos de adenocarcinoma gástrico. Os níveis da *LGALS1* foram elevados em 60% dos casos adenocarcinoma gástrico, enquanto que a baixa expressão foi encontrada em gastrite crônica. Esses resultados forneceram evidências de que a

galectina-1 e, principalmente, anexina A1 são superexpressas na gastrite e em câncer gástrico, sugerindo forte associação dessas proteínas com inflamação gástrica crônica e carcinogênese.

A superexpressão da proteína ANXA1 foi detectada em carcinoma de células epidérmoides de pênis, relacionados com infecção pelo HPV. A expressão da ANXA1 mostrou-se significativamente aumentada nessas análises, independentemente do subtipo de carcinoma, quando comparado com amostras HPV negativo, isso explica a importância do papel da ANXA1 na regulação da invasão, migração, diferenciação e proliferação celular (CALMON et al., 2013).

Os padrões subcelulares da expressão de ANXA1 foram investigados em amostras neoplásicas e não neoplásicas de pacientes com carcinoma epidérmide de laringe, para elucidar o papel da ANXA1 nesse tipo de carcinogênese. Dessa vez, os resultados mostraram baixa expressão de ANXA1 em lesões displásicas, tumorais e metastáticas e forneceu evidências para migração progressiva da ANXA1 do núcleo para a membrana durante a tumorigênese de laringe (ALVES et al., 2008).

Também em câncer de laringe, a expressão de ANXA1 foi avaliada *in vivo* (SILISTINO-SOUZA et al., 2007) e *in vitro* (RODRUGUES-LISONI et al., 2006), observando que essa proteína desempenha papel regulador nas células Hep-2, diminuindo o crescimento dessas células. Além disso, Faria e colaboradores (2010) investigaram o sangue periférico de pacientes com carcinoma epidérmide oral e indivíduos controle negativos, e identificaram que os níveis de mRNA da ANXA1 diminuíram significativamente correlacionados com a idade, sexo e localização anatômica da lesão tumoral. As análises revelaram o desempenho da expressão de ANXA1 como biomarcador adequado para pacientes com câncer da cavidade oral, especialmente aqueles com 60 anos ou mais de idade e/ou mulheres. Esses resultados sugerem que, para além da função anti-inflamatória, a anexina A1 pode também desempenhar um papel de supressor de tumor em células de sangue periférico, tais como leucócitos.

Ainda em relação ao câncer oral, Nomura e colaboradores (2009), avaliaram a expressão da proteína ANXA1 em lesões pré-malignas orais e carcinoma epidérmide oral. A regulação negativa da expressão da ANXA1 foi identificada na membrana plasmática das células epiteliais com lesões pré-malignas e carcinoma epidérmide de células orais, em comparação com os seus homólogos normais. A

perda de expressão da ANXA1 foi significativamente correlacionada com o estado pouco diferenciado do carcinoma epidermóide oral. Esses resultados sugerem que a perda de expressão da ANXA1 é frequente e o evento é precoce durante a carcinogênese oral, indicando que a ANXA1 pode contribuir para a manutenção da diferenciação epitelial em carcinoma oral.

A expressão da proteína ANXA1 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço foi avaliada por Pedrero e colaboradores (2004), identificando que os tecidos displásicos apresentaram redução significativa na expressão de ANXA1 em comparação ao epitélio normal. Também foi observada associação entre a expressão de ANXA1 e grau histológico. Tumores bem diferenciados apresentaram sinal positivo de ANXA1 em áreas altamente queratinizadas enquanto que tumores moderadamente e mal diferenciados exibiram coloração negativa ou muito fraca. Isso indica que a ANXA1 também é um marcador eficaz para classificação da diferenciação histopatológica de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

No nosso trabalho podemos concluir que o aveloz contribui para o aumento da expressão do gene *ANXA1* em células de carcinoma epidermóide de laringe, confirmando o papel da Anexina A1 na regulação da proliferação celular, além da função anti-inflamatória, desempenhando provavelmente um papel de supressor do tumor de laringe.

Quanto ao gene *TCEA1* (gene para o fator de extensão da transcrição - TFSII) estudado, ressaltamos a importância das suas funções essenciais para o processo tumorigênico, como a regulação da transcrição a partir do promotor de RNA polimerase II, reparo do DNA e regulação da expressão gênica. Esse gene foi inicialmente identificado como proteína estimuladora específica da RNA polimerase II (SEKIMIZU et al., 1979).

Estudos bioquímicos, estruturais e genéticos demonstraram que a S-II estimula a extensão da transcrição, promovendo leitura pela RNA polimerase II por toda cadeia de DNA molde (CHEN; ENGLAND; KANE, 1992; WIND; REINES, 2000). Os genes que codificam S-II foram identificados em muitos eucariotos, incluindo leveduras, ratos e humanos (MARSHALL; GUO; PRICE, 1990).

O TFSII possui três isoformas distintas conservadas, o TFSII tipo 1, também conhecido como *TCEA1*, tipo 2, *TCEA2*, isoforma específica do testículo e *TCEA3*, pouco conhecida (WEAVER; KANE, 1997). O gene humano de S-II, designado *TCEA1*, foi inicialmente relatado como sendo um gene de 2,5 kb mapeado em 3p22-

> p21.3 (DIMARCO et al., 1996). Em murinos o gene S-II é composto por 10 éxons e mapeados sobre a região proximal do cromossoma 1, que é simétrico para o cromossomo 8q em humanos (ITO et al., 2000). Consistente com a simetria entre os cromossomos de rato e humano, os progressos recentes no projeto genoma humano identificaram outro gene composto por 10 éxons em 8q11.1 (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>). Esses dados sugerem que o gene de S-II, no cromossomo 8q, codifica uma proteína funcional de S-II, enquanto que o outro gene no 3q é um pseudogene como proposto por HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee, <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>).

Recentemente, o gene *TCEA1*, a isoforma mais bem caracterizada de TFSII, foi estudado por Hubbard e colaboradores (2008), que testaram vários componentes da maquinaria de transcrição, com efeitos sobre as células cancerígenas. Verificaram que a queda de TFSII reduziu a proliferação de células de câncer de mama, pulmão e pâncreas, sugerindo que o TFSII pode ser utilizado como potencial alvo terapêutico para o câncer.

Um mecanismo subjacente dos tumores em geral, envolve a transcrição anormal de numerosos genes com expressão aumentada ou reduzida (SORLIE, 2004; NAGARAJA et al., 2006). A RNA polimerase II (RNAP) é uma enzima de subunidades múltiplas responsável por gerar todos mRNA em células eucarióticas (KOLODZIE et al., 1990; HU et al., 2006). Durante a extensão da transcrição, a RNAP pode se prender a sequências específicas no DNA, tornando-o incapaz de completar a síntese de mRNA (PLET; EICK; BLANCHARD, 1995; KEENE et al., 1999). Todos os estágios de regulação da RNAP podem ser potenciais alvos para terapia do câncer, incluindo a iniciação e/ou rescisão do processo de transcrição bem como a extensão do mRNA e o processo de terminação. Outro alvo poderia incluir os componentes envolvidos na remodelação da cromatina e posicionamento dos nucleossomas (BELOTSEKOVSKAYA et al., 2004; KHORASANIZADEH, 2004). A remodelação da cromatina é importante e permite o acesso da RNAP ao DNA e isso promove a desacetilação da histona, podendo influenciar na expressão de genes envolvidos na iniciação, progressão e metástase tumoral (LEONE et al., 2003).

Em nossos experimentos, o gene *TCEA1* não apresentou expressão significativa nas células de carcinoma epidermóide de laringe após o tratamento com aveloz, mesmo assim, foi observado ligeiro aumento da expressão desse gene, que

codifica o fator de extensão da transcrição, o qual é imprescindível para ligação da RNA polimerase II ao DNA molde, sendo, portanto, responsável pela transcrição dos genes. Isso nos permite propor que o aveloz modula a liberação de TFSII, o qual media a transcrição de mRNAs de alguns genes envolvidos em processos de diminuição da massa tumoral, como por exemplo, genes que aumentam a apoptose celular. Porém, outros ensaios são necessários para que possamos considerar o gene *TCEA1* como um possível marcador molecular para o câncer de laringe.

O gene *CD55* (gene para o fator acelerador de decaimento para o sistema complemento), localizado na região cromossômica 1q32, foi escolhido por apresentar funções relacionadas com câncer, tumor de células epidermóides, apoptose, sinalização, proliferação e crescimento celular, resposta inflamatória, distúrbios hereditários, elevação da concentração citosólica do íon cálcio, resposta imune inata, relatadas de acordo com os dados do *Gene Ontology (GO)*. E, além disso, é um gene regulador chave que afeta todas as vias de ativação do sistema complemento, codificando uma glicoproteína globular conhecida como fator acelerador de decaimento (DAF- decay accelerating factor), que possui peso molecular de 70 kDa e pode apresentar diferentes massas moleculares dependendo do tecido em que se apresenta (KIM; SONG, 2006). DAF é expressa em diferentes tipos celulares, essencialmente em células hematopoiéticas e células endoteliais, mas também está presente sob forma solúvel na lágrima, saliva, urina, líquido sinovial, líquido e plasma. Possui função biológica de acelerar o decaimento das C3 convertases das vias clássica e alternativa do sistema complemento. Ela inibe a ativação de C3 e C5, impedindo a formação de novas convertases, além de acelerar a degradação dessas enzimas pré-formadas (LUBLIN; ATKINSON, 1989).

A regulação para evitar a ativação inadequada do sistema complemento ocorre por meio de proteínas codificadas nos grupos de genes reguladores da ativação do complemento (DAF), que atuam em pontos-chave nas cascatas para evitar consequências patológicas. Um grande número de doenças humanas se relaciona com a inadequada ativação do complemento e também, a deficiência de DAF (*CD55*) está ligada a muitas condições de doenças como hemoglobinúria noturna, doenças autoimunes e perda da gravidez devido a defeitos na fase lútea (PARKER, 1996). Dessa maneira, diante da atuação do *CD55* na regulação do sistema complemento, pode-se inferir que esse gene exibe um papel anti-inflamatório, regulando assim a indução da resposta inflamatória sistêmica, além de

desempenhar diversas funções fisiológicas incluindo a proteção do tecido, devido à sua propriedade de antiaderência, que aumenta a transmigração de monócitos e macrófagos e reduz a lesão (LUKACIK, et al., 2004).

Em nossos ensaios, demonstramos que a expressão de *CD55* foi elevada na linhagem celular de carcinoma epidermóide de laringe após o tratamento com o aveloz, confirmando seu papel anti-inflamatório.

Alguns trabalhos com o gene *CD55* mostraram que ele pode atuar em diferentes situações, como por exemplo, Shen e colaboradores (2012) que analisaram a expressão de *CD55* em carcinoma de nasofaringe e sua correlação com características clínico-patológicas. Constataram que a expressão da proteína *CD55* detectada em tecidos de carcinoma de nasofaringe foi maior do que no tecido normal. Pacientes com expressão positiva de *CD55* tiveram um tempo significativamente menor de sobrevivência global do que os pacientes com expressão negativa de *CD55*. Os dados obtidos nesse estudo sugerem que o *CD55* é frequentemente expresso no carcinoma de nasofaringe e a sua expressão está associada com a diminuição da sobrevivência dos pacientes e, portanto, a expressão de *CD55* pode ser um potencial fator prognóstico para esses pacientes.

O último gene estudado, o *NGFRAP1* (gene para o receptor do fator de crescimento do nervo (TNFRSF16) associado à proteína 1), importante nos processos de apoptose celular, possuindo também a função de ligante de proteína, é localizado na região cromossômica Xq22.2, contém uma região rica em cisteína, aonde se localiza o domínio de ligação do fator de crescimento do nervo. É um receptor multifuncional da superfície da célula, encontrado em muitos tipos de células humanas, incluindo células do cérebro adulto (GAO; DAUGHERTY; TOURTELLOTTE, 2007).

Esse gene pode induzir a apoptose e também está envolvido na lesão, desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso (GAO; DAUGHERTY; TOURTELLOTTE, 2007). Estudos mostram que a expressão de *NGFR* (TNFRSF16) é induzida em muitas condições patológicas, tais como o câncer, atuando na maioria dos casos como supressor do tumor, causando apoptose e supressão de invasão metastática (DIMARAS et al., 2006).

No nosso trabalho, o gene *NGFRAP1* não apresentou expressão diferencial significativa nas células de carcinoma epidermóide de laringe após tratamento com aveloz, porém, pôde-se observar pela técnica de PCR Quantitativo em tempo real,

pequeno aumento da expressão. Isso aconteceu provavelmente porque o aveloz age induzindo a expressão de *NGFRAP1*, um importante regulador da indução do processo apoptótico, controlando a proliferação das células de carcinoma epidermóide de laringe. Porém, outros ensaios são necessários para que esse gene seja considerado um bom marcador molecular para o câncer de laringe.

