

Tassiana Souza De Araújo

Avaliação dos efeitos da asparaginase e do fungo
Aspergillus terreus em linhagens celulares de carcinoma de
cabeça e pescoço

Brasília
2017

Tassiana Souza De Araújo

Avaliação dos efeitos da asparaginase e do fungo
Aspergillus terreus em linhagens celulares de carcinoma de
cabeça e pescoço

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Odontologia da Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para a conclusão do curso
de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Neves da Silva
Guerra

Brasília
2017

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus mentores que me guiam e me auxiliam nessa jornada.

Aos meus pais, Ivan e Tânia, que nunca mediram esforços para minha educação e construção de caráter. Ao meu irmão Ubiratan, por ser um exemplo de bondade e força de vontade.

Aos meus tios, Penha e Eraldo, e minhas primas, Érica e Poly, que me acolheram sempre que precisei.

Aos técnicos, mestrandos, doutorandos e agregados do Laboratório de Histopatologia Bucal pelo ensinamento e incentivo diário.

Aos doutorandos Claudio, Ana E., Cinthia e às doutoras Carol e Bruna que tanto contribuíram com meus experimentos no laboratório.

À Silvinha que me acolheu com carinho desde o meu primeiro contato com a pesquisa científica.

Ao Gabriel pela paciência e atenção durante esses anos no laboratório. Por me ensinar e me acompanhar em todos os experimentos, motivando e me tranquilizando em cada passo.

Às minhas duplas de clínica, Jéssica e Marina, que ajudaram a aliviar minha tensão na clínica e em outros projetos, e que contribuíram diretamente na minha construção profissional.

À turma 62, minha turma de origem, que fez a minha chegada em Brasília ser mais leve e descontraída. Aos meus colegas dessa turma que continuaram a contribuir diretamente com minha jornada acadêmica, Tiaguim, Andréia Maria, Lari, Tai, Helora e

Lelê.

À turma 65, que me acolheu e me impressionou com o amor e dedicação pela odontologia. À Lu Cunha, Nath, Ti e Nina, pessoas de ouro que sempre vibraram positivamente comigo.

Ao programa Ciências sem Fronteiras, que realizou o meu sonho de estudar fora do país. Aos meus amigos que passaram essa experiência comigo, Daniel, Paula, Giu, Cami Silva, Cami Lins, Lucas, João e Arthur.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro que colaborou para a construção dos meus projetos de Iniciação Científica.

À Secretaria de Desenvolvimento Social da UnB que possibilitou minha permanência nessa Instituição.

À Professora Eliete por ser um exemplo de simplicidade e determinação. Por me acolher, orientar e advertir desde o início da minha vida acadêmica, contribuindo para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Por ser um exemplo de pesquisadora e por saber cativar e incentivar todos a sua volta.

EPIGRAFE

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

RESUMO

DE ARAÚJO, Tassiana Souza. Avaliação dos efeitos da asparaginase e do fungo *Aspergillus terreus* em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Objetivos: O câncer de cabeça e pescoço é o décimo mais frequente mundialmente. O fungo *Aspergillus terreus* é encontrado no solo do Cerrado e produtor da asparaginase, enzima chave para o tratamento de alguns tipos de câncer. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato de *A. terreus* e da asparaginase em linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço.

Métodos: O ensaio da atividade mitocondrial (MTT) foi realizado para verificar a citotoxicidade celular do extrato aquoso do fungo e da asparaginase nas linhagens HaCaT (queratinócitos humano), FaDu (carcinoma de hipofaringe) e SCC-9 (carcinoma de língua). Foi realizado o tratamento com o extrato aquoso do fungo nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 µg/mL, e com a asparaginase nas concentrações de 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL. Assim, obteve-se a curva dose-resposta e valores de IC₅₀. O western blot foi realizado para avaliar o efeito dos tratamentos na indução de morte celular por apoptose através da expressão da proteína caspase-3 na linhagem SCC-9.

Resultados: O extrato apresentou efeito citotóxico nas altas concentrações em FaDu com 72 horas de tratamento e em HaCaT e SCC-9 com 48 e 72 horas. No tratamento com asparaginase, houve citotoxicidade significativa em SCC-9 em 24, 48 e 72 horas e em HaCaT com 48 e 72 horas. O western blot mostrou diminuição da expressão de pró-caspase-3 em

SCC-9.

Conclusão: Conclui-se que o tratamento com o *A. terreus* e a asparaginase foram citotóxicos em determinadas condições de tempo e concentrações. Observou-se também possível indução de apoptose na linhagem SCC-9 após o tratamento com a asparaginase.

ABSTRACT

DE ARAÚJO, Tassiana Souza. Effects of asparaginase and *Aspergillus terreus* in head and neck cancer cell lines. 2017. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Objectives: Head and neck cancers are the tenth most common worldwide. *Aspergillus terreus* is a fungus found on Cerrado soil and produces asparaginase, an enzyme which is fundamental to the treatment of some types of cancers. The purpose of this study was to evaluate the effects of that fungus and this enzyme in head and neck cancer cell lines.

Materials and methods: The MTT cell viability assay was performed in order to evaluate the cytotoxicity of asparaginase and *A. terreus* aqueous extract in a human keratinocyte (HaCaT), a hypopharyngeal carcinoma (FaDu) and a tongue squamous cell carcinoma (SCC-9) cell lines. The treatment was performed with aqueous extract fungus in a concentration of 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 µg/mL, and asparaginase with 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL. Thus, the dose-response curves and IC₅₀ values were obtained. Western Blot was performed to evaluate the effect of these treatments on cell death via apoptosis through the expression of pro-caspase-3 protein on SCC-9.

Results: High concentrations of the extract were cytotoxic in FaDu after 72 hours and in HaCaT and SCC-9 after 24, 48 e 72 hours. Asparaginase resulted in a significant toxicity in SCC-9 after 24, 48 and 72 hours and HaCaT after 48 and 72 hours. Results for western blot showed a decrease in pro-caspase-3 in SCC-9 cells treated with asparaginase.

Conclusion: Based on these results, the treatments with *A. terreus* and asparaginase were cytotoxic for the head and neck

cancer cell lines on determined conditions of time and concentrations. Also, this study suggests apoptosis in SCC-9 after treatment with asparaginase.

SUMÁRIO

Artigo Científico.....	17
Folha de Título.....	19
Resumo.....	21
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Materiais e Métodos.....	27
Resultados.....	31
Discussão.....	42
Referências.....	49
Anexos.....	55
Normas da revista.....	55

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

DE ARAÚJO, Tassiana Souza

Avaliação dos efeitos da asparaginase e do fungo *Aspergillus terreus* em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço.

Apresentado sob as normas de publicação da Revista Oral Oncology

FOLHA DE TÍTULO

Avaliação dos efeitos da asparaginase e do fungo *Aspergillus terreus* em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço

Effects of asparaginase and *Aspergillus terreus* fungus in head and neck cancer cell lines

Tassiana Souza De Araújo¹

Gabriel Álvares Borges²

Silvia Taveira Elias³

Paula Monteiro de Souza³

Pérola de Oliveira Magalhães⁴

Eliete Neves da Silva Guerra⁵

¹ Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Mestre em Ciência das Saúde da Universidade de Brasília (UnB).

³ Doutora em Ciência das Saúde da Universidade de Brasília (UnB).

⁴ Professora Adjunta de Farmácia da Universidade de Brasília.

⁵ Professora Adjunta do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Correspondência: Prof. Dr. Eliete Neves da Silva Guerra
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF
E-mail: elieteneves@unb.br / Telefone: (61) 330725

RESUMO

Avaliação dos efeitos da asparaginase e do fungo *Aspergillus terreus* em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço

Resumo

Objetivos: O câncer de cabeça e pescoço é o sexto tipo mais frequente mundialmente. O fungo *Aspergillus terreus* é encontrado no solo do Cerrado e produtor da asparaginase, enzima chave para o tratamento de alguns tipos de câncer. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do extrato de *A. terreus* e da asparaginase em linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço.

Métodos: O ensaio da atividade mitocondrial (MTT) foi realizado para verificar a citotoxicidade celular do extrato aquoso do fungo e da asparaginase nas linhagens HaCaT (queratinócitos humano), FaDu (carcinoma de hipofaringe) e SCC-9 (carcinoma de língua). Foi realizado o tratamento com o extrato aquoso do fungo nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 µg/mL, e com a asparaginase nas concentrações de 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL. Assim, obteve-se a curva dose-resposta e valores de IC₅₀. O western blot foi realizado para avaliar o efeito dos tratamentos na indução de morte celular por apoptose através da atividade da proteína caspase-3 na linhagem SCC-9.

