Luiza Carvalho Damasceno

Ação da curcumina na morfologia de linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço

Brasília
2017

Luiza Carvalho Damasceno

Ação da curcumina na morfologia de 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.

Orientador: Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra

Co-orientador: MSc. Gabriel Álvares Borges

Brasília
2017

À minha família.

AGRADECIMENTOS

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe” (Clarice Lispector).

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por todas as oportunidades que me foram dadas e pelas dificuldades que me tornaram mais forte.

Agradeço ao Dr. Glaydson, meu ortodontista, um profissional que eu respeito e admiro, tão apaixonado por sua profissão que me contagiou. Se hoje eu estou formando em odontologia foi porque ele me introduziu de forma sublime à esta profissão.

Agradeço à minha família, minha maior riqueza, razão de ser quem sou e motivação para atingir meus objetivos.

Agradeço em especial aos meus pais, Edith e Jorge, que são minha inspiração de caráter, dedicação e amor, por me apoiarem, sempre estarem ao meu lado e por terem me ensinado a voar.

Agradeço a minha irmã, Paula, que está sempre comigo.

Agradeço ao programa Ciência sem Fronteiras que foi a melhor experiência da minha vida, me permitiu conhecer pessoas e lugares incríveis, além de ter contribuído diretamente para meu amadurecimento como pessoa e profissional.

Agradeço aos meus colegas da turma 66, que me acolheram e fizeram minha jornada acadêmica ser mais divertida e leve.

Agradeço a Larissa Araújo, por ter entrado na minha vida no momento mais importante, por ter compartilhado noites em claro, resumos, estágios, festas, família, por ter sido mais que uma colega de turma, por ter se tornado uma irmã.

Agradeço a Larissa Moreno, minha dupla, que fez da minha jornada acadêmica mais alegre, e que durante o desenvolvimento desse trabalho sempre me apoiou e

compreendeu meus atrasos e ausência na clínica para estar no laboratório.

Agradeço a UnB que forma mais do que bons profissionais, mas seres humanos melhores.

Agradeço ao corpo docente da UnB pelo conhecimento compartilhado, mas principalmente por nos ensinarem a amar essa profissão tão linda que é a Odontologia.

Agradeço a Bruna e aos demais colegas de laboratório que contribuíram para esse trabalho.

Agradeço ao Gabriel, meu braço direito e esquerdo nesse trabalho, uma pessoa que eu admiro e um profissional que eu me espelho. Obrigada por todo ensinamento, por ter sido extremamente atencioso e paciente, muito obrigada por tudo.

Agradeço a professora Eliete por ter me oferecido essa oportunidade, por acreditar em mim e por ser um exemplo de mulher e profissional. Que o mundo tenha mais profissionais tão apaixonados e dedicados à profissão. Obrigada por contribuir de forma direta na minha formação acadêmica e no meu amadurecimento pessoal.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse onde cheguei, para que eu me tornasse quem eu sou.

EPÍGRAFE

“Aprenda como se fosse viver para sempre. Viva como se fosse morrer amanha.”

John Wooden

RESUMO

DAMASCENO, Luiza Carvalho. Ação da curcumina na morfologia 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 carcinoma de cabeça e pescoço (CCP) é o sexto tipo mais comum de câncer . O câncer possui uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 50%. Dado à baixa sobrevida, esse trabalho investigou os efeitos da curcumina e do everolimus, inibidores da via de carcinogênese PI3K/AKT/mTOR em linhagens de CCP. O objetivo foi verificar a ação da curcumina nas alterações morfológicas celulares de CCP humano e a expressão da proteína pró-caspase-3.

Materiais e Métodos: SCC-9 (linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua) e FaDu (linhagem celular de carcinoma espinocelular de hipofaringe) foram tratadas com everolimus e curcumina para estabelecimento da curva dose-resposta pelo Ensaio da Atividade Mitocondrial (MTT). A marcação do citoesqueleto com faloidina e do núcleo com DAPI para observação em microscopia de fluorescência foram realizadas. Realizamos o ensaio de Western Blot para verificação da expressão de proteína pró-caspase-3, que avalia a presença de apoptose.