Em resumo, no presente trabalho, observamos que os genes encontrados como diferencialmente expressos são importantes nas cascatas dos processos tumorigênicos e inflamatórios, podendo ter suas expressões modificadas pela possível interação com o aveloz. Esse por sua vez, pode ter uma ação moduladora na regulação da expressão gênica em câncer de laringe.

Apesar de poucas investigações terem avaliado o efeito do fitoterápico na expressão desses genes selecionados, futuros estudos moleculares serão necessários para mostrar os mecanismos de ação dessa planta.

Dessa maneira, os nossos dados apontam a importância da ação do aveloz, nas células Hep-2, tendo em vista as aplicações desse fitoterápico como uma indicação terapêutica no carcinoma epidermóide de laringe.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com as células Hep-2, nas condições experimentais propostas, permitem concluir:

- a morfologia celular não é modificada após o tratamento com aveloz, no entanto a proliferação celular diminui;
- a expressão de 19 genes é alterada após o tratamento com aveloz;
- o fitoterápico diminui a expressão do gene *ITPR1*, validado por PCR quantitativo em tempo real e aumenta dos genes *ANXA1* e *CD55*;
- as vias de sinalização celular que os genes modulados pelo aveloz participam, também formam uma rede de interação com outros genes associados com o câncer, doenças inflamatórias, ciclo celular, desenvolvimento e morfologia celular.

Essas conclusões associadas mostram que a *E. tirucalli* altera a expressão de genes que estão envolvidos nas cascatas de sinalização de processos tumorigênicos e inflamatórios, alterando a proliferação e a expressão gênica nas células Hep-2. Desse modo, nossos resultados apontam o extrato do aveloz AM10 como uma terapia alternativa inovadora para o tratamento do carcinoma epidermóide de laringe.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V. A.; NONOGAKI, S.; CURY, P. M.; WÜNSCH-FILHO, V.; DE CARVALHO, M. B.; MICHALUART-JÚNIOR, P.; MOYSES, R. A.; CURIONI, O. A.; FIGUEIREDO, D. L.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; PARRA, E. R.; POLACHINI, G. M.; SILISTINO-SOUZA, R.; OLIANI, S. M.; SILVA-JÚNIOR, W. A.; NOBREGA, F. G. HEAD AND NECK GENOME PROJECT/GENCAPO, TAJARA, E. H.; ZAGO M. A. Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology**, Oxford, v. 53(6), p. 715-27. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03186, Dec. 2008.

AMIRGHOFAN, Z.; BAHMANI, M.; AZADMEHR, A.; JAVIDNIA, K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v.132, n.7, p. 427-432, Jul. 2006.

ANG, K. K.; BERKEY, B. A.; TU, X.; ZHANG, H. Z.; KATZ, R.; HAMMOND, E. H.; FU, K. K.; MILAS, L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. **Cancer Research**, Chicago n. 62, v. 24, p. 7350-6, 2002.

AQUINO, C. L.; BARBOSA, G. M.; BARBOSA, G. M.; VARRICCHIO, M. C. B. A.; VEIGA, V. F.; KUSTER, R.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M.; HOLANDINO, C. High dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. (aveloz) modify the viability and glycolytic metabolism of cell lines. **International Journal of High Dilution Research**, Guaratinguetá, v. 7, n. 24, p. 132-139, 2008.

AWADA, A.; ISMAEL, G. The challenging integration of platinum compounds, taxanes, and molecular-targeted therapies in the multidisciplinary treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Current Opinion in Oncology**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 177-179, May. 2007.

AYA, T.; KINOSHITA, T.; IMAI, S.; KOIZUMI, S.; MIZUNO, F.; OSATO, T.; SATOH, C.; OIKAWA, T.; KUZUMAKI, N.; OHIGASHI, H. Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and *Euphorbia tirucalli* in B lymphocytes. **The Lancet**, London, v. 337, n. 8751, p. 1190, May. 1991.

BANI, S.; KAUL, A.; KHAN, B.; GUPTA, V. K.; SATTI, N. K.; SURI, K. A.; QAZI, G. N. Anti-arthritis activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.110, n. 1, p. 92-98, Sep. 2007.

BELOTSEKOVSKAYA, R.; SAUNDERS, A.; LIS, J. T.; REINBERG, D. Transcription through chromatin: understanding a complex FACT. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1677, n. 1–3, p. 87-99, 2004.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, p. 315-325, 1993.

BERTINELLI, L. A.; TOURINHO FILHO, H.; CAPONI, P. Experiências de idosos após laringectomia total. **Revista Gaúcha de Enfermagem**: Porto Alegre, v. 29, n. 2, p. 214-220, jun. 2008.

- BETANCUR-GALVIS, L. A.; MORALES, G. E.; FORERO, J. E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 541-546, 2002.
- BHOWMICK, N. A.; MOSES, H. L. Tumor-stroma interactions. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 15, p. 97-101, 2005.
- BRIA, E.; CUPPONE, F.; CECERE, F. L.; MILELLA, M.; NISTICÒ, C.; COGNETTI, F.; TERZOLI, E. Adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, Hagerstown, v. 2, n. 5. p. S7-11, 2007.
- CALMON, M. F.; MOTA, M. T.; BABETO, E.; CANDIDO, N. M.; GIROL, A. P.; MENDIBURU, C. F.; BONILHA, J. L.; SILVESTRE, R. V.; ROSA, B. M.; THOMÉ, J. A.; MEDEIROS, G. H.; SOARES, F. A.; GUIMARÃES, G. C.; DE ARRUDA, J. G.; OLIANI, S. M.; VILLA, L. L.; VASSALLO, J.; RAHAL, P. Overexpression of ANXA1 in penile carcinomas positive for high-risk HPVs. **PLoS One**, San Francisco, v.8, n. 1, Jan., 2013.
- CALMON, M. F.; RODRIGUES, R. V.; KANETO, C. M.; MOURA, R. P.; SILVA, S. D.; MOTA, L. D.; PINHEIRO, D. G.; TORRES, C.; DE CARVALHO, A. F.; CURY, P. M.; NUNES, F. D.; NISHIMOTO, I. N.; SOARES, F. A.; DA SILVA, A. M.; KOWALSKI, L. P.; BRENTANI, H.; ZANELLI, C. F.; SILVA, W. A. JR.; RAHAL, P.; TAJARA, E. H.; CARRARO, D. M.; CAMARGO, A. A.; VALENTINI, S. R. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia**, New York, v. 11, n. 12, p. 1329-1339, Dec. 2009.
- CASEIRO, B. M.; FERREIRA, E. P.; GRILLO, J. G. B.; ARAÚJO, J. H. B. DE. Estudo do potencial de cura de formas de câncer utilizando Aveloz (*Euphorbia Tirucalli*). In: Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar MICTI, 1, 2006, Comburiu. **Anais I da Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar**, Comburiu: UFSC, 2006.
- CATALUÑA, P.; RATES, S. M. K. The traditional use of the latex from *Euphorbia tirucalli linnaeus* (euphorbiaceae) in the treatment of cancer in South Brazil. In: ISHS ACTA HORTICULTURAE 501: WOCMAP CONGRESS MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS PART 2: PHARMACOGNOSY, PHARMACOLOGY, PHYTOMEDICINE, TOXICOLOGY, 2., 1999, Mendoza. **Proceedings**, Mendoza, p. 289-296, 1999.
- CHEN, H. C.; ENGLAND, L.; KANE, C. M. Characterization of a HeLa cDNA clone encoding the human SII protein, an elongation factor for RNA polymerase II. **Gene**, Amsterdam, v. 116, p. 253-258, 1992.
- CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 87, n. 1, p. 14-32, Jan. 2008.
- CONWAY, D. I.; MCMAHON, A. D.; SMITH, K.; BLACKB, R.; ROBERTSON, G.; DEVINED, J.; MCKINNEY, P. A. Components of socioeconomic risk associated with

head and neck cancer: a population-based case-control study in Scotland. **The British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v. 48, n. 1, p. 11-7, 2010.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1994. p. 63.

CROXTALL, J.; FLOWER, R.; PERRETTI, M. The role of lipocortin 1 in the regulation of A549 cell proliferation and leukocyte migration. **Journal of lipid mediators**, Amsterdam, v. 6, n. 1-3, p. 295-302, mar-apr. 1993.

DA CUNHA, E. E.; OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, London, v. 25, p. 303-311, 2012.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of innate and adaptive immune systems. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 155, n. 2, p. 152-169, sep. 2008.

DANTAS, I. C. Avelós. In: **O Raizeiro**. Campina Grande: EDUEP, 1. ed. p. 107-109, 2007.

DASGUPTA, S.; DASH, R.; DAS, S. K.; SARKAR, D.; FISHER, P. B. Emerging strategies for the early detection and prevention of head and neck squamous cell cancer. **Journal of cellular physiology**, Philadelphia, v. 227, n. 2, p. 467-73, 2012.

DEMAUREX, N.; DISTELHORST, C. Apoptosis - the Calcium Connection. **Science**, New York, v. 300, n. 5616, p. 65-67, 2003.

DIMARAS, H.; COBURN, B.; PAJOVIC, S.; GALLIE, B. L. Loss of NGFR neurotrophin receptor expression accompanies malignant progression to human and murine retinoblastoma. **Molecular Carcinog**, New York, v. 45, n. 5, p. 333-343, 2006.

DIMARCO, S. P.; GLOVER, T. W.; MILLER, DE.; REINES, D.; WARREN, S. T. Transcription elongation factor SII (TCEA) maps to human chromosome 3p22 - > p21.3. **Genomics**, San Diego, v. 36, p. 185-188, 1996.

DORNFELD, K.; SIMMONS, J. R.; KARNELL, L.; KARNELL, M.; FUNK, G.; YAO, M.; WACHA, J.; ZIMMERMAN, B.; BUATTI, J. M. Radiation doses to structures within and adjacent to the larynx are correlated with long term diet and speech related quality of life. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, New York, v. 68, n. 3, p. 750-757, 2007.

DUTRA, R. C.; CLAUDINO, R. F.; BENTO, A. F.; MARCON, R.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO J. B. Preventive and therapeutic ephol treatment attenuates experimental colitis in mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 11, p. e27122, Nov. 2011.

ESTRELA, F.; ELIAS, V.; MARTINS, V. Reabilitação do paciente disfágico em cirurgia de cabeça e pescoço. In: JACOBI, J.S.; LEVY, D.S.; SILVA, L.M.C. Disfagia: avaliação e tratamento. 2.ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, p. 233-276, 2004.

FARIA, P. C.; SENA, A. A.; NASCIMENTO, R.; CARVALHO, W. J.; LOYOLA, A. M.; SILVA, S. J.; DURIGHETTO, A. F.; OLIVEIRA, A. D.; OLIANI, S. M.; GOULART, L. R. Expression of annexin A1 mRNA in peripheral blood from oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Oncology**, Oxford, v. 46(1), p. 25-30, Jan. 2010.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1990.

FOSKETT, J. K.; WHITE, C.; CHEUNG, K. H.; MAK, DO. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. **Physiological Reviews**, Washington, v. 87, p. 593-658, 2007.

FRANZI, S. A.; SILVA, P. G. Avaliação da qualidade de vida em pacientes submetidos à quimioterapia ambulatorial no Hospital Heliópolis. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 3, p. 153-158, 2003.

FURSTENBERGER, G.; HECKER, E. On the active principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia tirucalli* originating from Madagascar. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 49, n. 3, p. 386-397, May-June. 1986.

GAO, X.; DAUGHERTY, R. L.; TOURTELLOTTE, W. G. Regulation of low affinity neurotrophin receptor (NGFR) by early growth response (egr) transcriptional regulators. **Molecular and Cellular Neuroscience**, San Diego, v. 36, n. 4, p. 501-514, 2007.

GERKE, V.; MOSS, SE. Annexins: from structure to function. **Physiological Reviews**, Washington, v. 2, p. 331-371. 2002.

GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E.; XIAO, W.; BEGUM, S.; VISCIDI, R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 100, n. 6, p. 407-20, Mar. 2008.

GREINER, E. F.; GUPPY, M.; BRANDY, K. Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, p. 31484-31490, 1994.