Resultados: O extrato apresentou efeito citotóxico nas altas concentrações em FaDu com 72 horas de tratamento e em HaCaT e SCC-9 com 48 e 72 horas. No tratamento com asparaginase, houve citotoxicidade significativa em SCC-9 em 24, 48 e 72 horas e em HaCaT com 48 e 72 horas. O western blot mostrou diminuição da expressão de pró-caspase-3 em SCC-9.

Conclusão: Conclui-se que o tratamento com o *A. terreus* e a

asparaginase foram citotóxicos em determinadas condições de tempo e concentrações. Observou-se também possível indução de apoptose na linhagem SCC-9 após o tratamento com a asparaginase.

Palavras-chave

Câncer de cabeça e pescoço; asparaginase; *aspergillus terreus*; citotoxicidade; caspase.

Relevância Clínica

Apesar das diferentes formas de tratamento do câncer de cabeça e pescoço, a taxa de mortalidade é considerada alta, e pesar das diferentes formas de tratamento, a taxa de mortalidade é considerada alta e para a maioria dos países, a taxa de sobrevida global em 5 anos é de aproximadamente 50% a 60% dos casos. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas terapias que sejam mais efetivas para seu tratamento e menos invasivas ao paciente.

Abstract

Effects of asparaginase and *Aspergillus terreus* fungus in head and neck cancer cell lines

Objectives: Head and neck cancers are the sixth most common worldwide. *Aspergillus terreus* is a fungus found on Cerrado soil and produces asparaginase, an enzyme which is fundamental to the treatment of some types of cancers. The purpose of this study was to evaluate the effects of that fungus and this enzyme in head and neck cancer cell lines.

Materials and methods: The MTT cell viability assay was performed in order to evaluate the cytotoxicity of asparaginase and *A. terreus* aqueous extract in a human keratinocyte (HaCaT), a hypopharyngeal carcinoma (FaDu) and a tongue squamous cell carcinoma (SCC-9) cell lines. The treatment was performed with aqueous extract fungus in a concentration of 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 µg/mL, and asparaginase with 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL. Thus, the dose-response curves and IC₅₀ values were obtained. Western Blot was performed to evaluate the effect of these treatments on cell death via apoptosis through the expression of pro-caspase-3 protein on SCC-9.

Results: High concentrations of the extract were cytotoxic in FaDu after 72 hours and in HaCaT and SCC-9 after 24, 48 e 72 hours. Asparaginase resulted in a significant toxicity in SCC-9 after 24, 48 and 72 hours and HaCaT after 48 and 72 hours. Results for western blot showed a decrease in pro-caspase-3 in SCC-9 cells treated with asparaginase.

Conclusion: Based on these results, the treatments with *A. terreus* and asparaginase were cytotoxic for the head and neck cancer cell lines on determined conditions of time and concentrations. Also, this study suggests apoptosis in SCC-9 after treatment with asparaginase.

Keywords: Head and neck cancer; asparaginase; *aspergillus terreus*; cytotoxicity; caspase

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço é o décimo tipo mais frequente mundialmente, e acomete o lábio, a cavidade oral, a laringe, a faringe e a nasofaringe [1]. Sua incidência é maior em países do sul e sudeste da Ásia, América do Sul e parte da Europa [2-3]. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Brasil, em 2016 foram estimados 22.840 novos casos de carcinoma na cavidade oral e laringe para ambos os sexos [4]. O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECCP), o tipo mais comum [5], tem como principal etiologia o tabaco e o consumo de bebidas alcoólicas, sendo que a combinação de ambos pode potencializar o risco da doença [5-6]. A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) também é descrita como um fator etiológico para o CECCP, especialmente em orofaringe [6-7].

O tratamento consiste na combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, dependendo do estágio do câncer [2]. A cirurgia é a principal forma de tratamento, e dependendo desse estágio os pacientes podem sofrer com as consequências, tais como dificuldade para a alimentação e a comunicação, além do comprometimento funcional e estético consequente da mutilação facial [2-8]. Apesar das diferentes formas de tratamento, a taxa de mortalidade é considerada alta e para a maioria dos países, a taxa de sobrevida global em 5 anos é de aproximadamente 50% a 60% dos casos [5]. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas terapias que sejam mais efetivas para o tratamento do câncer e menos invasivas ao paciente [8].

Neste contexto, extratos e moléculas isoladas de algumas espécies de fungos demonstram propriedades antineoplásicas em vias metabólicas de carcinomas. Uma nova substância, o Neobaconol, foi isolada do extrato de *Albatrellus confluens*, um fungo encontrado no sudoeste da China, e

mostrou-se ativa para indução de apoptose através do aumento de proteínas pró-apoptóticas ativas, as caspases 3 e 9, em linhagens celulares de carcinoma de vias biliares [9] e citotóxica em linhagens de câncer de mama [10]. A vincristina, extraída de fungos *Eutypella spp.*, comuns na Índia, induziu apoptose na linhagem celular A431, de carcinoma de célula escamosa epidermoide [11]. Outro exemplo é o extrato do fungo *Antrodia camphorata*, endêmico em Taiwan, que também foi citotóxico a células de melanoma [12], e induziu apoptose nas linhagens HeLa e C-33, ambas de carcinoma cervical [13].

O Brasil abriga em seu território uma das maiores biodiversidades do planeta. Maior bioma da América do Sul, o Cerrado ocupa uma área de aproximadamente 22% do território nacional [14]. Há nesse bioma de grande riqueza natural uma variedade de fungos com diversas atividades biológicas que podem ser estudadas. O fungo *Aspergillus terreus*, encontrado no solo do Cerrado e produtor da enzima asparaginase [15], já teve algumas de suas propriedades estudadas. Alguns trabalhos relatam que um metabolito isolado do extrato desse fungo, a terreína, induziu apoptose na linhagem HeLa [16], e resultou em atividade antiproliferativa em células de carcinoma hepatocelular pela interrupção do ciclo celular, além de alterar sua morfologia [17].

Comercialmente, a asparaginase é utilizada na indústria alimentícia para diminuir a concentração de uma substância com potencial carcinogênico, a acrilamida [18]. Essa substância é formada durante o processamento térmico de alguns alimentos, como batata frita, através da reação que ocorre entre o aminoácido asparagina e açúcares redutores, conhecida como reação de Maillard [19]. A asparaginase diminui a concentração de acrilamida ao converter a asparagina em ácido asparático [19]. Sua outra utilização é como quimioterápico, estando na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde [20]. O uso desta enzima é principalmente para o tratamento de

Leucemia Linfóide Aguda (ALL) [21], porém ensaios clínicos estão sendo realizados e seu efeito avaliado em tumores do sistema linfático e hematopoiético, como o linfoma linfoblástico [23] e o linfoma extranodal de células NK/T [23].

Estudos *in vitro* também estão sendo realizados para analisar a atividade da asparaginase em tumores sólidos. Foi observada uma redução da proliferação em células de tumor cerebral [24] e de tumor hepático [25] tratadas com a asparaginase. Estudos também demonstraram a ação antiangiogênica e indutora de autofagia em linhagens de células de câncer de ovário [26-27].

O mecanismo de ação dessa enzima nas vias carcinogênicas é basicamente na redução dos níveis plasmáticos do aminoácido asparagina, essencial para síntese de proteínas [29]. Células tumorais são incapazes de garantir seu próprio fornecimento de asparagina, diferentemente de células normais. Isso faz com que células de câncer sejam dependentes da asparagina do meio extracelular [29]. Logo, ao se administrar a enzima asparaginase, há uma depleção do aminoácido asparagina do meio e isso ocasiona a interrupção do ciclo celular, fazendo com que a célula entre em processo de apoptose [29].

Apesar do desconhecimento do mecanismo exato de ação dessa enzima [30], trabalhos mostram outras formas de ação que contribuem para seu efeito anticâncer. As caspases são enzimas que quando ativas promovem a morte celular por apoptose [31]. Um estudo com células de carcinoma de células escamosas da laringe mostrou que o aumento da caspase-3 clivada após o tratamento com a asparaginase conduziu essas células ao processo de morte celular por apoptose e que este foi dose e tempo dependente [32]. No mesmo trabalho, mostrou-se que a inativação da via PI3K/AKT/mTOR após administração dessa enzima, através da baixa expressão do nível celular de proteínas fosforiladas Akt e mTOR, está envolvida com a indução

de autofagia [32]. Essa última relação da sua ação com essa via é de grande importância para a área de carcinoma de cabeça e pescoço humano, pois essa via está envolvida na proliferação das células nesse tipo de câncer [33].

Diante de tais estudos, que referenciam os efeitos antineoplásicos de extratos de fungos e da enzima asparaginase em distintos tipos de câncer, o presente trabalho teve como objetivo averiguar os efeitos que o extrato do fungo do Cerrado *Aspergillus terreus* e a enzima asparaginase resultam em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato do *Aspergillus terreus* e da asparaginase

O extrato do fungo de *Aspergillus terreus* foi doado pela Professora Pérola Oliveira Magalhães, do curso de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde (FS/UnB). A enzima asparaginase liofilizada, derivada da *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 100 UI por miligrama, foi diluída em 1 mL de água Mili-Q para a realização dos experimentos.