Resultados: As células SCC9 e FaDu apresentaram IC_{50} de 40,93 μM e 24,84 μM para curcumina e de 12,85 μM e 27,4 μM para everolimus após 24h, respectivamente. Quanto à alteração no citoesqueleto, as células tratadas apresentaram alterações nucleares, desorganização nas fibras de F-actina e diminuição no número de fibras de estresse, mais evidentes no tratamento com curcumina. Quanto à expressão de proteína, houve redução de pró-caspase-3, sugerido a presença de apoptose.

Conclusão: Demonstrou-se que a curcumina altera a morfologia celular e aparentemente reduz a expressão da proteína pró-caspase-3 em linhagens celulares de CCP, o que indica a clivagem da forma inativa para forma ativa, que pode sugerir presença de apoptose. Mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos que resultam nessas alterações observadas, bem como a via de carcinogênese envolvida.

ABSTRACT

DAMASCENO, Luiza Carvalho. Effects of curcumin on morphology in head and neck carcinoma 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 cancer (HNC) is the sixth most common type. The cancer has a 5-year survival rate of less than 50%. This study investigated the effects of curcumin and everolimus in HNC cell cultures. The objective was to verify the activity of curcumin on morphological changes in human HNC cells and the expression of pro-apoptotic protein caspase-3.
Material and methods: SCC9 (tongue squamous cell carcinoma) and FaDu (hypopharynx sqamous cancer cell) cell lines were treated with everolimus and curcumin to establish a dose-response curve with the Mithocondrial Activity Test (MTT). The cytoskeleton was marked with phalloidin and the nucleus with DAPI for fluorescence microscopy. Western blot test was performed to verify the expression of caspase-3.
Results: SCC9 and FaDu cells presented respectively IC50 of 40.93 μM and 24.84 μM with curcumin, and 12.85 μM and 27.4 μM with everolimus after 24 hours. For cytoskeletal alteration, treated cells showed nuclear alterations, disorganization on F-actin fibers and decrease in the number of stress fibers, more evident with curcumin. On protein expression, a reduction on caspase-3 was verified.
Conclusion: This study demonstrated that curcumin changes cellular morphology and reduce the expression of pro-caspase-3 in HNC cell lines, it indicates a cleavage of the inactive form into an active forma, which may suggest the pretense of apoptosis. Further studies on curcumin action are necessary to better elucidate the mechanisms that result in these observed changes.

SUMÁRIO

Artigo Científico **17**

Folha de Título ***19***

Resumo ***21***

Abstract ***23***

1. Introdução ***25***

2. Materiais e Métodos ***28***

3. Resultados ***32***

4. Discussão ***37***

5. Conclusão ***41***

Referências ***42***

Anexo **49**

Normas da Revista ***49***

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:
DAMASCENO, Luiza Carvalho. Ação da curcumina na morfologia em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço.
Apresentado sob as normas de publicação da Revista Oral Oncology.

FOLHA DE TÍTULO

Avaliação da ação da curcumina na morfologia em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço.

Effects of curcumin on morphology in head and neck carcinoma cell lines.

Luiza Carvalho Damasceno[1]
Gabriel Álvares Borges[2]
Bruna Rabelo Amorim[3]
Eliete Neves da Silva Guerra[4]

[1] Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.
[2] Mestre em Ciência da Saúde da Universidade de Brasília (UnB).
[3] Doutora em Odontologia pela University of Tokushima.
[4] Professora A do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasilia.

Correspondência: Profa. Dra. 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 da ação da curcumina na morfologia em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço.