GUHA, N.; BOFFETTA, P.; WÜNSCH FILHO, V. W. N.; NETO, J. E.; SHANGINA, O.; ZARIDZE, D.; CURADO, M. P.; KOIFMAN, S.; MATOS, E.; MENEZES, A.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; FERNANDEZ, L.; MATES, D.; DAUDT, A. W.; LISSOWSKA, J.; DIKSHIT, R.; BRENNAN, P. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 166, n. 10, p. 1159-73, 2007.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; CHUANG, S.; BOCCIA, S.; CASTELLSAGUE, X.; CHEN, C.; CURADO, M. P.; MASO, L. D.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WÜNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KELSEY, K.; KOIFMAN, S.; VECCHIA, C. L.; LAZARUS, P.; LEVI, F.; LENCE, J. J.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MCCLEAN, M. D.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; PURDUE, M.; RUDNAI, P.; SCHWARTZ, S. M.; SMITH, E.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; SHANGINA, O.; PILARSKA, A.; ZHANG, Z.; FERRO, G.; BERTHILLER, J.; BOFFETTA, P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 541-550, Feb. 2009.

HASHIBE, M.; BOFFETTA, P.; ZARIDZE, D.; SHANGINA, O.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; MATES, D.; FABIÁNOVÁ, E.; RUDNAI, P.; BRENNAN, P. Contribution of Tobacco and Alcohol to the High Rates of Squamous Cell Carcinoma of the Supraglottis and Glottis in Central Europe. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.165, n.7, p.814-820, apr. 2007.

HERCHENHORN, D.; DIAS, F. L. Advances in radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 39-46, jan. 2004.

HU, X.; MALIK, S.; NEGROIU, C. C.; HUBBARD, K.; VELALAR, C. N.; HAMPTON, B.; GROSU, D.; CATALANO, J.; ROEDER, R. G.; GNATT, A. A Mediator-responsive form of metazoan RNA polymerase II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 25, p. 9506-9511, 2006.

HUANG, G. C.; LIU, S. Y.; LIN, M. H.; KUO, Y. Y.; LIU, Y. C. The synergistic cytotoxicity of cisplatin and taxol in killing oral squamous cell carcinoma. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, Tokyo, v. 34, n. 9, p. 499-504, 2004.

HUBBARD, K.; CATALANO, J.; PURI, R. K.; GNATT, A. Knockdown of TFIIIS by RNA silencing inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis. **BMC Cancer**, London, v. 8, p. 133, 2008.

HUTCHINSON, J. L.; RAJAGOPAL, S. P.; SALES, K. J.; JABBOUR, H. N. Molecular regulators of resolution of inflammation: potential therapeutic targets in the reproductive system. **Reproduction**, Cambridge, v.142, p. 15-28, 2011.

ITO, T.; SELDIN, M. F.; TAKETO, M.M.; KUBO, T.; NATORI, S. Gene structure and chromosome mapping of mouse transcription elongation factor S-II (Tcea1). **Gene**, Amsterdam, v. 244, p. 55-63, 2000.

IAFFAIOLI, R. V.; MILANO, A.; CAPONIGRO, F. Therapy of metastatic bladder carcinoma. **Annals of Oncology**, Dordrech, v. 18, n. 6, p. 153-156, 2007.

INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Secretaria de Atenção à Saúde; Instituto Nacional do Câncer, 2013.

INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Secretaria de Atenção à Saúde; Instituto Nacional do Câncer, 2011.

ISLAMI, F.; FEDIRKO, V.; TRAMACERE, I.; BAGNARDI, V.; JENAB, M.; SCOTTI, L.; ROTA, M.; CORRAO, G.; GARAVELLO, W.; SCHUZ, J.; STRAIF, K.; NEGRI, E.; BOFFETTA, P.; LA VECCHIA, C. Alcohol drinking and esophageal squamous cell carcinoma with focus on light-drinkers and never smokers a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 129, p. 2473–2484, 2011.

JIANG, H.; KANG, D. C.; ALEXANDRE, D.; FISHER, P. B. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 23, p. 12684-12689, Nov., 2000.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. Genética do Câncer - **In Genética Médica**, 2ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 197-212, 2000.

JORGE, Y. C.; MATARUCO, M. M.; ARAÚJO, L. P.; ROSSI, A. F. T.; DE OLIVEIRA, J. G.; VALSECHI, M. C.; CAETANO, A.; MIYAZAKI, K.; FAZZIO, C. S. J.; THOMÉ, J. A.; RAHAL, P. OLIANI, S. M.; SILVA, A. E. Expression of Annexin-A1 and Galectin-1 Anti-Inflammatory Proteins and mRNA in Chronic Gastritis and Gastric Cancer. **Mediators of Inflammation**, Oxford, p.11, 2013.

JURBERG, P.; CABRAL NETO, J. B.; SCHALL, V. T. Molluscicide activity of the "avelós" plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p. 423-7, Oct.-Dec. 1985.

KAZANIETZ, M. G.; CALOCA, M. J.; EROLES, P.; FUJII, T.; GARCÍA-BERMEJO, M. L.; REILLY, M.; WANG, H. Pharmacology of the receptors for the phorbol ester tumor promoters: multiple receptors with different biochemical properties. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 60, n. 10, p. 1417-1424, nov. 2000.

KEENE, R. G.; MUELLER, A.; LANDICK, R.; LONDON, L. Transcriptional pause, arrest and termination sites for RNA polymerase II in mammalian N- and c-myc genes. **Nucleic acids research**, London, v. 27, n. 15, p. 3173-3182, 1999.

KHALEGHIAN, A.; RIAZI, G. H.; GHAFARI, M.; REZAIE, M.; TAKAHASHI, A.; NAKAYA, Y.; NAZARI, H. Effect of inganen anticancer properties on microtubule organization. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Karachi, v. 23, n. 3, p. 273-278, Jul. 2010.

KHAN, M. T.; WAGNER II. L.; YULE, D I.; BHANUMATHY, C.; JOSEPH, S. K. Akt Kinase Phosphorylation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. **The journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 6, p. 3731–3737, Feb. 2006.

KHORASANIZADEH, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 259-272, 2004.

- KHURI, F. R.; NEMUNAITIS, J.; GANLY, I.; ARSENEAU, J.; TANNOCK, I. F.; ROMEL, L.; GORE, M.; IRONSIDE, J.; MACDOUGALL, R. H.; HEISE, C.; RANDLEV, B.; GILLENWATER, A. M.; BRUSO, P.; KAYE, S. B.; HONG, W. K.; KIRN, D. H. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. **Nature Medicine**, Weinheim, v. 6, n. 8, p. 879-885, 2000.
- KIM, D. D.; SONG, W. C. Membrane complement regulatory proteins. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 118, n. (2-3), p. 127-136, 2006.
- KOŁODZIE, J. P. A.; WOYCHIK, N.; LIAO, S. M.; YOUNG, R. A. RNA polymerase II subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 10, n. 5, p. 1915-1920, 1990.
- KUO, P. L.; CHO, C. Y.; HSU, Y. L.; LIN, T. C.; LIN, C. C. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 213, n. 1, p. 37-45, mai. 2006.
- LASSIG, A. A.; LINDGREN, B. R.; FERNANDES, P.; COOPER, S.; ARDESHIPOUR, F.; SCHOTZKO, C.; YUEH, B. The effect of young age on outcomes in head and neck cancer. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 123, n. 8, p.1896-90231, may. 2013.
- LE MOGUEN, K.; LINCET, H.; MARCELO, P.; LEMOISSON, E.; HEUTTE, N.; DUVAL, M.; POULAIN, L.; VINH, J.; GAUDUCHON, P.; BAUDIN, B. A proteomic kinetic analysis of IGROV1 ovarian carcinoma cell line response to cisplatin treatment. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 22, p. 4090-4101, nov. 2007.
- LENČESOVÁ, L.; HUDECOVÁ, S.; CSADEROVÁ, L.; MARKOVÁ, J.; SOLTYSOVÁ, A.; PASTOREK, M.; SEDLAK, J.; WOOD, M. E.; WHITEMAN, M.; ONDRIAS, K.; KRIZANOVÁ, O. Sulphide signalling potentiates apoptosis through the up-regulation of IP3 receptor types 1 and 2. **Acta physiologica**, Oxford, England, v. 208, n. 4, p. 350-361, aug. 2013.
- LEONE, G.; VOSO, M. T.; TEOFILI, L.; LUBBERT, M. Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS. **Clinical Immunology**, Freiberg, v. 109, n. 1, p. 89-102, 2003.
- LIANG, F.; LI, L.; WANG, M.; NIU, X.; ZHAN, J.; HE, X.; YU, C.; JIANG, M.; LU, A. Molecular network and chemical fragment-based characteristics of medicinal herbs with cold and hot properties from Chinese medicine. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 148, n. 3, p. 770-779, jul. 2013.
- LIN, MING-WEI; LIN, AN-SHEN.; WU, DENG-CHYANG.; WANG, S. S. W.; CHANG, FANG-RONG.; WUD, YANG-CHANG.; HUANG, YAW-BIN. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. 4333-4339, 2012.

- LIRIO, L. G.; HERMANO, M. L.; FONTANILLA, M. Q. Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 36, p. 357-359, 1998.
- LOTHAIRE P, DE AZAMBUJA E, DEQUANTER D, LALAMI Y, SOTIRIOU C, ANDRY G.; CASTRO JR, G.; AWADA, A. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. **Molecular Markers in Head and Neck Cancer**, New York, v. 28, n. 3, p. 256-269, Mar. 2006.
- LUBLIN, D. M.; ATKINSON, J. P. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. **Annual Reviews Immunology**, St. Louis, v. 7, p. 35-58, 1989.
- LUKACIK, P.; ROVERSI, P.; WHITE, J.; ESSER, D.; SMITH, G. P.; BILLINGTON, J.; WILLIAMS, P. A.; RUDD, P. M.; WORMALD, M. R.; HARVEY, D. J.; CRISPIN, M. D. M.; RADCLIFFE, C. M.; DWEK, R. A.; EVANS, D. J.; MORGAN, B. P.; SMITH, R. A. G.; LEA, S. M. Complement regulation at the molecular level: The structure of decay-accelerating factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 1279–1284, 2004.
- MACNEIL, A.; SUMBA, O. P.; LUTZKE, M. L.; MOORMANN, A.; ROCHFORD, R. Activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle by the latex of the plant *Euphorbia tirucalli*. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 88, n. 10, p. 1566-1569, May. 2003.
- MADUREIRA, A. M.; FERREIRA, M. J.; GYÉMÁNT, N.; UGOCSAI, K.; ASCENSO, J. R.; ABREU, P. M.; HOHMANN, J.; MOLNÁR, J. Rearranged jatrophone-type diterpenes from euphorbia species. Evaluation of their effects on the reversal of multidrug resistance. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n.1, p. 45-49, 2004.
- MARCU, L. G.; YEOH, E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. **Journal Cancer Research of Clinical Oncology**, Berlin, v. 135, n. 10, p. 1303-14, 2009.
- MARSHALL, T. K.; GUO, H.; PRICE, D. H. Drosophila RNA polymerase II elongation factor DmS-II has homology to mouse S-II and sequence similarity to yeast PPR2. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6293-6298, 1990.
- MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 83, n. 4, p. 489-50, 2008.
- MATULLO, G.; DUNNING, A. M.; GUARRERA, S.; BAYNES, C.; POLIDORO, S.; GARTE, S.; AUTRUP, H.; MALAVEILLE, C.; PELUSO, M.; AIROLDI, L.; VEGLIA, F.; GORMALLY, E.; HOEK, G.; KRZYWANOWSK, M.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; CLAVEL-CHAPELON, F.; LINSEISEN, J.; BOEING, H.; TRICHOPOULOU, A.; PALLI, D.; KROGH, V.; TUMINO, R.; PANICO, S.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; PEETERS, P. H.; LUND, E.; PERA, G.; MARTINEZ, C.; DORRONSORO, M.; BARRICARTE, A.; TORMO, M. J.; QUIROS, J. R.; DAY, N. E.; KEY, T. J.; SARACCI, R.; KAAKS, R.; RIBOLI, E.; VINEIS, P. DNA repair

polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study. **CarcinoGenesis**, New York, v. 27, p. 997-1007, 2006.

MEIRA, D. D.; MARINHO-CARVALHO, M. M.; TEIXEIRA, C. A.; VEIGA, V. F.; DA POIAN, A. T.; HOLANDINO, C.; DE FREITAS, M. S.; SOLA-PENNA, M. Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 84, p. 354-362, 2005.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; DE AMORIM, E. L. C.; DO NASCIMENTO, S. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, p. 1-14, Jan. 2011.

MEOLA, J.; ROSA E SILVA, J. C.; DENTILLO, D. B.; DA SILVA, W. A. JR.; VEIGA-CASTELLI, L. C.; BERNARDES, L. A.; FERRIANI, R. A.; DE PAZ, C. C.; GIULIATTI, S.; MARTELLI, L. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 93, n. 6, p. 1750-1773, Apr. 2010.