2.2 Cultura de células

As linhagens celulares utilizadas no experimento são provenientes de células humanas: SCC-9 (carcinoma espinocelular de língua), FaDu (carcinoma espinocelular de hipofaringe) e HaCaT (queratinócitos humano).

Para a linhagem SCC-9 foi utilizado meio DMEM/F12 na proporção de 1:1, acrescido com soro fetal bovino a 10% e antibióticos penicilina e estreptomicina nas concentrações finais de 100ng/mL e 1µg/mL, respectivamente. As linhagens FaDu e HaCaT foram cultivadas em meio para cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), também suplementado com

soro fetal bovino a 10% e antibióticos penicilina e estreptomicina a 1%. Os meios de cultura foram filtrados em membrana de 0,2 µm e mantidos a 4°C, sendo aquecidos em banho-maria à temperatura de 37°C antes do uso. As células foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

2.3 Ensaio de Citotoxicidade Celular

O teste MTT (Ensaio da Atividade Mitocondrial) avalia a capacidade das enzimas mitocondriais celulares de converter sais de tetrazólio em formazam. Os cristais de formazam apresentam uma coloração arroxeadada, que após serem diluídos em solvente alcoólico podem ter sua absorbância aferida em uma leitora de microplaca (Thermo Plate TP Reader) a 570 nm. Assim, somente as células viáveis, ou que não sofreram toxicidade considerável, são capazes de fazer a redução de tetrazólio a formazam, sendo identificadas por uma maior absorbância após as leituras.

O teste consistiu no plaqueamento das células em placas de 96 poços na concentração de 5×10^3 células por poço. Para o tratamento com extrato de *Aspergillus terreus*, as concentrações utilizadas foram de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 µg/mL, por 24, 48 e 72 horas nas linhagens FaDu, HaCaT e SCC-9. Para a asparaginase, o tratamento foi realizado nessas linhagens nas concentrações de 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL por 24 horas e por 48 e 72 horas somente nas linhagens HaCaT e SCC-9. As células também foram tratadas com seu respectivo controle negativo, água destilada para o extrato e água Mili-Q para asparaginase, ambas em proporção semelhante à da maior concentração do extrato ou da asparaginase. Após 24, 48 ou 72 horas de tratamento, foram acrescentados 10 µL de MTT (5mg/mL) em cada poço. As placas, protegidas de luminosidade, voltaram à incubadora e foram mantidas em condições ideais por 4 horas. Decorrido esse tempo, o meio com substrato foi aspirado de cada poço e acrescentado 100 µL de isopropanol

acidificado (25mL de isopropanol + 104 μ L de HCl 100%). As placas foram colocadas no vórtex em velocidade baixa por 10 a 15 minutos, tempo suficiente para a diluição dos sais de tetrazólio no veículo alcoólico. Finalmente a absorbância foi aferida, e para se obter a viabilidade resultante do tratamento, a absorbância das células tratadas foi comparada à absorbância de seu controle, estabilizado como 100% de células viáveis. Além de calcular os valores para a curva dose-resposta, a concentração necessária do extrato e da asparaginase para induzir 50% de citotoxicidade celular (IC₅₀) também foi calculada.

2.4 Western Blot

Para a análise da expressão da proteína Caspase-3, a linhagem SCC-9 foi plaqueada na densidade de 3×10^5 células/poço em placas de 6 poços e mantidas à 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. As células receberam o tratamento com a asparaginase na concentração do IC₅₀ para 24, 48 e 72 horas. No controle foi adicionado água Mili-Q. Após o tratamento, o meio em que as células estavam foi descartado e cada poço foi lavado com 2 mL de PBS gelado. Foram adicionados 50 μ L de tampão de lise em cada poço, e assim as células foram lisadas com o auxílio de rodos plásticos e transferidas para eppendorfs de 1,5 mL após homogeneização updown. Após 30 minutos em gelo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos e 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -80°C. As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry, padronizado a partir de em uma curva-padrão construída com albumina de soro bovino (BSA). As absorbâncias encontradas das proteínas foram interpoladas com a curva de BSA, determinando assim a concentração de proteínas totais em cada amostra.

Após a quantificação das proteínas, as amostras foram preparadas (30 μ g de proteínas + tampão de amostra e água

destilada suficiente para completar 30 μ L), as proteínas desnaturadas a uma temperatura de aproximadamente 96 °C por 5 minutos e aplicadas em um gel de acrilamida a 10%. Em seguida, foram aplicados 30 μ L de amostra em cada poço e o gel submetido a uma corrente de 100V por aproximadamente 2 horas. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, previamente ativada com metanol. Essa transferência ocorreu após a submissão a uma corrente de 24V por 1 hora e 30 minutos. Nesse processo, as proteínas, separadas no gel por peso molecular, passam então para membrana. A membrana foi submetida a bloqueio, com solução bloqueadora 10% (albumina do leite) por uma hora. Após este tempo, a membrana foi lavada com tampão Tris-salina (0,2 M) e 0,1% de Tween 20 (TBST) e foi incubada com anticorpo primário overnight. Em seguida, a membrana foi lavada com TBST (6 lavagens de 5 minutos sob agitação) e incubada com anticorpo secundário por 1 hora. Após lavagens com TBST, foi aplicado na superfície da membrana o ECLPRIME (GE Health Care, Little Chalfont, Reino Unido), reagente que contém o substrato para enzima ligada ao anticorpo secundário, e as imagens foram adquiridas em fotodocumentador com tempo de exposição automático (Amersham Imager 600, GE Health Care, Little Fort, Reino Unido). O anticorpo primário utilizado foi para Caspase 3 (H-277) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) em diluição de 1/500. O anticorpo secundário (Abcam, Cambridge, Reino Unido) foi utilizado em diluição de 1/5000.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os valores de nove poços independentes obtidos de cada concentração estudada para o teste de viabilidade celular. As curvas de dose-resposta foram realizadas por regressão não linear e a partir de tal regressão foram calculados os valores de IC₅₀. Os resultados de citotoxicidade com as concentrações fixas foram analisados pelo

teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa *GraphPad 5.0* para *Windows*. O critério de significância foi o valor $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

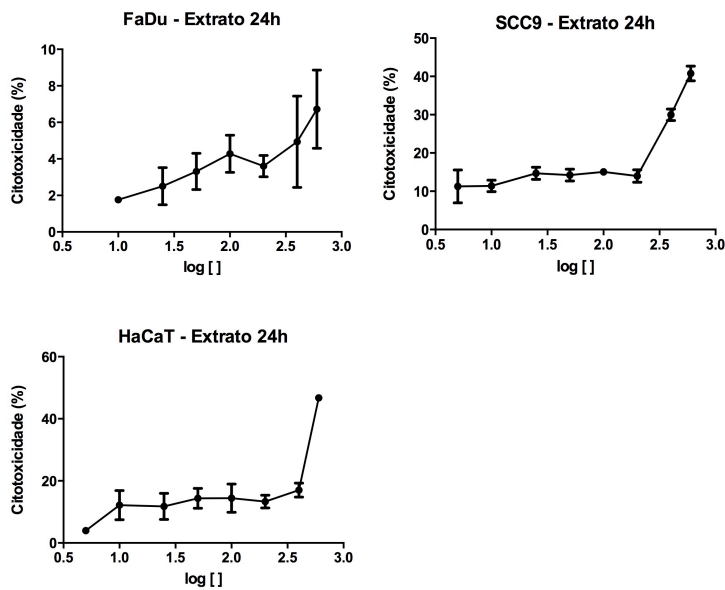
Foi estabelecida a curva dose-resposta após o tratamento por 24, 48 e 72 horas com o extrato aquoso do fungo *Aspergillus terreus* e com a enzima asparaginase através do teste de viabilidade celular (MTT). O objetivo da obtenção da curva dose-resposta (Figuras 1 e 2) é o de determinar o valor do IC_{50} (Tabela 1), concentração necessária para causar morte celular em 50% nas linhagens testadas.

O tratamento com o extrato do fungo por 24 horas não resultou em valor de IC_{50} plausível em nenhuma das linhagens. No período de 48 horas, somente a linhagem SCC-9 resultou em IC_{50} considerável, de 542 $\mu\text{g/mL}$. O tratamento por 72 horas resultou em IC_{50} de 763,6 $\mu\text{g/mL}$ para FaDu e 395,5 $\mu\text{g/mL}$ para HaCaT. (Tabela 1).