MIGNERY, G. A.; NEWTON, C. L.; ARCHER, B. T.; SUDHOF, T. C. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, p. 12679-12685, 1990.

NAGARAJA, G. M.; OTHMAN, M.; FOX, B. P.; ALSABER, R.; PELLEGRINO, C. M.; ZENG, Y.; KHANNA, R.; TAMBURINI, P.; SWAROOP, A.; KANDPAL, R. P. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. **Oncogene**, Basingstoke, v. 25, n. 16, p. 2328-2338, 2006.

NEGRI, E.; BOFFETTA, P.; BERTHILLER, J.; CASTELLSAGUE, X.; CURADO, M. P.; DAL MASO, L.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WUNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KOIFMAN, S.; LAZARUS, P.; LENCE, J. J.; LEVI, F.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; RUDNAI, P.; SHANGINA, O.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; ZARIDZE, D.; LISSOWSKA, J.; ZHANG, Z.; FERRO, G.; BRENNAN, P.; VECCHIA, C. L.; HASHIBE, M. Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 124, p. 394-401, 2009.

NETZEL, G. T.; ARAUJO, J. H. B. DE. Estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* do látex de *Euphorbia tirucalli* L. In: Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR, 19, 2006, Campo Mourão. **Anais do XIV SICITE**, Campo Mourão: UTFPR, v. 2, 2009.

NOMURA, H.; UZAWA, K.; YAMANO, Y.; FUSHIMI, K.; NAKASHIMA, D.; KOUZU, Y.; KASAMATSU, A.; OGAWARA, K.; SHIIBA, M.; BUKAWA, H.; YOKOE, H.; TANZAWA, H. Down-regulation of plasma membranous Annexin A1 protein expression in premalignant and malignant lesions of the oral cavity: correlation with

epithelial differentiation. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 135(7), p. 943-9, Jul. 2009.

OLIANI, S. M.; PAUL-CLARK, M. J.; CRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed post-capillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 158, n. 2, p. 603-615, feb. 2001.

OREM, J.; MBIDDE, E. K.; LAMBERT, B.; DE SANJOSE, S.; WEIDERPASS, E. Burkitt's lymphoma in Africa, a review of the epidemiology and etiology. **African Health Sciences**, Kampala, v. 7, n. 3, p. 166-175, Sept. 2007.

OSATO, T.; MIZUNO, F.; IMAI, S.; AYA, T.; KOIZUMI, S.; KINOSHITA, T.; TOKUDA, H.; ITO, Y.; HIRAI, N.; HIROTA, M.; et al. African Burkitt's lymphoma and an Epstein-Barr virus-enhancing plant *Euphorbia tirucalli*. **Lancet**, London, n. 8544, p. 1257-1258, May. 1987.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annual Reviews Pathology**, Palo Alto, v. 4, p. 49-70, 2009.

PARKER, C. J. Molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Stem Cells**, New York, v. 14, n. 4, p. 396-411. 1996.

PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; MARCON, R.; NASCIMENTO, A. F.; CALIXTO, J. B.; PIANOWSKI, L. F. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 698, n. 1-3, p. 413-420, 5 jan. 2013.

PAVIA, M.; PILEGGI, C.; NOBILE, C. G.; ANGELILLO, I. F. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 83, n. 5, p. 1126-34, 2006.

PEDRERO, J. M. G.; FERNANDEZ, M. P.; MORGAN, R. O.; ZAPATERO, A. H.; GONZALEZ, M. V.; SUAREZ NIETO, C.; RODRIGO, J. P. Annexin A1 Down-Regulation in Head and Neck Cancer Is Associated with Epithelial Differentiation Status. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, n. 1, v. 164, Jan. 2004.

PEIRCE, W. E.; ROE, F. J. Dose-response in tumour-promotion by *Euphorbia tirucalli* latex. **Oncologia**, Madrid, v. 15, p. 189-93, 1962.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R.; CHENDRAUI, P.; HAYA, J. Vitamin D acquisition and breast cancer risk. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 16, n. 1, p. 7-19, 2009.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v. 9, n. 29, p. 2002-2007, 2001.

PIANOWSKI, L. F. Testes indicam que o aveloz combate vários tipos de cânceres. Fundação de Apoio à Pesquisa do Piauí. **Revista Sapiência**, Teresina, n. 23, ano. VI, p. 4-9 mar. 2010.

PIANOWSKI, L. F.; CHAVES, C. P.; CALIXTO, J. B. Active fraction of a polar solvent extract from the latex of *Euphorbiaceae* plants. **Patent Application Publication**. Pub. No.: US 2009/0142421 A1, 4 jun. 2009.

PLATEK, M. E, MYRICK E, MCCLOSKEY SA, GUPTA V, REID ME, WILDING GE, COHAN D, ARSHAD H, RIGUAL NR, HICKS WL JR, SULLIVAN M, WARREN GW, SINGH AK. Pretreatment weight status and weight loss among head and neck cancer patients receiving definitive concurrent chemoradiation therapy: implications for nutrition integrated treatment pathways. **Supportive Care in Cancer**, Berlin, 7 jun. 2013.

PLET, A.; EICK, D.; BLANCHARD, J. M. Elongation and premature termination of transcripts initiated from c-fos and c-myc promoters show dissimilar patterns. **Oncogene**, Basingstoke, v. 10, n. 2, p. 319-328, 1995.

QUEIROZ, M. L. S.; VALADARES, M. C.; BINCOLETTO, C.; DIEAMANT, G. C. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, New York, v. 26, N. 4, p. 511-525, 2004.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. Rapid Cycle Real -Time PCR, Methods and Applications. **Springer Press**, Heidelberg, p. 21- 34, 2001.

REZENDE, J. R. R.; RODRIGUES, S. B.; JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; DA ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 481-484, 2004.

RODRIGUES-LISONI, F. C.; PEITL JR, P.; VIDOTTO, A.; M POLACHINI, G.; MANIGLIA, J. V.; CARMONA-RAPHE, J.; CUNHA, B. R.; HENRIQUE, T.; SOUZA, C. F.; TEIXEIRA, R. A. P.; FUKUYAMA, E. E.; MICHALUART JR, P.; DE CARVALHO, M. B.; OLIANI, S. M.; GENCAPO, H. N. G. P.; TAJARA, E. H. Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions. **BMC Medical Genomics**, Chichester, v. 3, p. 14, may. 2010.

RODRIGUES-LISONI, F. C.; MEHEMETA, D. K.; PEITL JR, P.; JOHNA, C. D.; TAJARA, E.; BUCKINGHAMA, J. C.; SOLITO, A. E. In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. **FEBS Letters**, Amsterdam, n. 5, v. 580, p. 1431-1438, Feb. 2006.

ROGERS, S. N.; AHAD, S. A.; MURPHY, A. P. A structured review and theme analysis of papers published on quality of life in head and neck cancer: 2000-2005. **Oral Oncology**, Oxford, v. 43, n. 9, p. 843-868, oct. 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

- SEKIMIZU, K.; NAKANISHI, Y.; MIZUNO, D.; NATORI, S. Purification and preparation of antibody to RNA polymerase II stimulatory factors from Ehrlich ascites tumor cells. **Biochemistry**, Washington, v. 18, p. 1582-1588, 1979.
- SHEN, Y.; YIN, R.; DENG, X.; SHEN, H. Increased expression of CD55 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. **Clinical and Investigative Medicine**, Oxford, v. 1, n. 35(1), p. 34-39, 2012.
- SILISTINO-SOUZA, R.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; CURY, P. M.; MANIGLIA, J. V.; RAPOSO, L. S.; TAJARA, E. H.; CHRISTIAN, H. C.; OLIANI, S. M. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 120, n. 12, p. 2582-9, Jun. 2007.
- SOGHOIAN, D.; JAYARAMAN, V.; SILANE, M.; BERENSTEIN, A.; JAYARAMAN, T. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation in breast cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, Tokyo, Japan, v. 26, n. 4, p. 207-212, jul-aug. 2005.
- SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 40, n. 18, p. 2667-2675, 2004.
- SUN, S.; SCHILLER, J. H.; GAZDAR, A. F. Lung cancer in never smokers: a different disease. **Nature Review Cancer**, London, v. 7, n. 10, p. 778-790, 2007.
- SZALAI, G.; KRISHNAMURTHY, R.; HAJNÓCZKY, G. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6349-6361, 1999.
- TERRA-FILHO, M.; KITAMURA, S. Occupational lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 32, p. 60-68, 2006.
- TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. p. i-ix.
- TIWARI, S.; SINGH, A. Alterations in carbohydrates and the protein metabolism of the harmful freshwater vector snail *Lymnaea acuminata* induced by the *Euphorbia tirucalli* latex extract. **Environmental Research**, San Diego, v. 99, p. 378-386, 2005.
- TSUNODA, T.; KOGA, H.; YOKOMIZO, A.; TATSUGAMI, K.; ETO, M.; INOKUCHI, J.; HIRATA, A.; MASUDA, K.; OKUMURA, K.; NAITO, S. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. **Nature**, Basingstoke, v. 24, p. 1396-1402, 2005.
- VALADARES, M. C.; CARRUCHA, S. G.; ACCORSI, W.; QUEIROZ, M. L. S. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 294-299, feb. 2006.

- VAN DEN BOSCH, C.; GRIFFIN, B. E.; KAZEMBE, P.; DZIWENI, C.; KADZAMIRA, L. Are plant factors a missing link in the evolution of endemic Burkitt's lymphoma? **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 68, n. 6, p. 1232-1235, dec. 1993.
- VANDERHEYDEN, V.; DEVOGELAERE, B.; MISSIAEN, L.; DE SMEDT, H.; BULTYNCK, G.; PARYS, J. B. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1793, n. 959–970, 2009.
- WADA, R.; SUTO, Y.; KANAI, M.; SHIBASAKI, M. Dramatic switching of protein kinase C agonist/antagonist activity by modifying the 12-ester side chain of phorbol esters. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 124, n. 36, p. 10658-10659, 2002.
- WALLNER, B. P.; MATTALIANO, R. J.; HESSION, C.; CATE, R. L.; TIZARD, R.; SINCLAIR, L. K.; FOELLER, C.; CHOW, E. P.; BROWNING, J. L.; RAMACHANDRAN, K. L.; PEPINSKY, R. B. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. **Nature**, London, v. 320, p. 77-81, 1986.
- WANG, M.; CHU, H.; ZHANG, Z.; WEI, Q. Molecular epidemiology of DNA repair gene polymorphisms and head and neck cancer. **The Journal of Biomedical Research**, Nanjing v. 27, n. 3, p. 179-192, may. 2013.
- WEAVER, Z. A.; KANE, C. M. Genomic Characterization of a Testis-Specific TFIIIS (TCEA2) Gene. **Genomics**, San Diego, v. 46 (3), p. 516–519, 1997.
- WIND, M.; REINES, D. Transcription elongation factor SII. **BioEssays**, Cambridge, v. 22, p. 327-336, 2000.
- WOJCIKIEWICZ, R. J. H.; TOBIN, A. B.; NAHORSKI, S. R. Muscarinic receptor-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in SH-SY5Y neuroblastoma cells is regulated acutely by cytosolic Ca²⁺ and by rapid desensitisation. **Journal of Neurochemistry**, New York, v.63, p. 177-185, 1994.
- YADAV, R.; SRIVASTAVA, V. K.; CHANDRA, R.; SINGH, A. Larvicidal activity of látex and stem bark of *Euphorbia tirucalli* plant on the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **The Journal of Communicable Diseases**, Índia, v. 34, n. 4, p. 264-269, 2002.
- YAN, J.; KHANNA, K. K.; LAVIN, M. F. Induction of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor genes by ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 69, n. 5, p. 539-546, may. 1996.
- ZHANG, Z.; HUANG, L.; ZHAO, W.; RIGAS, B. Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vivo and in vitro. **Cancer Research**, Chicago, v. 70, p. 2379-2388, 2010.

8. ANEXO

Analysis of gene expression in response to treatment with the extract AM10 of *Euphorbia tirucalli* (Aveloz) in the larynx squamous cell carcinoma

¹Gabriela Bueno Franco, ¹Janesly Prates, ¹Laila Toniol Cardin, ²Anemari Ramos Dinarte dos Santos, ²Wilson Araújo da Silva Junior, ³Bianca Rodrigues da Cunha, ³Eloiza Helena Tajara da Silva, ¹Sonia Maria Oliani, ⁴Flávia Cristina Rodrigues-Lisoni

¹Department of Biology, Institute of Biosciences, Letters and Science - IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

²Department of Clinical Medical, Foundation Blood Center of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo - FCFRP/USP, Ribeirão Preto, SP.

³Department of Molecular, Biology Faculty of Medicine of São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto, SP.

⁴Department of Biology and Animal Science, Faculty of Engineering of Ilha Solteira - FEIS/UNESP, Ilha Solteira, SP.

Keywords: Aveloz, cell culture, Rapid Subtractive Hybridization (RaSH), gene expression, real time quantitative PCR

Abstract

Background: The larynx squamous cell carcinoma is the most common to hit the head and neck, representing about 25% of malignant tumors that affect this area and 2% of all malignancies. Therapeutic resources used are surgery, chemotherapy and radiation therapies, but are considered highly invasive. Therefore, some plants had been used in the treatment of cancer, in an attempt to soften the damage caused by conventional methods. One of these has attracted scientific interest, the *Euphorbia tirucalli*, known popularly as aveloz. This plant is used in the treatment of asthma, ulcers, warts and has active principles with activities scientifically proven as antimutagenic, anti-inflammatory and anticancer.

Aim: Due of the importance the antitumoral fraction of the latex the *E. tirucalli*, the present study aimed to evaluate the influence of herbal of the larynx squamous cell carcinoma (Hep-2), on the morphology, cell proliferation and gene expression.

Methods: The Hep-2 cells were cultured in complete medium (MEM 10%), and treated in the following concentrations of the aveloz (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) to

evaluate the possible effects of this plant in 1, 3, 5 and 7 days. After statistical analysis of the test cell proliferation, was made a new culture for RNA extraction and realization of the Rapid Subtractive Hybridization technique (RaSH). The genes with altered expression, found in RaSH technique, were analyzed databases Gene Ontology (GO) and Ingenuity Systems© (IPA). The validation of the five differentially expressed genes found was performed by real time quantitative PCR.

Results: The aveloz treatment did not change the cell morphology compared with control samples and decreased the cell growth, with results more statistically significant on day 3 at a concentration of 25 µg/mL. Therefore, these parameters were chosen to continue with the methods. The RaSH approach detected change in expression of some genes, including *ANXA1*, *TCEA1*, *NGFRAP1*, *ITPR1* and *CD55*, which are respectively associated with the inflammatory response, transcriptional regulation, apoptosis, calcium ion transport regulation and complement system. The aveloz down-regulated *ITPR1* gene, validated by real-time quantitative PCR and up-regulated *ANXA1* and *CD55* genes.

Conclusions: The data indicate the involvement of the aveloz in altered expression of genes involved in tumorigenic processes and show a therapeutic indication for larynx squamous cell carcinoma.

Keywords: Aveloz, cell culture, Rapid Subtractive Hybridization (RaSH), gene expression, real time quantitative PCR.

Background

The head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represents malignant tumors that arising primarily in the oral cavity, tongue, floor of the mouth, tonsils, pharynx and larynx. Worldwide HNSCC is the fifth most common cancer and accounts for about 6% among all cancers [1]. These tumor arising from various anatomic structures including the craniofacial bones, soft tissues, salivary glands, skin, and mucosal membranes [2].

In Brazil, the National Cancer Institute (INCA) has proved larynx cancer to be one of the most common to reach the region of the head and neck accounting for approximately 25% of malignant tumors affecting this area and 2% of all malignancies. Recently the INCA released the estimate for the year 2014 predicting 6,870 new cases in men with an estimated risk of 6 cases per 100 thousand men and 770 new cases in women [3].

The main risk factors for larynx squamous cell carcinoma (LSCC) are smoking and alcohol consumption [4]. Family history is another important risk factor for this cancer suggesting that genetic factors may contribute to susceptibility of this disease [5].

Some authors have reported that DNA is constantly damaged by endogenous oxygen free radicals from metabolism and exogenous (both chemical and physical) mutagens. The DNA damage repair process is a crucial mechanism to maintain the stability of genetic materials in mammalian cells. However, if this mechanism fails, unrepaired damage can result in apoptosis or otherwise may lead to mutation fixation, unregulated cell growth, and cancer [6]. The DNA alterations responsible for the onset of carcinogenesis usually occur in genes involved with proteins that regulate cell cycle, cell growth, and differentiation. These are classified as oncogenes and tumor suppressor genes [7]. In HNSCC the oncogenes *H-ras*, *c-myc*, *cyclin D1*, *EGFR* and *TGF- β* are often activated and the tumor suppressor genes such as *TP53*, *p16*, *FHIT*, *PTEN*, *Rb* and *APC* are inactivated [8-10].

Other factors that may contribute to LSCC include diet, oral hygiene, body mass, environmental pollution, certain working conditions associated with industries such as metallurgy and petrochemical, increasing age and infections by human papillomavirus - HPV, particularly types 16 and 18 and Epstein-Barr virus which appear to be associated with the development of more aggressive tumors [9, 11-16].

The treatment for this neoplasm is defined depending on the cell type, degree of differentiation, location, extent, presence of lymph node metastases, and macroscopic characteristics with bone and muscle tumor involvement [17]. Conventional methods used for treatment are surgery, chemotherapy, and radiation therapies, but all these methods are considered highly invasive. Surgery can cause irreversible aesthetic injuries with possible functional alterations [18]. Moreover, some plants have been used in the treatment of cancer as alternative therapies in an attempt to soften the damage caused by conventional methods. The *Euphorbia tirucalli* (Figure 1), popularly known as aveloz, which is used in the herbal treatment of asthma, ulcers, warts and tumors in general has attracted scientific interest (19, 20).



Figure 1: *Euphorbia tirucalli* - aveloz (cultivando.com.br®).

Originating from Africa, *E. tirucalli* was subsequently introduced in other countries. In Brazil it is found in all regions especially north and northeast [21]. *E. tirucalli* has some compounds that have been scientifically proven to have biological activities as antibacterial, antimicrobial, antiviral, antiseptic, larvicidal, molluscicidal, anti-inflammatory, antitumor, antimutagenic, anticancer for breast, lung, cervical, colorectal, esophagus and mouth [19, 22- 29].

An alternative that justifies its antitumorigenic potential is antimutagenicity. Substances with antimutagenic potential increase efficiency of repair mechanisms thereby acting as protective agents that decrease the frequency of DNA damage while controlling the disorderly proliferation of tumor cells [26]. In addition, the presence of ingenanos destabilizes the organization of the microtubules by the inhibitory effect on tubulin polymerization. Thus the low stability of microtubules inhibit the cell cycle mechanisms, and the cells are stopped at the end of stage G, inhibiting cell growth [30].

The anticancer effects of euphol (tetracyclic triterpene alcohol isolated from the latex of *E. tirucalli*) were evaluated in human gastric cancer cells. Euphol inhibited the growth of gastric cancer cells and tumor development, demonstrating that its great value and potential for use in disease therapy [31]. Passos et al. (2013) [32] studied the anti-inflammatory properties euphol and observed that it markedly inhibited TPA-induced inflammatory response (12-O-tetradecanoilphorbol -13-acetato/TPA), demonstrating that it can be used as an alternative therapy in skin diseases.

In order to investigate the effect of aveloz in LSCC, we evaluated the influence

of this herbal medicine on the morphology, cell proliferation and gene expression, identifying the signaling pathways that genes modulated by aveloz participate which are important for tumorigenic and the inflammatory process.

Materials and Methods

Hep-2 Culture conditions

The Hep-2 cell line, originally established from an epidermoid carcinoma of the larynx (ATCC, Rockville, Maryland, USA), was seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75cm² culture flask (Corning, NY, USA) in medium MEM-Earle (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), pH 7.5, supplemented with 10% fetal calf serum (Cultilab), 1% non-essential amino acids, 1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), and cultured at 37°C under 5% of atmosphere CO₂.

Pharmacological treatments

The Hep-2 cells were subdivided into three groups: a) control, without manipulation b) submitted to the addition of vehicle and c) treated with aveloz at concentrations from 0.25 to 250 µg/mL [33]. The experiments were conducted during the periods of 1, 3, 5, and 7 days for determining the statistically significant time to continue the methodology.

Proliferation assay

Hep-2 cells were seeded at a density of 5×10^4 cells in plastic 6-well plates in triplicates and divided in three groups: (a) growth on complete medium - control, (b) submitted to the addition of vehicle and (c) treated with aveloz. Twenty-four hours later, when cells had already adhered, Hep-2 cultures were incubated with serum free medium (MEM 0%). After the 24 hours the control group was maintained with complete medium, without any pharmacological manipulation, the other group was submitted to the addition of vehicle and latter group was treated with aveloz.

Cell morphology was observed every day. The cytotoxic effect of the aveloz with regard to the proliferation of Hep-2 cells were investigated in all experiment groups at 1, 3, 5, and 7 days. The cells were harvested and quantified using the Countess[®] Automated Cell Counter (Invitrogen[®]), using the dyestuff Trypan Blue. The same experiment was repeated twice.

RNA extraction for Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) and real time PCR experiments

The RNA from Hep-2 cells subjected to experimental conditions (control, vehicle and aveloz) was extracted by the method of Trizol.

Hep-2 cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL per 75cm² culture flasks in complete medium (controls), addition of vehicle and treated with aveloz. Hep-2 cells were cultured for 3 days and harvested by addition of TRIZOL Reagent, following treatment with DNase (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by the manufacturer.

Rapid Subtraction Hybridization (RaSH)

RaSH technique [34] was performed with two subtraction, one named “Sub A”, the Hep-2 control cells been tester and the cells treated with aveloz been driver, and in the other one, named “Sub B” the opposite test was performed.

The cell culture was conducted in large culture flaks in two different conditions (control cells, without manipulation and the cells treated with aveloz) for RNA extraction with TRIZOL [35]. Aliquots (10µg) of total RNA from both groups were used for double-stranded complementary DNA (cDNA) synthesis.

The first cDNA strand was obtained by reverse transcriptase with 2 µL of oligo (dT) (50 mM), 2 µL of 10 mM dNTPs, at 65 °C for 5 min, and immediately on ice for 1 min, adding 2.0 µL of 0.1 mM DTT, 1 µL of 40 U/µL RNAout, 4.0 µL of 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCL (pH 8,3), 375 mM KCL, 15 mM MgCL₂]. The material was incubated at 42°C for 2 minutes and added 1.0 µL of Superscript™ II reverse transcriptase (RT) (200 U/µL). The mixture was incubated again at 42 °C for 50 minutes and then at 70 °C for 15 minutes. The cDNA was used in amplification reactions to segments of β-actin, to verify its quality.

For the synthesis of the second strand of cDNA was used in reactions containing 30 µL of 5X Second Strand Buffer, 3 µL of 10 mM dNTPs, 1 µL of DNA ligase (10 U/µL), 4 µL of DNA Pol I (10 U/µL), 1.0 µL of RNase H (2 U/µL) and incubated for 2 hours at 16 °C and after 2 µL of T4 DNA Pol (5 U/µL), continuing the incubation for another 5 minutes. The action of this enzyme was inhibited by the addition of 10 µL of 0.5 M EDTA. Then, purification was performed with phenol: chloroform and resuspension of the pellet in 45 µL of water. The cDNA was used in

amplification reactions for segments GAPDH, and subsequently digested with 2 μL of MboI enzyme (10 U/ μL) and incubated for 1 hour at 37 °C. Then, received over 1 μL of this enzyme and incubated overnight at 37 °C.

To this cDNA was added 4.1 and 4.5 μL , respectively, of the adapters XDPN-14 5'-CTGATCACTCGAGA and XDPN-12 5'-GATCTCTCGAGT (Sigma Chemical, final concentration 10 mM), 8 μL of 5X T4 DNA ligase buffer Invitrogen©, heated at 55°C for 1 min, and cooled down to 14 °C within 1h. The cDNA received 3 μL (9 U) of T4 DNA ligase (3U/ μL), ligation was carried out overnight at 14°C. After phenol/chloroform extraction and ethanol/glycogen precipitation, the mixtures were diluted to 100 μl with TE buffer (10mM Tris/1mM EDTA); 40 μl of the mixtures were used for PCR amplification.

The PCR mixtures were set up using 10 μM XPDN-18 5'-CTGATCACTCGAGAGATC, 0.4 mM dNTPs, 10 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). Thermocycler conditions were one cycle at 72 °C for 5min, followed by 25 cycles of 94°C for 1min, 55°C for 1min, 72°C for 1min, ending in a final extension at 72°C for 3 min. Ten μg of purified PCR product (tester) was digested with 10U/ μL XhoI (Invitrogen) for 6 hours at 37 °C and followed phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.