O valor de IC_{50} no período de 24 horas no tratamento com a asparaginase foi plausível apenas na linhagem de SCC-9, com 5,45 UI/mL. O tratamento por 48 e 72 horas foi realizado somente com as linhagens SCC-9 e HaCaT, o qual resultou em valores de IC_{50} respectivos de 4,7 e 6,6 UI/mL para 48 horas de tratamento e de 0,6 UI/mL e 7,8 UI/mL para 72 horas (Tabela 1).

Valores de IC ₅₀						
	Extrato (µg/mL)			Asparaginase (UI/mL)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
FaDu	#	259.354	763,6	916	-	-
SCC-9	1.169	542	1.615	5,4	5	0,6
HaCaT	2.514	69.612	395,5	#	6,6	7,8

Tabela 1. Valores de IC₅₀ para tratamento com o extrato aquoso do fungo *Aspergillus terreus* e com a Asparaginase nas linhagens FaDu, HaCaT e SCC-9 nos períodos de 24, 48 e 72 horas. (# valores com erro; - tratamento não realizado; Resultados em negrito significam resultado plausível).



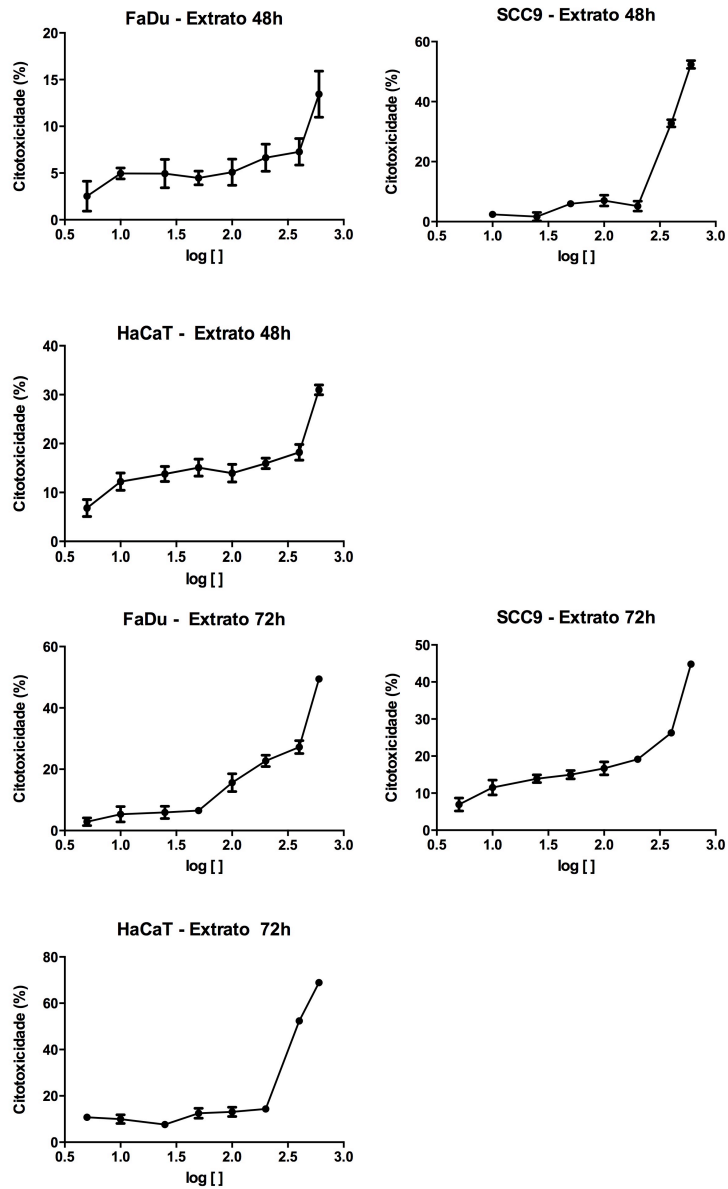


Figura 1. Curvas dose-resposta do tratamento com o extrato aquoso do fungo *Aspergillus terreus* nas linhagens FaDu, HaCaT e SCC-9 nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

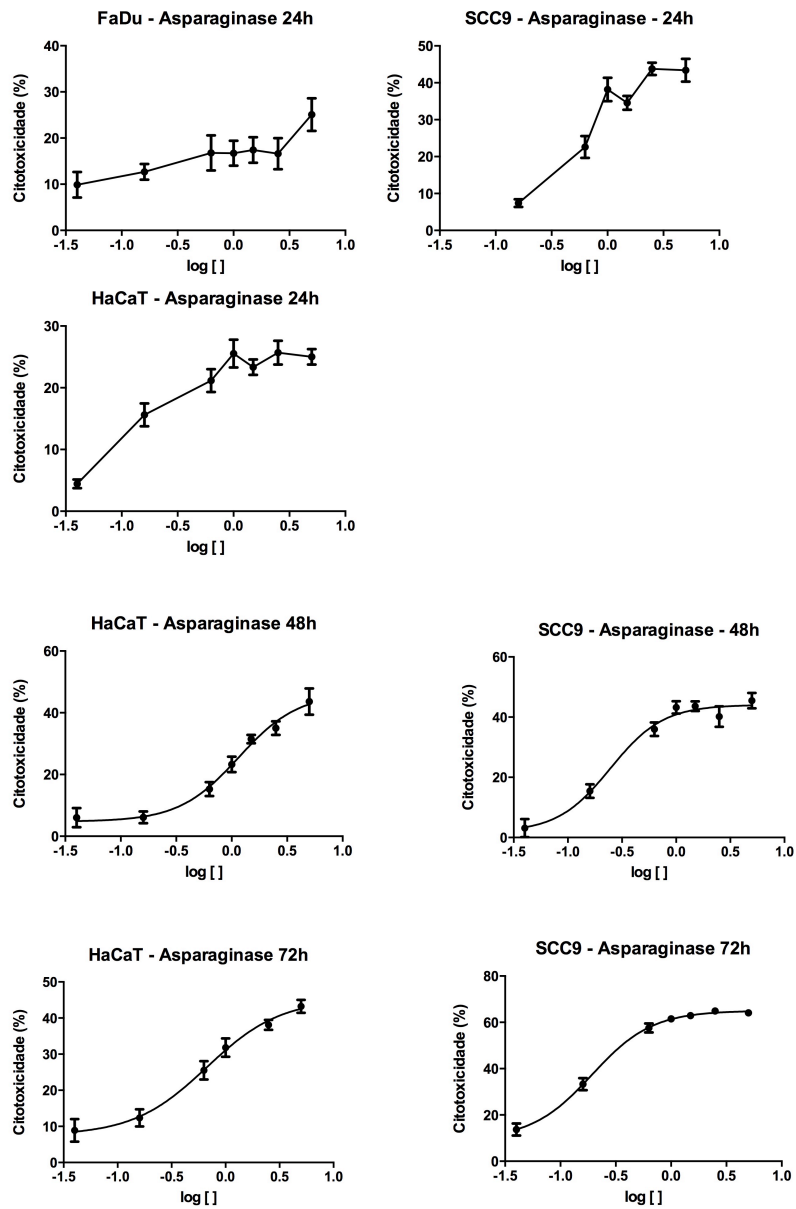


Figura 2. Curvas dose-resposta do tratamento com a asparaginase nas linhagens FaDu, HaCaT e SCC-9 no período de 24 horas, e das linhagens HaCaT e SCC-9 com o tratamento de 48 e 72 horas.

A comparação de valores de citotoxicidade após tratamento em diferentes períodos de tempo com concentrações fixas do extrato de *A. terreus* e da asparaginase também foi realizada. Para isso, as concentrações de 400 µg/mL e 600 µg/mL do extrato do fungo foram selecionadas. As concentrações de 0,63 UI/mL, 1 UI/mL e 5 UI/mL de asparaginase também foram escolhidas para essa análise.

Em relação ao extrato, na concentração de 400 µg/mL (Figura 3), o aumento de toxicidade entre os períodos de 24, 48 e 72 horas nas linhagens FaDu ou SCC-9 não foi estatisticamente significativo. Na linhagem HaCaT essa diferença foi significativa somente entre 48 para 72 horas. Ao comparar a citotoxicidade entre as linhagens, o extrato em 48 horas foi estatisticamente mais citotóxico para SCC-9 que para HaCaT, entretanto, com 72 horas esse resultado se inverteu, sendo a citotoxicidade maior em HaCaT que em SCC-9.