One-hundred nanograms of the tester cDNA were mixed with 5 μg of the driver cDNA in hybridization solution (0.5M NaCl, 50mM Tris/HCl, SDS2% and 40% formamide) and, after heating at 99,9°C for 5 minutes, incubated at 42°C for 1h, and 42°C for 48h. After extraction and precipitation, the hybridization mixture (1 μg) was ligated with XhoI-digested pZero plasmid and transformed into competent bacteria. Bacterial colonies were picked and used as DNA template for PCR. Clones were sequenced using an automated DNA sequence and homologies sequences were searched using the BLAST program. Gene ontology (GO) annotation was used for the functional classification of up- and down-regulated genes using terms from Gene Ontology database.

We further analyzed the genes through IPA (Ingenuity Systems©) to relate the differentially expressed genes with biological functions and processes in which these genes are involved and evaluate what the main networks of interaction between them.

Quantitative PCR – RT-qPCR

The Hep-2 cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL in each 75cm² culture flasks. The culture was performed for the three groups, the manipulation described previously. Hep-2 cells were cultured for 3 days and harvested by addition of TRIzol Reagent, following treatment with DNase (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by the manufacturer.

Five differentially expressed genes were selected for validation by quantitative real time PCR experiments according to their direct or indirect involvement in tumorigenesis. Their expression was checked in treated samples relative to matched non-treated samples.

The primers were manually designed with: 19-23 bp length, 30-80% GC content and a short amplicon size (80-120 bp). Their sequences are available upon request. Real time PCR was performed in triplicate using a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reaction mixture consisted of a 20ul volume solution containing 100 a 500 ng of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM of each primer and 100 ng cDNA (control, treated with vehicle and 25 µg/mL of aveloz). The PCR conditions were 95°C for 10min followed by 40 cycles of 95° for 15s and 60° for 1min. Melting curve analysis was performed for each gene to check the specificity and identity of the RT-PCR products.

For each primer set, the efficiency of the PCR reaction (linear equation: $y = \text{slope} + \text{intercept}$) was measured in triplicate on serial dilutions of the same cDNA sample. The PCR efficiency (E) was calculated by the formula $E = [10^{(-1/\text{slope})}]$ and ranged from 1.96 to 2.02 in the different assays.

Two control genes (*GAPDH*, *ACTB*) were used as internal standards. The relative expression ratio (fold change) of the target genes was calculated according to Pfaffl (2001) [36]. Statistical analysis was performed by a two-tailed unpaired *t* test using GraphPad prism software.

Results

Cellular morphology

The cellular morphology (Figure 2) is characterized by a monolayer of nucleated cells with cytoplasmic and several nucleoli form on the control group and there was no change after the treatment with aveloz and addition of the vehicle.

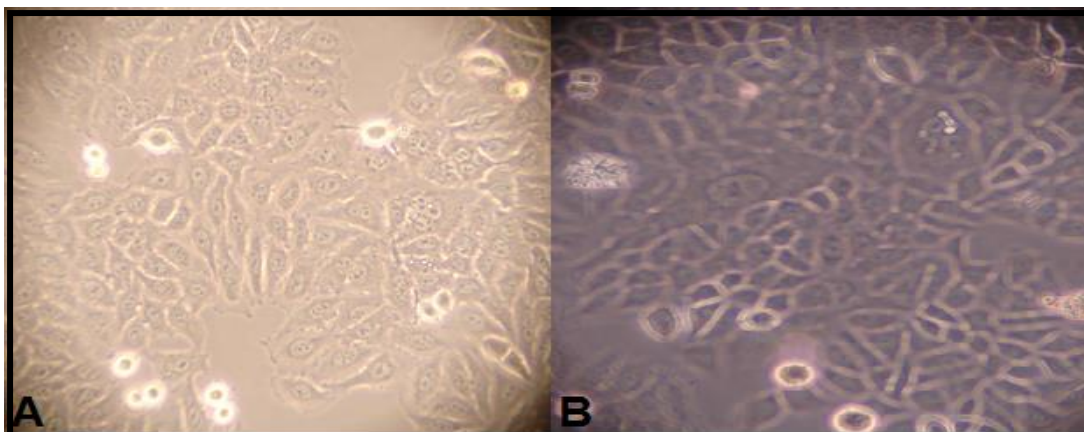


Figure 2: Morphological analysis of cell line Hep-2. The cell morphology observed in the control group (A), characterized by a monolayer of nucleated cells was not altered in the group treated with 25 µg/ml of aveloz for 3 days (B). Hep-2 cells were seeded in complete MEM 10% at a concentration of 5×10^4 per well (6 well plate). Assays were performed in triplicate to confirm the results.

Proliferation Assay

In the proliferation assay (Figure 3), it was possible to observe the growth inhibitory effect by the action of aveloz, using the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software), decreased the proliferation in the cells treated with the aveloz when compared with the control group.

Statistical analysis showed that the concentration of 25 µg/mL and the period of 3 days were the most statistically significant ($P < 0,05$).

We also observed, using the same statistical test, that the addition of vehicle did not exhibit a difference statistically significant compared to control (figure 4), confirming that the reduced growth of Hep2 cells was due to aveloz and not its diluent's (ethanol).

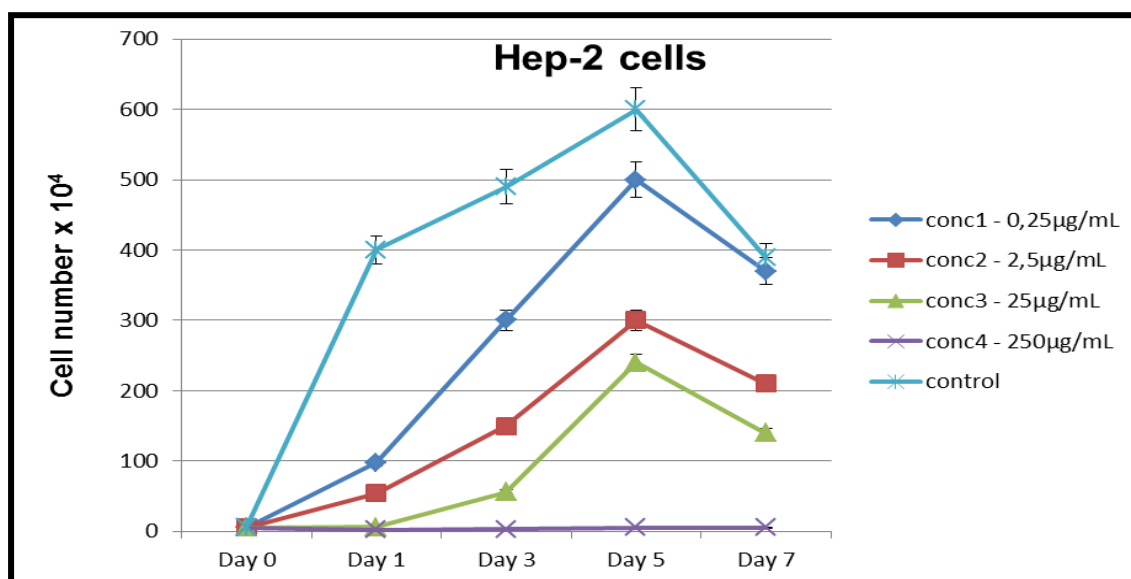


Figure 3: Growth curve of aveloz treatment in Hep-2 cell line. Hep-2 cells were cultured in complete medium, treated with aveloz [0.25, 2.5, 25, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$] for 1, 3, 5 and 7 days. Assays were performed in triplicate. Graph x = time (days) and y = number of cells $\times 10^4$. P values <0.05 were significant.

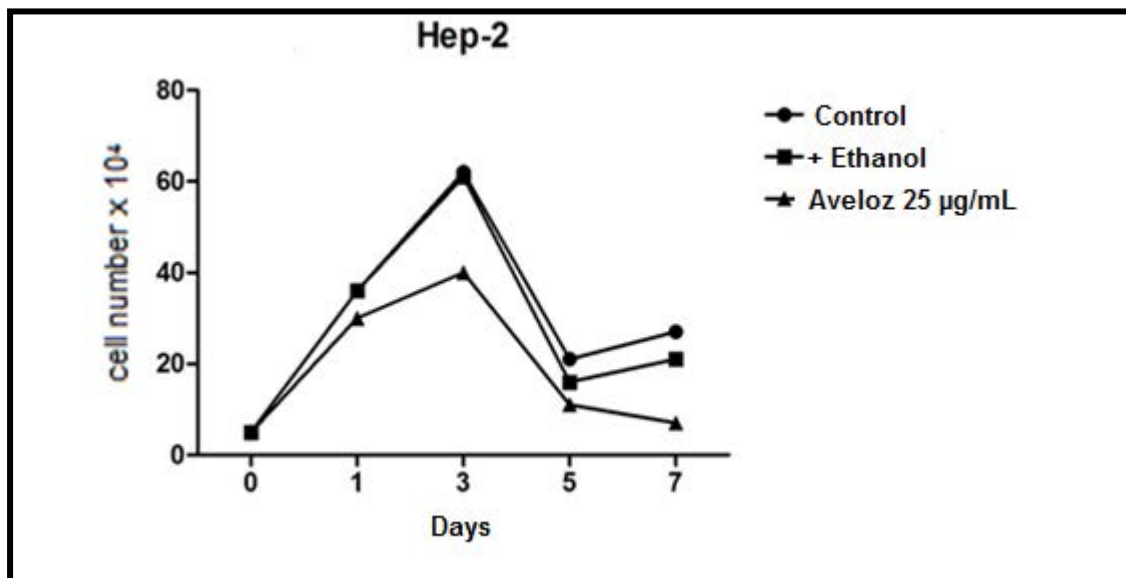


Figure 4: Growth curve of vehicle and aveloz treatment in Hep-2 cell line. Hep-2 cells were cultured in complete medium, treated with aveloz (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and vehicle for 1, 3, 5 and 7 days. Assays were performed in triplicate. Graph x = time (days) and y = number of cells $\times 10^4$. P values <0.05 were significant.

Genes identified using the RaSH approach

The technology compares two distinct experiments aiming to finding different gene expression. Rapid subtractive hybridization (*RaSH*) performed on Hep-2 control cells and treated with aveloz for 3 days brought to the isolation of 85 clones sequenced. By screening these sequences through GenBank (*Blast*) and by rigorous classification and selection, it was identified 19 genes that were differentially expressed.

The research acquired two libraries (Sub A and Sub B) and 19 genes exhibited changes in expression levels in response to aveloz treatment (15 down- and 4 up-regulated). These genes found, according to Gene Ontology (GO), interacting with each other and with genes important in tumorigenic and inflammatory processes are involved in apoptosis, cell proliferation and migration, protein binding, calcium ion transport, molecular function, cell cycle, DNA repair, signal transduction, small molecule metabolic process, complement activation, inflammatory response, ribosome biogenesis, gene expression, transcription and translation (Table 1 and 2).

We further analyzed the 19 differentially expressed genes through IPA

(Ingenuity Systems©). The genes set were especially associated with cancer, cell cycle, apoptosis, cell proliferation, cell cycle, DNA repair, complement activation, inflammatory response in the “Sub A” and, cancer, cell cycle, cellular development, cell proliferation and replication in the “Sub B”.

Five differentially expressed genes (*ITPR1*, *ANXA1*, *TCEA1*, *CD55* and *NGFRAP1*) were selected for validation by quantitative real time PCR experiments according to their functions (Gene Ontology and Ingenuity Systems©) related to calcium ion transport, inflammatory response, DNA repair, complement activation and apoptotic process respectively, and according to their direct or indirect involvement in tumorigenic and inflammatory processes (Table 1 and Figure 6).

Table 1: Five genes selected by Rash in the subtractive library I (Sub A), expressed in the cell line Hep-2 control.

NM	Name	Abbreviation	Chromosomal location	Functions and processes
NM_001099952.2	Homo sapiens inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1	ITPR1	3p26.1	protein binding; calcium ion transmembrane transporter activity; intrinsic apoptotic signaling pathway and signal transduction.
NM_000574.3	Homo sapiens CD55 molecule, decay accelerating factor for complement	CD55	1q32	enzyme inhibitor activity; elevation of cytosolic calcium ion concentration and regulation of complement activation.
NM_206917.1	Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFRSF1) associated protein 1	NGFRAP1	Xq22.2	protein binding; induction of apoptosis.
NM_006756.2	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII), 1	TCEA1	8q11.2	DNA repair; positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter and gene expression.
NM_000700.1	Homo sapiens annexin A1	ANXA1	9q21.13	calcium ion binding; regulation of cell proliferation; inflammatory response; cell surface receptor signaling pathway; negative regulation of apoptotic process.