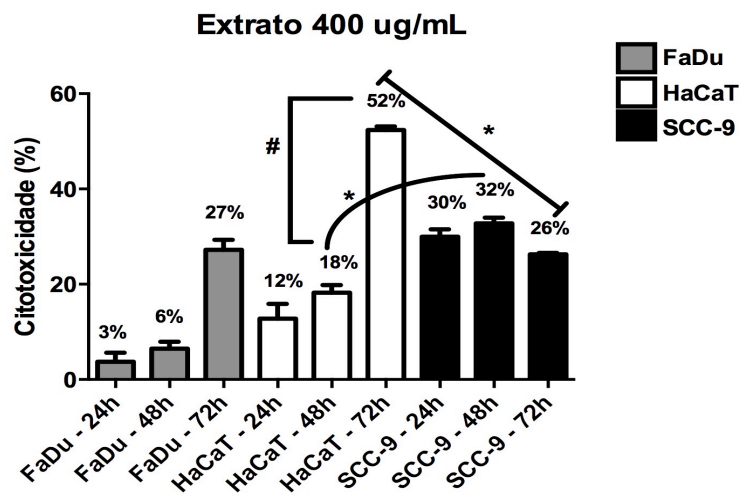


Figura 3. Citotoxicidade celular causada pelo extrato aquoso do fungo *A. terreus* na concentração fixa de 400 µg/mL nas linhagens FaDu, HaCaT e SCC-9 por 24, 48 e 74 horas. (Kruskal-Wallis com Dunn; * $p < 0,05$ para comparação entre linhagens e # com $p < 0,05$ na mesma linhagem).

Na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4), houve aumento de toxicidade estatisticamente significativo nas linhagens FaDu e HaCaT de 48 para 72 horas. Porém, o mesmo não ocorreu com SCC-9 no mesmo período e nem de 24 para 48 horas nas linhagens FaDu, HaCaT ou SCC-9. Em relação a citotoxicidade entre as linhagens, o extrato em 48 horas foi significativamente mais tóxico em SCC-9 que em HaCaT, com toxicidade aumentada em 21%. No entanto, o inverso ocorreu com o tratamento com 72 horas, o qual foi mais citotóxico em HaCaT que em SCC-9 (24%).

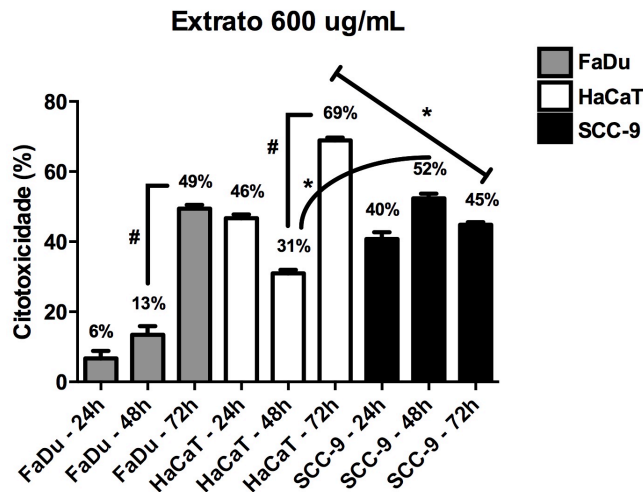


Figura 4. Citotoxicidade celular causada pelo extrato aquoso do fungo *A. terreus* na concentração fixa de 600 $\mu\text{g/mL}$ nas linhagens FaDu, HaCaT e SCC-9 por 24, 48 e 74 horas. (Kruskal-Wallis com Dunn; * $p < 0,05$ para comparação entre linhagens e # com $p < 0,05$ na mesma linhagem).

A enzima na concentração de 0,63 UI/mL (Figura 5) na linhagem HaCaT resultou em diminuição de toxicidade do tratamento de 24 para 48 horas de 6%, e de 48 para 72 horas houve aumento de 10%. Na SCC-9, houve aumento de toxicidade com o aumento do tempo de tratamento de 26%, 36%

e 57% para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Porém, em ambas linhagens, não resultou em diferença estatisticamente significativa. Ao comparar a citotoxicidade entre as duas linhagens, o tratamento com 48 horas resultou em maior citotoxicidade na linhagem SCC-9 que em HaCaT, com um aumento estatisticamente significativo de 21%. O mesmo ocorreu com o tratamento por 72 horas, porém o aumento de toxicidade foi de 32%.

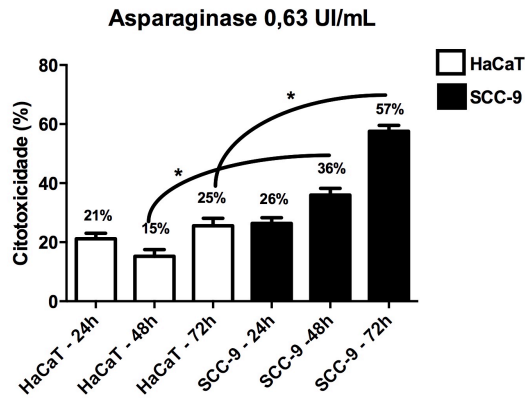


Figura 5. Citotoxicidade celular causada pela asparaginase na concentração fixa de 0,63 UI/mL nas linhagens HaCaT e SCC-9 por 24, 48 e 74 horas. (Kruskal-Wallis com Dunn; * $p < 0,05$).

Nas concentrações de 1 UI/mL e 5 UI/mL (Figura 6) somente o período de 72 horas mostrou que o tratamento causou maior citotoxicidade em SCC-9 que em HaCaT, com aumento de 29,6% para a primeira concentração e de 20,8% para a segunda. Apesar de existir um aumento de toxicidade com o aumento do tempo de tratamento, os resultados não foram estatisticamente significativos.

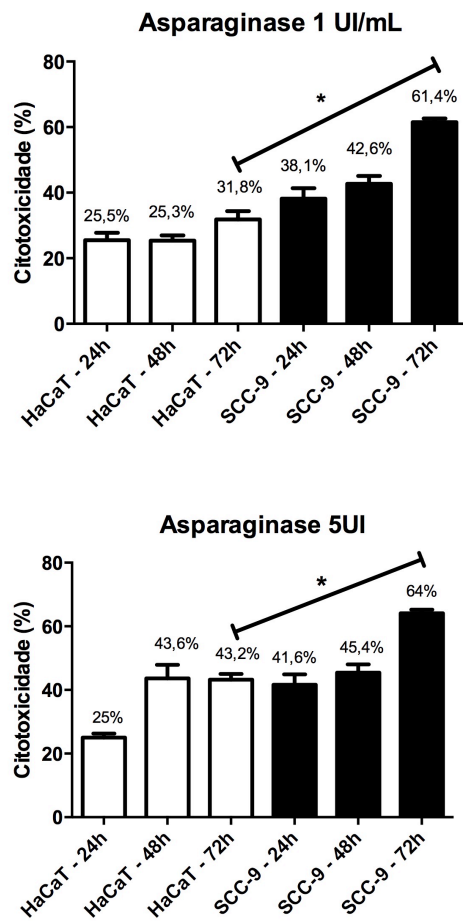


Figura 6. Citotoxicidade celular causada pela asparaginase na concentração fixa de 1 e 5 UI/mL nas linhagens HaCaT e SCC-9 por 24, 48 e 74 horas. (Kruskal-Wallis com Dunn; * $p < 0,05$).

O tratamento com a asparaginase no período de 24 horas na linhagem HaCaT resultou em citotoxicidade menor que 26% para todas as concentrações. Em 48 e 72 horas, apesar de apresentarem aumento gradativo com o aumento das concentrações, não foi um aumento estatisticamente significativo,

e em ambos a citotoxicidade foi menor que 44% em todas as concentrações (Figura 7).

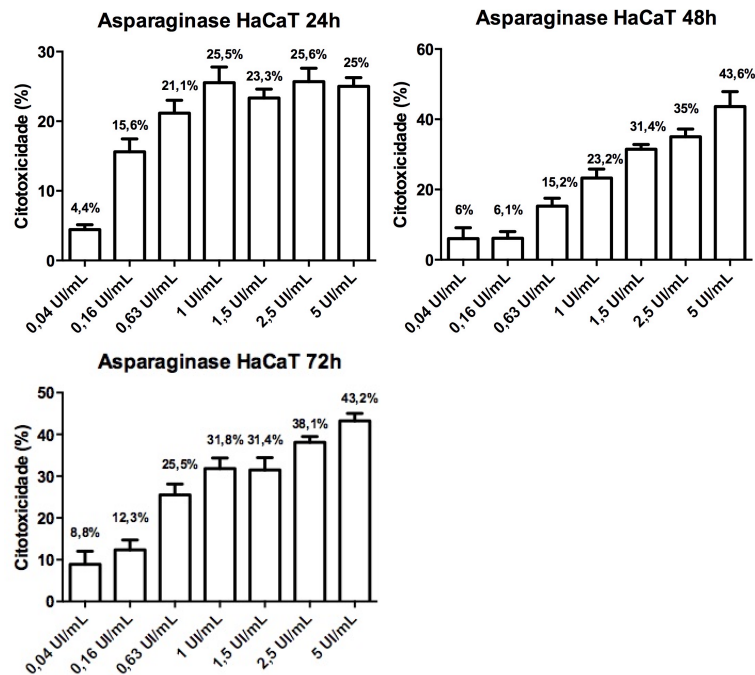


Figura 7. Citotoxicidade celular causada pelo tratamento com a asparaginase nas concentrações de 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL na linhagem HaCaT por 24, 48 e 72 horas (Kruskal-Wallis com Dunn).

Na linhagem SCC-9, o tratamento por 24 horas também se mostrou gradativamente citotóxico, com citotoxicidade menor que 44% em todas as concentrações (Figura 8). Com 48 horas de tratamento, as concentrações de 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL apresentaram toxicidade semelhante com uma média de 43%. Um padrão semelhante ocorreu com 72 horas (média de 63,3% de citotoxicidade). Em ambos períodos, o aumento de toxicidade

estatisticamente significativo resultou da concentração de 0,16 UI/mL para 1UI/mL.

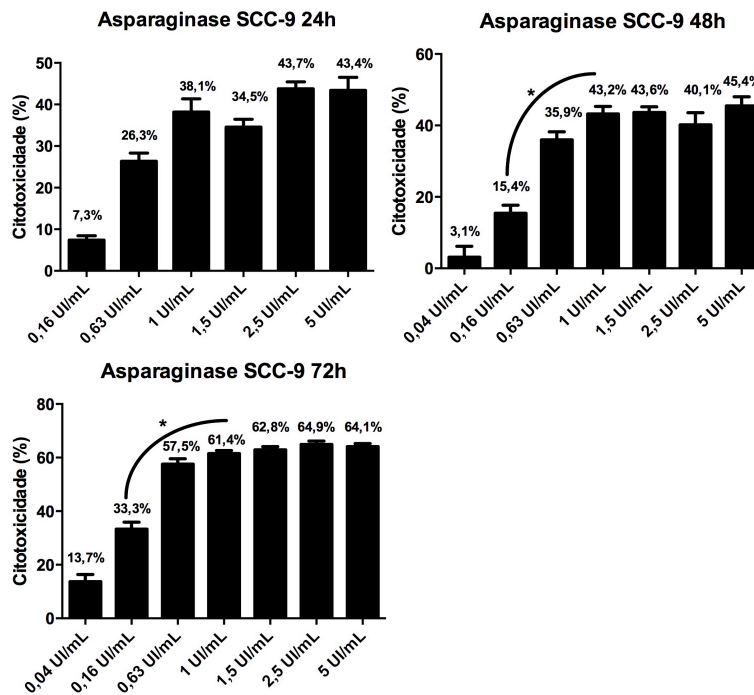


Figura 8. Citotoxicidade celular causada pelo tratamento com a asparaginase nas concentrações de 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL na linhagem SCC-9 por 24, 48 e 72 horas (Kruskal-Wallis com Dunn; * $p < 0,05$ citotoxicidade da concentração de 0,16 UI/mL *versus* 1 UI/mL).

O tratamento da enzima na linhagem FaDu por 24 horas (Figura 9) resultou em toxicidade menor que 17,4% em todas as concentrações, exceto na de 5 UI/mL que foi de 25%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações.

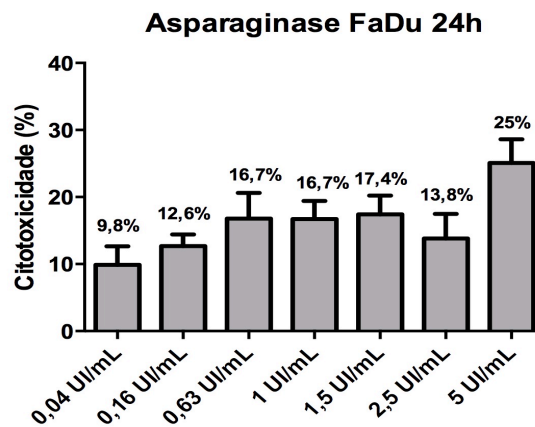


Figura 9. Citotoxicidade celular causada pelo tratamento com a asparaginase nas concentrações de 0,04, 0,16, 0,63, 1, 1,5, 2,5 e 5 UI/mL na linhagem FaDu por 24 horas (Kruskal-Wallis com Dunn).

O ensaio do Western Blot foi realizado com a finalidade de avaliar a expressão da proteína pró-caspase-3 (Figura 10) na linhagem de carcinoma espinocelular de língua, SCC-9, após o tratamento com asparaginase ou seu controle. A concentração utilizada foi a do IC₅₀ em cada período de tratamento (5,4 UI/mL por 24 horas, 5 UI/mL por 48 horas e 0,6 UI/mL por 72 horas). A Figura 10 mostra a banda da pró-caspase-3 do controle seguida do tratamento para cada período. Na coluna do controle a banda encontra-se mais intensa em todos os períodos, e no tratamento a banda fica menos intensa à medida em que aumenta o tempo de tratamento. Isso indica uma diminuição de pró-caspase-3 após o tratamento, o que possivelmente implica na clivagem da pró-caspase-3 em caspase-3, sua forma ativa. Essa proteína é responsável pela indução de morte celular por apoptose, logo, esse resultado indica que a asparaginase pode estar induzindo apoptose nas células de câncer.

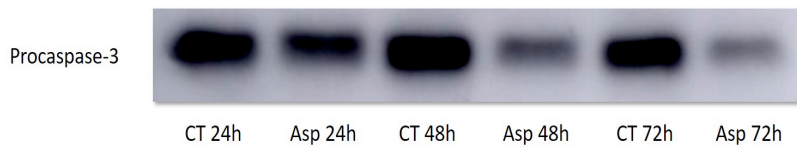


Figura 10. Resultado do Western Blot na linhagem SCC-9 para evidenciação da proteína pró-caspase-3 após o tratamento com asparaginase por 24, 48 e 72 horas. Bandas visíveis mostram sua expressão.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de medicamentos a partir de componentes naturais, tais como extratos de plantas e microrganismos, tem um papel importante na terapia e prevenção do câncer. Um estudo mostra que de 1940 até 2014 nos Estados Unidos, de 175 moléculas anticâncer aprovadas, aproximadamente 49% são provenientes de produtos naturais [34].

No presente estudo foi constatado, ao analisar as curvas dose-resposta, que o tratamento com o extrato aquoso do fungo do cerrado *Aspergillus terreus* foi citotóxico nas linhagens celulares estudadas em determinadas condições. O tratamento com FaDu e HaCaT gerou IC_{50} plausível em 72 horas e em 48 horas com a SCC-9. Devido a baixa citotoxicidade ou a variação da curva dose-resposta, não foi possível gerar valores de IC_{50} para os outros períodos de tratamento e linhagens, ou esses valores resultaram incoerentemente altos (considerada sua condição de projeção a partir de uma regressão).

Tal citotoxicidade é confirmada ao se analisar as concentrações de 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 3 e 4). Essas são as mais altas e as que apresentaram maior toxicidade segundo o gráfico da curva dose-resposta. Em ambas concentrações, o tratamento com 48 horas mostrou-se mais citotóxica para a linhagem de carcinoma de língua que para a

de queratinócitos, e com 72 horas essa relação é invertida. Então, dependendo do tempo de tratamento, as células normais da cavidade oral, que são os queratinócitos, podem ser mais sensíveis que células de carcinoma de língua. Este é o primeiro relato da ação de um extrato aquoso do fungo *A. terreus* em linhagens celulares.

Assim como o Taxol, quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer e proveniente de produto natural [35], o extrato de *A. terreus* pode ser um potencial agente citotóxico para linhagens de câncer de cabeça e pescoço. Portanto, outras avaliações devem ser realizadas com esse extrato nessas células para analisar seus efeitos. Como exemplo, testes para avaliar a interferência no ciclo celular e a indução de morte celular por citometria de fluxo, além das alterações da morfologia celular. Deve-se também investigar a influência do extrato sobre a expressão de proteínas da via do mTOR, uma importante via na carcinogênese de câncer de cabeça e pescoço [33].

Alguns componentes com propriedades antiproliferativas foram isolados de fungos. A terreína, extraída do fungo presente em uma esponja marinha [17] e a lovastatina, presente no solo tropical [36], são exemplos desses componentes. O experimento do presente estudo foi realizado somente com o extrato aquoso desse fungo, portanto, apesar de ter apresentado capacidade antiproliferativa nas células de câncer de cabeça e pescoço, mais estudos devem ser realizados para avaliar quais os componentes que causaram esse efeito, além de testar a citotoxicidade em diferentes frações, como a etanoica, a fim de mensurar a resposta das células de câncer em diferentes estados do extrato. Outra opção seria a de isolar componentes presentes no extrato desse fungo e avaliar seus efeitos isoladamente nessas linhagens celulares.