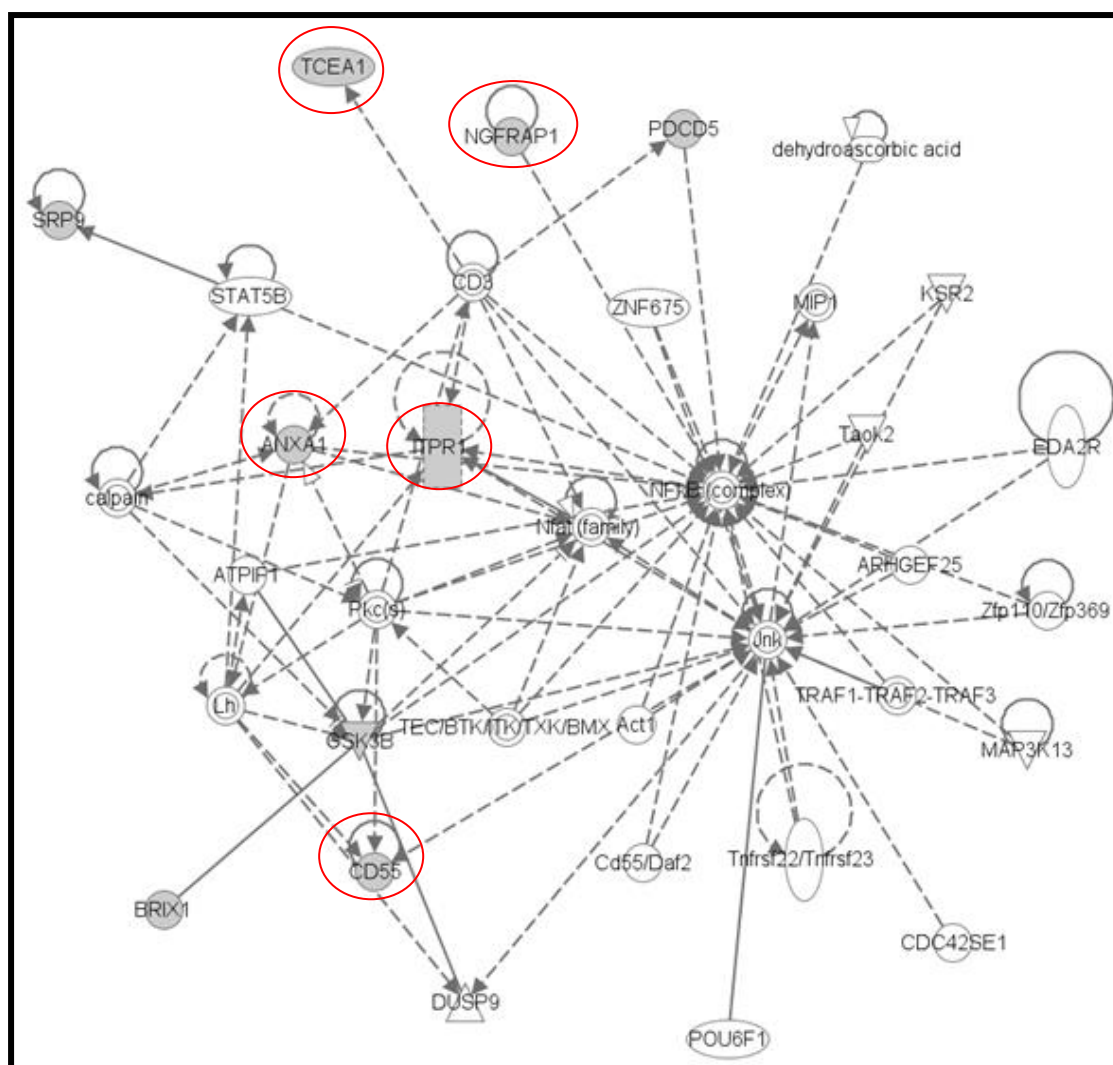


Figure 5: Network of gene interaction NFKB pathway obtained from the subtraction of the control Hep-2 cells (Sub A). Ingenuity Systems © software reveals a network of gene interactions associated with cancer, squamous cell tumor, benign tumor, apoptosis, proliferation, aggregation, morphology, viability, development and cell signaling, cell cycle control, cell membrane fusion, cleavage RNA fragment, protein transport, angiogenesis, activation of the complement system, innate immune response, release and activation of the calcium ion, inflammatory, antimicrobial response, inherited disorders, organ hypoplasia, oral cancer and laryngeal cancer process.

Real-time PCR validation of differentially expressed genes

Five genes displaying down (*ITPR1*) or up-regulation (*ANXA1*, *TCEA1*, *CD55* and *NGFRAP1*) in Hep-2 cells treated with aveloz were selected (Figure 6). The experiment using 25 µg/mL of aveloz confirmed, by real time PCR, the expression data for one down-regulated gene (*ITPR1*), comparatively to control cells. The genes (*ANXA1* and *CD55*), exhibit a statistically significant increase, but it was seen in the RaSH technique that they should be down-regulated after the treatment.

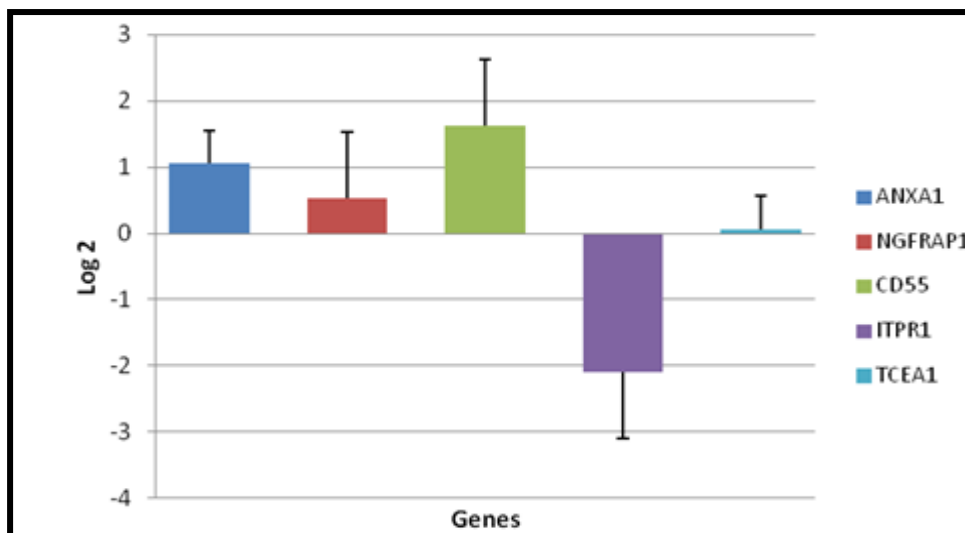


Figure 6: Quantitative Real time PCR gene expression in Hep-2 cells treated with aveloz. Expression of *ITPR1*, *ANXA1*, *TCEA1*, *CD55* and *NGFRAP1* genes in Hep-2 cells treated with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of aveloz, compared with control cells. The data represent the logarithm base 2.

Discussion

The molecule present in the latex of *Euphorbia tirucalli* (aveloz), named extract AM10 molecule was used in our experiments because it inhibits proliferation of tumor-related enzymes, and presents potential anti-inflammatory and analgesic [37].

Due to the importance of its antitumorigenic action, we analyzed the effect of herbal medicine in the cell line of laryngeal squamous cell carcinoma (Hep - 2) and observed that after treatment, cell morphology was not modified. However, it was noted that cell proliferation decreased significantly. Aquino and collaborators' data (2008) [29] corroborate these results, and they also observed that treatment with aveloz in cell line of breast cancer did not alter the morphology of these cells independent on the vehicle. Regarding the reduced proliferation, latex aveloz must act in tumorigenic cells causing cell death and also causing the growth of these cells to be reduced. In vitro it is known that latex works in the cell colonies fighting breast cancer, melanoma, and gastric cancer [31, 38-40].

The aveloz effect was also analyzed in the gene expression by Rapid Subtractive Hybridization technique (RaSH) that isolates differentially expressed genes including new genes and rare transcripts as can be seen in some articles of our group [41, 42] and others who use this technology [43, 44]. It is possible to generate significant genomic libraries assisting in the search for genes differentially expressed in treated or not with herbal cell lines faster and less costly than other alternative hybridization techniques [34].

The results showed changes in the expression of some genes in the cells of LSCC after treatment with aveloz, including *ANXA1*, *TCEA1*, *NGFRAP1*, *ITPR1* and *CD55* genes of which only the *ITPR1* showed a significant reduction in the expression validated by quantitative real-time PCR. These genes belong to the same gene signaling network related by software Ingenuity Systems © (IPA), correlating the tumorigenic and inflammatory processes. Liang et al. (2013) [45] used the software IngenuityPathway (IPA) to identify the biological activities of the genes that distinguish Chinese medicinal herbal between its thermal properties, hot (warm effects, disperse cold) or cold (cooling effect, removes heat). Demonstrated that the main biological gene networks herbs with hot properties include inflammation and the immunity regulation and the genes of the herbs with cold properties affect the cell growth, proliferation and development.

The selection of the validated *ITPR1* gene (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1) can contribute significantly to the understanding of processes including cancer of the larynx since it has functions related to tumorigenesis of cells squamous, cell proliferation, apoptosis and activation and release of calcium ion. [46-48].

These receptor has several isoforms and stimulation the inositol 1,4,5 - triphosphate (IP3) to mediate the release of calcium from the endoplasmic reticulum and secretory vesicles [46]. The main modulators of calcium concentration these receptors have been intensively studied in a variety of cellular processes controlled by calcium including cell proliferation. The findings are important for the development of tumor apoptosis, metabolism, secretion, muscle contraction, and smooth fertilization, and neural signals [49-51]. Induction of these receptors may play a role in signal transduction and therefore is important for the treatment of cancer by radiation [52].

We observed reduced *ITPR1* gene expression in Hep -2 cells after treatment with aveloz. Khan et al. (2006) [53] also showed low expression of these receptors on cancer cells, they can provide a mechanism to restrict the action of the enzyme Akt kinase by activating apoptosis and by decreasing cancer cell growth since these receptors are substrates for the action of this enzyme which plays a key role in suppressing apoptosis.

On the other hand, some studies have found overexpression of *ITPR1* gene which induced the increased level of cytosolic calcium activating cellular apoptosis

[54].

According to our tests, we can infer that the aveloz decreases the expression of *ITPR1* gene by restricting the action of the enzyme Akt kinase while activating apoptosis and decreasing cell growth of LSCC.

The differentially expressed gene found and valid by quantitative real-time PCR is important in the cascade of inflammatory and tumorigenic processes which can be modified by its possible interaction with aveloz expression. This can have a modulating action on the regulation of gene expression in LSCC.

Conclusions

The data provide new evidence that the *E. tirucalli* alter expression of genes that are involved in signaling cascades in tumorigenic and inflammatory processes altering proliferation and gene expression in Hep-2 cells. Thus our results opening new possibilities for the applications of the aveloz as a therapeutically alternative in LSCC.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (Grants 2012/07853-6).