A enzima asparaginase é um dos componentes presente nesse extrato [15], sendo o fungo *A. terreus* inclusive conhecido pela sua alta produção [37]. Por esse motivo, os experimentos com o extrato e com a asparaginase isolada foram realizados nas células de carcinoma de cabeça e pescoço.

O tratamento com a enzima asparaginase no período de 24 horas mostrou ser citotóxico nas altas concentrações na linhagem SCC-9, segundo a curva dose-resposta (Figura 2). Porém, o mesmo não foi demonstrado nas outras linhagens, HaCaT e FaDu, pois a citotoxicidade foi extremamente baixa. Por esse motivo, somente a SCC-9 com 24 horas de tratamento resultou em um IC_{50} plausível de 5,4 UI/mL.

O tratamento por 48 e 72 horas foi realizado somente com as linhagens HaCaT e SCC-9 para se obter a curva dose-resposta. Na linhagem de carcinoma de língua o valor de IC_{50} (Tabela 1) diminui com o aumento do tempo de tratamento. Esse valor foi de 5,4, 5 e 0,6 UI/mL para 24, 48 e 72 horas de tratamento, respectivamente. Isso indica que a citotoxicidade no tratamento com a enzima na linhagem SCC-9 foi tempo dependente. Um estudo com células de carcinoma hepatocelular da linhagem HepG2 [25] resultou em um valor de IC_{50} com 72 horas de tratamento menor que 1 UI/mL, de 0,1 UI/mL [25]. Na linhagem dos queratinócitos, a baixa toxicidade impossibilitou o cálculo do valor de IC_{50} para 24 horas. Já no tratamento de 48 para 72 horas, esse valor aumentou de 6,6 UI/mL para 7,8 UI/mL (Figura 5).

O tratamento com asparaginase na linhagem de carcinoma de hipofaringe, FaDu, por 24 horas não sugere citotoxicidade com o aumento de concentração (Figura 9). Além disso, a porcentagem de toxicidade foi baixa para todas as concentrações, menor que 25%. Logo, nessa linhagem a asparaginase não se mostrou tão efetiva como em SCC-9.

A toxicidade da enzima nas diferentes concentrações em SCC-9 no período de 24, 48 ou 72 horas aumentou com o aumento de concentração, o que sugere uma citotoxicidade dose-dependente (Figura 8). Um estudo com células de carcinoma pulmonar também mostrou toxicidade dose-dependente no tratamento com asparaginase por 48 horas [38]. Tanto o tratamento com 48 horas como o de 72 horas resultaram em toxicidade semelhante a partir da concentração de 1 UI/mL. Em termos do futuro uso dessa enzima no tratamento de carcinoma de língua, concentrações acima de 1 UI/mL poderiam causar citotoxicidade semelhante nas células de câncer, porém, células normais poderiam sofrer maior citotoxicidade com o aumento dessas concentrações e causar efeitos colaterais ao paciente.

A toxicidade da enzima na linhagem HaCaT no período de 24, 48 ou 72 horas aumentou com o aumento da concentração (Figura 7). Apesar da toxicidade ser dose-dependente, a maior citotoxicidade foi de apenas 25,6% na concentração de 2,5 UI/mL em 24 horas de tratamento e de aproximadamente 43% em 48 ou 72 horas na maior concentração, de 5 UI/mL.

Na linhagem SCC-9 o aumento de toxicidade com a asparaginase foi estatisticamente significativo na concentração de 0,16 UI/mL para 1 UI/mL no período de 48 e no de 72 horas, ficando entre elas a concentração mediana de 0,63 UI/mL (Figura 8). Essa concentração também foi o valor de IC_{50} (Tabela 1) em SCC-9 para 72 horas, e por isso ela foi selecionada para efeitos de comparação entre a HaCaT, como controle negativo, e a SCC-9. Nessa concentração a citotoxicidade foi baixa na HaCaT nos períodos de 24, 48 e 72 horas, e na SCC-9 resultou em aumento de toxicidade de 26%, 36% e 57%, respectivamente (Figura 8). Houve aumento estatisticamente significativo da toxicidade no período de 48 horas e de 72 horas da HaCaT

para SCC-9, sendo que a diferença no primeiro período foi de 21% e o segundo, de 32%. Então, é possível concluir que a enzima apresentou seletividade para SCC-9 em relação aos queratinócitos (HaCaT). Essa consideração é de grande importância, pois demonstra que as células de câncer são mais sensíveis à enzima que aos queratinócitos, o que pode significar efeitos colaterais em menor intensidade.

Os resultados com a concentração fixa de 1 UI/mL e 5 UI/mL confirmam essa seletividade. Em ambas concentrações, a SCC-9 foi mais citotóxica que a HaCaT, porém, somente no tratamento de 72 horas. Esse resultado também confirma que utilizar asparaginase no tratamento de câncer de língua em altas concentrações não é favorável, pois a toxicidade em SCC-9 nas concentrações altas de 1 e 5 UI/mL e na concentração mais baixa de 0,63 UI/mL são semelhantes, com variação entre 5 a 8% de toxicidade (Figura 8). Entretanto, a seletividade celular em relação a HaCaT e SCC-9 é estatisticamente mais significativa nos períodos de 48 e 72 horas para 0,63 UI/mL e para 1 e 5 UI/mL apenas no período de 72 horas (Figuras 5 e 6).

Portanto, a linhagem celular de carcinoma de língua mostrou ser sensível a esta enzima, o que é um resultado suportado por estudos que relatam a redução da viabilidade celular em carcinomas sólidos, tal como o realizado em células de tumor cerebral (linhagem de meduloblastoma DAOY) [24] em que aproximadamente 100% das células sofreram redução da viabilidade celular com 72 horas de tratamento na concentração de 1 UI/mL [24].

Esse fato mostra que esta enzima pode ser utilizada para o tratamento de outros tipos de câncer, e não somente no tratamento de carcinomas de origem hematológica, como descrito no trabalho sobre o tratamento da Leucemia Linfóide Aguda com a asparaginase [40].

O resultado do western blot sugere a diminuição da proteína pró-caspase3, o que indica aumento da proteína clivada caspase-3 [41]. Isso sugere a indução de apoptose através do tratamento com a asparaginase na linhagem celular SCC-9. Essa indução foi tempo dependente, uma vez que com o aumento de tempo, de 24, 48 e 72 horas, as bandas da pró-caspase ficaram menos visíveis. Porém, esse resultado é apenas sugestivo, uma vez que não foi realizado o experimento com a proteína controle. Estudo com células de laringe, linhagens Tu212 e Tu686, mostraram o mesmo resultado ao serem tratadas com a asparaginase por 24 e 48 horas, sendo dose e tempo dependente [32]. Outro estudo com células da linhagem celular de adenoma pulmonar, A549 e A1975, também confirmou esse resultado com o tratamento de 24 horas [38].

Além do comprometimento funcional e estético na região facial causado pelo tratamento cirúrgico em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço [2-8], estudos mostram que há um aumento da resistência à radioterapia nesses pacientes [42]. Por isso, há a necessidade de novas alternativas de tratamento e os resultados da asparaginase apontam para seu possível uso na prevenção e tratamento do câncer de cabeça e pescoço. Tal enzima já é empregada como quimioterápico, estando na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde [20]. Portanto, frente aos resultados deste trabalho, observa-se a necessidade em realizar mais estudos para melhor entender o mecanismo de ação desta enzima nas células de carcinoma de cabeça e pescoço (tumor sólido), uma vez que estas foram sensíveis à enzima.

Outro experimento, como o de citometria de fluxo, pode ser realizado para analisar o perfil de morte celular induzida pela enzima. O experimento do western blot deve ser realizado em mais replicatas, juntamente com a proteína

controle, para efeito de comprovação dos resultados. Esse teste também deve ser realizado para avaliar alterações em proteínas relativas ao ciclo celular e à via do mTOR nessas linhagens, considerando que a ação da asparaginase nesta via foi observada em células de leucemia mieloide crônica K562 [39].

Essas células foram sensíveis ao extrato do fungo e à enzima, embora não podemos concluir que a ação do extrato está diretamente relacionada com a da enzima. Experimentos devem ser realizados com o intuito de investigar a relação entre eles.

Baseando-se nestes resultados, podemos concluir que o extrato de *A. terreus* e a asparaginase, em determinadas condições de tempo e concentração, são capazes de inibir a proliferação das linhagens celulares investigadas. A diminuição da expressão da proteína procaspase-3 indica a possibilidade de indução de apoptose na linhagem de carcinoma de língua pela enzima asparaginase. Tais resultados demonstram a importância de se testar extratos de espécies de fungos nas linhagens celulares de tumores sólidos, especialmente em linhagens de câncer de cabeça e pescoço. Ainda assim, mais estudos devem ser realizados para comprovar a efetividade destas substâncias em células de câncer.

REFERÊNCIAS

- [1] GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012 [acesso em 13/06/2017]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
- [2] Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update. CA: a cancer journal for clinicians. 2015.
- [3] Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. Oral oncology. 2010;46(6):407-10.
- [4] INCA. Estimativa 2016: Instituto Nacional do Câncer; [<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/Tabelaestados.asp?UF=BR>].
- [5] Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians. Part 2: Epidemiology. Dental update. 2015;42(4):354-6, 8-9.
- [6] Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. Oral Diseases. 2009; 15? 388-399.
- [7] Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. 2016;12(2):458-463.
- [8] Moreira J, Tobias A, O'Brien MP, Agulnik M. Targeted therapy in head and neck cancer: An update on current clinical developments in epidermal growth factor receptor-targeted therapy and immunotherapies. Drugs. 2017.

[9] Zhou GY, Pan CW, Jin LX, Zheng JJ, Yi YX. Neoalbaconol inhibits cell growth of human cholangiocarcinoma cells by up-regulating PTEN. *Am J Transl Res* 2016;8(2):496-505.

[10] Yu X, Li W, Deng Q, You S, Liu H, Peng S, Liu X, Lu J, Luo X, Yang L, Tang M, Weng X, Yi W, Liu W, Wu S, Ding Z, Feng T, Zhou J, Fan J, Bode AM, Dong Z, Liu J, Cao Y. Neoalbaconol inhibits angiogenesis and tumor growth by suppressing EGFR-mediated VEGF production. *Molecular Carcinogenesis*. 2016.

[11] Kuriakose GC, Palem PPC, Jayabaskaran C. Fungal vincristine from *Eutypella* spp - CrP14 isolated from *Catharanthus roseus* induces apoptosis in human squamous carcinoma cell line -A431. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 16:302.

[12] Wang JJ, Wu CC, Lee CL, Hsieh SL, Chen JB, Lee CI. Antimelanogenic, antioxidant and antiproliferative effects of *Antrodia camphorata* fruiting bodies on B16-F0 melanoma cells. *Plos one*. 2017.

[13] Yang P, Hu D, Liu F: Cytotoxic effect and Induction of apoptosis in Human cervical cancer cells by *Antrodia camphorata*, *The American journal of Chinese Medicine*. 2013; 41: 1169-1180.

[14] Portal Ministério do Meio Ambiente
[<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>]

[15] Almeida RPC. Avaliação da produção de L- Asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado. 2015. 88 f., il. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

[16] Porameesanaporn Y, Uthaisang-Tanechpongthamb W, Jarintanan F, Jongrungruangchok S, Wongsatayanon BT: Terrein induces apoptosis in HeLa human cervical carcinoma cells through p53 and ERK regulation, *Oncology Reports*, 2013; 29: 1600-1608.

[17] Zhang F, Mijiti M, Ding W, Song J, Yin Y, Sun W, Li Z. Terrein inhibits human hepatoma Bel-7402 proliferation through cell cycle arrest. *Oncology reports*. 2015; 33:1191-1200.

[18] Pelucchi C, Bosetti C, Galeone C, Vecchia CL. Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-analysis. *International journal of cancer*. 2014.

[19] Xu F, Oruna-Concha MJ, Elmore JS. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. 2016; 210:163–171.

[20] World Health Organization: WHO Model list of Essential Medicines. April 2015; 19th edition. Available from: http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/20/EM_L_2015_FINAL_amended_AUG2015.pdf?ua=1

[21] Ali U, Naveed M, Ullah A, Ali K, Shah SA, Fahad S, Mumtaz AS. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. *European Journal of Pharmacology*. 2016; 771:199–210.

[22] Zheng W, Ren H, Ke X, Xue M, Zhang Y, Xie Y, Lin N, Tu M, Liu W, Ping L, Ying Z, Zhang C, Deng L, Wang X, Song Y, Zhu J. PEG-asparaginase in BFM-90 regimen improves outcomes in

adults with newly diagnosed lymphoblastic lymphoma. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2017; 29(1):66-74.

[23] Bu S, Yuan F, Wei X, Yin Q, Li Y, Mi R, Yang H, Li H, Ge S, Liu Y, Song Y. L-asparaginase-based regimen as a first-line treatment for newly diagnosed nasal type extranodal natural killer cell/T-cell lymphoma. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;11: 2437-2445.

[24] Panosyan EH, Wang Y, Xia P, Lee WNP, Pak Y, Laks DR, Lin HJ, Moore TB, Cloughesy TF, Komblum HI, Lasky JL.: Asparagine depletion potentiates the cytotoxic effect of Chemotherapy against Brain Tumors. *Molecular cancer research*. 2014; 5; 694-702.

[25] Tardito S, Chiu M, Uggeri J, Zerbini A, Ros FD, Dall'Asta V, Missale G, Bussolati O. L-asparaginase and inhibitors of Glutamine synthetase discolore glutamine addiction of B-Catenin-mutated Human Hepatocellular carcinoma cells. *Current cancer target*. 2011; 11; 929-943.

[26] Yu M, Henning R, Walker A, Kim G, Perroy A, Alessandro R, Virador V, Kohn EC. L-asparaginase inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012; 16; 2369-2378.

[27] Lorenzi PL, Rainhold WC, Rudelius M, Gunsior M, Shankavaram U, Bussey KJ, Scheerf U, Eichler GS, Martin SE, Chin K, Gray JW, Kohn EC, Horak ID, Hoff DDV, Raffield M, Goldsmith PK, Caplen NJ, Weinstein JN: Asparaginase synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells. *Spotlight on Molecular Profiling*. 2006; 5(11); 2613-2623.

[29] Avramis VI. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. *Anticancer research*. 2012; 32: 2423-2438.

[30] Lanvers-Kaminsky C. Asparaginase pharmacology: challenges still to be faced. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017.

[31] Fogarty CE, Bergmann A. Killers creating new life: caspases drive apoptosis- induced proliferation in tissue repair and disease. *Official journal of the Cell Death Differentiation Association*. 2017; 1-11.

[32] Ji Y, Li L, Tao Q, Zhang X, Luan J, Zhao S, Liu H, Ju D. Deprivation of asparagine triggers cytoprotective autophagy in laryngeal squamous cell carcinoma. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017.

[33] Marques AE, Elias ST, Porporatti AL, Castilho RM, Squarize CH, De Luca Canto G, Guerra EN: mTOR pathway protein immunoexpression as a prognostic factor for survival in head and neck cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2016; 45(5). 319-328.

[34] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*. 2016; 79: 629–661.

[35] Xuanwei Z, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. A review: recent advances and future prospects of taxol – producing endophytic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010(86):1707–1717.

[36] Bhargavi SD, Praveen VK, Mariam S, Sreepriya M, Savitha J. Purification of Lovastatin from *Aspergillus terreus* (KM017963)

and Evaluation of its Anticancer and Antioxidant Properties. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17 (8):3797-3803.

[37] Loureiro CB, Borges KS, Andrade AF, Tone LG, Said S: Purification and biochemical characterization of native pegylated form of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity, *Advances in microbiology*, 2012; 2: 138-145.

[38] Zhang B, Fan J, Zhang X, Shen W, Cao Z, Yang P, Xu Z, Ju D. Targeting asparagine and autophagy for pulmonary adenocarcinoma therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016.

[39] Song P, Ye L, Fan J, Li Y, Zeng X, Wang Z, Wang S, Zhang G, Yang P, Cao Z, Ju D: Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2015; 6; 6.

[40] Boissel N, Sender LS: Best Practices in Adolescent and Young adult patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia: A focus on asparaginase. *Journal of adolescent and Young adult oncology*, 2015; 4; 118-12.

[41] Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*. 2001; 20: 7597-7609.

[42] Yamamoto VN, Thylur DS, Bauschard M, Schmale I, Sinha KU. Overcoming radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2016; (63) 44–51.

ANEXOS

NORMAS DA REVISTA

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.** • **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Word Count. Please include a word count on your Title Page. Your word count should exclude the abstract, keywords, references, tables and figures.

Abstract

A concise and factual abstract of no more than 250 words is required. The abstract must be **structured for original research articles and articles reporting the results of clinical trials**. The abstract should be divided by subheadings as follows: Objectives, Materials and Methods, Results and Conclusion.

The abstract **should not be structured for review articles**. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

Graphical abstract : Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for Original Research Articles, Review Articles, and Perspectives. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See: <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes. It is usually necessary to include keywords such as Oral Cancer, or Head and Neck cancer.

Abbreviations: Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements: Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources: List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:
Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units: Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes: Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Tables: Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Table footnotes: Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Figure Captions, Tables, Figures and Schemes: Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow

us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references: As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references: This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.