References

1. ISLAMI, F.; FEDIRKO, V.; TRAMACERE, I.; BAGNARDI, V.; JENAB, M.; SCOTTI, L.; ROTA, M.; CORRAO, G.; GARAVELLO, W.; SCHUZ, J.; STRAIF, K.; NEGRI, E.; BOFFETTA, P.; LA VECCHIA, C. Alcohol drinking and esophageal squamous cell carcinoma with focus on light-drinkers and never-smokers—a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 129, p. 2473–2484, 2011.
2. PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annual Reviews Pathology**, Palo Alto, v. 4, p. 49-70, 2009.
3. INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Secretaria de Atenção à Saúde; Instituto Nacional do Câncer, 2013.
4. HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; CHUANG, S.; BOCCIA, S.; CASTELLSAGUE, X.; CHEN, C.; CURADO, M. P.; MASO, L. D.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WÜNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KELSEY, K.; KOIFMAN, S.; VECCHIA, C. L.; LAZARUS, P.; LEVI, F.; LENCE, J. J.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MCCLEAN, M. D.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; PURDUE, M.; RUDNAI, P.; SCHWARTZ, S. M.; SMITH, E.;

- STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; SHANGINA, O.; PILARSKA, A.; ZHANG, Z.; FERRO, G.; BERTHILLER, J.; BOFFETTA, P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 541-550, Feb. 2009.
5. NEGRI, E.; BOFFETTA, P.; BERTHILLER, J.; CASTELLSAGUE, X.; CURADO, M. P.; DAL MASO, L.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WUNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KOIFMAN, S.; LAZARUS, P.; LENCE, J. J.; LEVI, F.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; RUDNAI, P.; SHANGINA, O.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; ZARIDZE, D.; LISSOWSKA, J.; ZHANG, Z.; FERRO, G.; BRENNAN, P.; VECCHIA, C. L.; HASHIBE, M. Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 124, p. 394-401, 2009.
 6. WANG, M.; CHU, H.; ZHANG, Z.; WEI, Q. Molecular epidemiology of DNA repair gene polymorphisms and head and neck cancer. **The Journal of Biomedical Research**, Nanjing v. 27, n. 3, p. 179-192, may. 2013.
 7. JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. Genética do Câncer - **In Genética Médica**, 2ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 197-212, 2000.
 8. LOTHAIRE P, DE AZAMBUJA E, DEQUANTER D, LALAMI Y, SOTIRIOU C, ANDRY G.; CASTRO JR, G.; AWADA, A. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. **Molecular Markers in Head and Neck Cancer**, New York, v. 28, n. 3, p. 256-269, Mar. 2006.
 9. CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 87, n. 1, p. 14-32, Jan. 2008.
 10. DASGUPTA, S.; DASH, R.; DAS, S. K.; SARKAR, D.; FISHER, P. B. Emerging strategies for the early detection and prevention of head and neck squamous cell cancer. **Journal of cellular physiology**, Philadelphia, v. 227, n. 2, p. 467-73, 2012.
 11. PAVIA, M.; PILEGGI, C.; NOBILE, C. G.; ANGELILLO, I. F. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. **The America Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 83, n. 5, p. 1126-34, 2006.
 12. GUHA, N.; BOFFETTA, P.; WÜNSCH FILHO, V. W. N.; NETO, J. E.; SHANGINA, O.; ZARIDZE, D.; CURADO, M. P.; KOIFMAN, S.; MATOS, E.; MENEZES, A.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; FERNANDEZ, L.; MATES, D.; DAUDT, A. W.; LISSOWSKA, J.; DIKSHIT, R.; BRENNAN, P. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 166, n. 10, p. 1159-73, 2007.
 13. GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E.; XIAO, W.; BEGUM, S.; VISCIDI, R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative

- head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 100, n. 6, p. 407-20, Mar. 2008.
14. MARCU, L. G.; YEOH, E. A review of risk factors and genetic alterations in head and neck carcinogenesis and implications for current and future approaches to treatment. **Journal Cancer Research of Clinical Oncology**, Berlin, v. 135, n. 10, p. 1303-14, 2009.
 15. LASSIG, A. A.; LINDGREN, B. R.; FERNANDES, P.; COOPER, S.; ARDESHIPOUR, F.; SCHOTZKO, C.; YUEH, B. The effect of young age on outcomes in head and neck cancer. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 123, n. 8, p.1896-90231, may. 2013.
 16. PLATEK, M. E, MYRICK E, MCCLOSKEY SA, GUPTA V, REID ME, WILDING GE, COHAN D, ARSHAD H, RIGUAL NR, HICKS WL JR, SULLIVAN M, WARREN GW, SINGH AK. Pretreatment weight status and weight loss among head and neck cancer patients receiving definitive concurrent chemoradiation therapy: implications for nutrition integrated treatment pathways. **Supportive Care in Cancer**, Berlin, 7 jun. 2013.
 17. HASHIBE, M.; BOFFETTA, P.; ZARIDZE, D.; SHANGINA, O.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; MATES, D.; FABIÁNOVÁ, E.; RUDNAI, P.; BRENNAN, P. Contribution of Tobacco and Alcohol to the High Rates of Squamous Cell Carcinoma of the Supraglottis and Glottis in Central Europe. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.165, n.7, p.814-820, apr. 2007.
 18. FRANZI, S. A.; SILVA, P. G. Avaliação da qualidade de vida em pacientes submetidos à quimioterapia ambulatorial no Hospital Heliópolis. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 3, p. 153-158, 2003.
 19. BETANCUR-GALVIS, L. A.; MORALES, G. E.; FORERO, J. E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 541-546, 2002.
 20. MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; DE AMORIM, E. L. C.; DO NASCIMENTO, S. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, p. 1-14, Jan. 2011.
 21. CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1994. p. 63.
 22. JURBERG, P.; CABRAL NETO, J. B.; SCHALL, V. T. Molluscicide activity of the "avelós" plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 4, p. 423-7, Oct.-Dec. 1985.
 23. LIRIO, L. G.; HERMANO, M. L.; FONTANILLA, M. Q. Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 36, p. 357-359, 1998.
 24. YADAV, R.; SRIVASTAVA, V. K.; CHANDRA, R.; SINGH, A. Larvicidal activity of látex and stem bark of *Euphorbia tirucalli* plant on the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **The Journal of Communicable Diseases**, Índia, v. 34, n. 4, p. 264-269, 2002.
 25. MADUREIRA, A. M.; FERREIRA, M. J.; GYÉMÁNT, N.; UGOCSAI, K.; ASCENSO, J. R.; ABREU, P. M.; HOHMANN, J.; MOLNÁR, J. Rearranged jatrophone-type diterpenes from euphorbia species. Evaluation of their effects

- on the reversal of multidrug resistance. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n.1, p. 45-49, 2004.
26. REZENDE, J. R. R.; RODRIGUES, S. B.; JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; DA ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 481-484, 2004.
27. TIWARI, S.; SINGH, A. Alterations in carbohydrates and the protein metabolism of the harmful freshwater vector snail *Lymnaea acuminata* induced by the *Euphorbia tirucalli* latex extract. **Environmental Research**, San Diego, v. 99, p. 378-386, 2005.
28. VALADARES, M. C.; CARRUCHA, S. G.; ACCORSI, W.; QUEIROZ, M. L. S. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 294-299, feb. 2006.
29. AQUINO, C. L.; BARBOSA, G. M.; BARBOSA, G. M.; VARRICCHIO, M. C. B. A.; VEIGA, V. F.; KUSTER, R.; ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M.; HOLANDINO, C. High dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. (aveloz) modify the viability and glycolytic metabolism of cell lines. **International Journal of High Dilution Research**, Guaratinguetá, v. 7, n. 24, p. 132-139, 2008.
30. KHALEGHIAN, A.; RIAZI, G. H.; GHAFARI, M.; REZAIE, M.; TAKAHASHI, A.; NAKAYA, Y.; NAZARI, H. Effect of inganen anticancer properties on microtubule organization. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, Karachi, v. 23, n. 3, p. 273-278, Jul. 2010.
31. LIN, MING-WEI; LIN, AN-SHEN.; WU, DENG-CHYANG.; WANG, S. S. W.; CHANG, FANG-RONG.; WUD, YANG-CHANG.; HUANG, YAW-BIN. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. 4333-4339, 2012.
32. PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; MARCON, R.; NASCIMENTO, A. F.; CALIXTO, J. B.; PIANOWSKI, L. F. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 698, n. 1-3, p. 413-420, 5 jan. 2013.
33. PIANOWSKI, L. F.; CHAVES, C. P.; CALIXTO, J. B. Active fraction of a polar solvent extract from the latex of *Euphorbiaceae* plants. **Patent Application Publication**. Pub. No.: US 2009/0142421 A1, 4 jun. 2009.
34. JIANG, H.; KANG, D. C.; ALEXANDRE, D.; FISHER, P. B. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 23, p. 12684-12689, Nov., 2000.
35. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
36. PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v. 9, n. 29, p. 2002-2007, 2001.
37. PIANOWSKI, L. F. Testes indicam que o aveloz combate vários tipos de cânceres. Fundação de Apoio à Pesquisa do Piauí. **Revista Sapiência**, Teresina, n. 23, ano. VI, p. 4-9 mar. 2010.

38. AMIRGHOFAN, Z.; BAHMANI, M.; AZADMEHR, A.; JAVIDNIA, K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v.132, n.7, p. 427-432, Jul. 2006.
39. CASEIRO, B. M.; FERREIRA, E. P.; GRILLO, J. G. B.; ARAÚJO, J. H. B. DE. Estudo do potencial de cura de formas de câncer utilizando Aveloz (*Euphorbia Tirucalli*). In: Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar MICTI, 1, 2006, Comburui. **Anais I da Mostra de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar**, Comburui: UFSC, 2006.
40. KUO, P. L.; CHO, C. Y.; HSU, Y. L.; LIN, T. C.; LIN, C. C. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 213, n. 1, p. 37-45, Mai. 2006.
41. RODRIGUES-LISONI, F. C.; MEHEMETA, D. K.; PEITL JR, P.; JOHNA, C. D.; TAJARA, E.; BUCKINGHAMA, J. C.; SOLITO, A. E. In vitro and in vivo studies on CCR10 regulation by Annexin A1. **FEBS Letters**, Amsterdam, n. 5, v. 580, p. 1431-1438, Feb. 2006.
42. RODRIGUES-LISONI, F. C.; PEITL JR, P.; VIDOTTO, A.; M POLACHINI, G.; MANIGLIA, J. V.; CARMONA-RAPHE, J.; CUNHA, B. R.; HENRIQUE, T.; SOUZA, C. F.; TEIXEIRA, R. A. P.; FUKUYAMA, E. E.; MICHALUART JR, P.; DE CARVALHO, M. B.; OLIANI, S. M.; GENCAPO, H. N. G. P.; TAJARA, E. H. Genomics and proteomics approaches to the study of cancer-stroma interactions. **BMC Medical Genomics**, Chichester, v. 3, p. 14, may. 2010.
43. CALMON, M. F.; RODRIGUES, R. V.; KANETO, C. M.; MOURA, R. P.; SILVA, S. D.; MOTA, L. D.; PINHEIRO, D. G.; TORRES, C.; DE CARVALHO, A. F.; CURY, P. M.; NUNES, F. D.; NISHIMOTO, I. N.; SOARES, F. A.; DA SILVA, A. M.; KOWALSKI, L. P.; BRENTANI, H.; ZANELLI, C. F.; SILVA, W. A. JR.; RAHAL, P.; TAJARA, E. H.; CARRARO, D. M.; CAMARGO, A. A.; VALENTINI, S. R. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia**, New York, v. 11, n. 12, p. 1329-1339, Dec. 2009.
44. MEOLA, J.; ROSA E SILVA, J. C.; DENTILLO, D. B.; DA SILVA, W. A. JR.; VEIGA-CASTELLI, L. C.; BERNARDES, L. A.; FERRIANI, R. A.; DE PAZ, C. C.; GIULIATTI, S.; MARTELLI, L. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 93, n. 6, p. 1750-1773, Apr. 2010.
45. LIANG, F.; LI, L.; WANG, M.; NIU, X.; ZHAN, J.; HE, X.; YU, C.; JIANG, M.; LU, A. Molecular network and chemical fragment-based characteristics of medicinal herbs with cold and hot properties from Chinese medicine. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 148, n. 3, p. 770-779, jul. 2013.
46. WOJCIKIEWICZ, R. J. H.; TOBIN, A. B.; NAHORSKI, S. R. Muscarinic receptor-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in SH-SY5Y neuroblastoma cells is regulated acutely by cytosolic Ca²⁺ and by rapid desensitisation. **Journal of Neurochemistry**, New York, v.63, p. 177-185, 1994.
47. SOGHOIAN, D.; JAYARAMAN, V.; SILANE, M.; BERENSTEIN, A.; JAYARAMAN, T. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation in breast cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, Tokyo, Japan, v. 26, n. 4, p. 207-212, jul-aug. 2005.

-
48. LENCESOVA, L.; HUDECOVA, S.; CSADEROVA, L.; MARKOVA, J.; SOLTYSOVA, A.; PASTOREK, M.; SEDLAK, J.; WOOD, M. E.; WHITEMAN, M.; ONDRIAS, K.; KRIZANOVA, O. Sulphide signalling potentiates apoptosis through the up-regulation of IP3 receptor types 1 and 2. **Acta physiologica**, Oxford, England, v. 208, n. 4, p. 350-361, aug. 2013.
 49. BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, p. 315-325, 1993.
 50. DEMAUREX, N.; DISTELHORST, C. Apoptosis - the Calcium Connection. **Science**, New York, v. 300, n. 5616, p. 65-67, 2003.
 51. VANDERHEYDEN, V.; DEVOGELAERE, B.; MISSIAEN, L.; DE SMEDT, H.; BULTYNCK, G.; PARYS, J. B. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1793, n. 959-970, 2009.
 52. YAN, J.; KHANNA, K. K.; LAVIN, M. F. Induction of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor genes by ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 69, n. 5, p. 539-546, may. 1996.
 53. KHAN, M. T.; WAGNER II. L.; YULE, D I.; BHANUMATHY, C.; JOSEPH, S. K. Akt Kinase Phosphorylation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. **The journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 6, p. 3731-3737, Feb. 2006.
 54. SZALAI, G.; KRISHNAMURTHY, R.; HAJNÓCZKY, G. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6349-6361, 1999.