Resumo

Objetivos: O carcinoma de cabeça e pescoço (CCP) é o sexto tipo mais comum de câncer . O câncer possui uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 50%. Dado à baixa sobrevida, esse trabalho investigou os efeitos da curcumina e do everolimus, inibidores da via de carcinogênese PI3K/AKT/mTOR em linhagens de CCP. O objetivo foi verificar a ação da curcumina nas alterações morfológicas celulares de CCP humano e a expressão da proteína pró-caspase-3.

Materiais e Métodos: SCC-9 (linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua) e FaDu (linhagem celular de carcinoma espinocelular de hipofaringe) foram tratadas com everolimus e curcumina para estabelecimento da curva dose-resposta pelo Ensaio da Atividade Mitocondrial (MTT). A marcação do citoesqueleto com faloidina e do núcleo com DAPI para observação em microscopia de fluorescência foram realizadas. Realizamos o ensaio de Western Blot para verificação da expressão de proteína pró-caspase-3, que avalia a presença de apoptose.

Resultados: As células SCC9 e FaDu apresentaram IC_{50} de 40,93 μM e 24,84 μM para curcumina e de 12,85 μM e 27,4 μM para everolimus após 24h, respectivamente. Quanto à alteração no citoesqueleto, as células tratadas apresentaram alterações nucleares, desorganização nas fibras de F-actina e diminuição no número de fibras de estresse, mais evidentes no tratamento com curcumina. Quanto à expressão de proteína, houve redução de pró-caspase-3, sugerido a presença de apoptose.

Conclusão: Demonstrou-se que a curcumina altera a morfologia celular e aparentemente reduz a expressão da proteína pró-caspase-3 em linhagens celulares de CCP, o que indica a clivagem da forma inativa para forma ativa, que pode sugerir presença de apoptose. Mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos que resultam nessas alterações observadas, bem como a via de carcinogênese envolvida.

Palavras-chave

Câncer de cabeça e pescoço; Curcumina; Everolimus; Citoesqueleto; Inibidor de mTOR; Actina.

Relevância Clínica

A alta taxa de mortalidade e os efeitos deletérios, causados por efeitos adversos às terapias oncogênicas, apontam para a necessidade de tratamentos alternativos menos invasivos e a curcumina surge como uma boa opção.

ABSTRACT

Effects of curcumin on morphology in head and neck carcinoma cell lines

Abstract

Objectives: Head and neck cancer (HNC) is the sixth most common type. The cancer has a 5-year survival rate of less than 50%. This study investigated the effects of curcumin and everolimus in HNC cell cultures. The objective was to verify the activity of curcumin on morphological changes in human HNC cells and the expression of pro-apoptotic protein caspase-3.

Material and methods: SCC9 (tongue squamous cell carcinoma) and FaDu (hypopharynx sqamous cancer cell) cell lines were treated with everolimus and curcumin to establish a dose-response curve with the Mithocondrial Activity Test (MTT). The cytoskeleton was marked with phalloidin and the nucleus with DAPI for fluorescence microscopy. Western blot test was performed to verify the expression of caspase-3.

Results: SCC9 and FaDu cells presented respectively IC50 of 40.93 μM and 24.84 μM with curcumin, and 12.85 μM and 27.4 μM with everolimus after 24 hours. For cytoskeletal alteration, treated cells showed nuclear alterations, disorganization on F-actin fibers and decrease in the number of stress fibers, more evident with curcumin. On protein expression, a reduction on caspase-3 was verified.

Conclusion: This study demonstrated that curcumin changes cellular morphology and reduce the expression of pro-caspase-3 in HNC cell lines, it indicates a cleavage of the inactive form into an active forma, which may suggest the pretense of apoptosis. Further studies on curcumin action are necessary to better elucidate the mechanisms that result in these observed changes.

Keywords

Head and neck cancer; Curcumin; Everolimus; Cytoskeleton; mTOR inhibitor; Actin.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) engloba as regiões de cavidade oral, faringe e laringe e é o sexto mais comum mundialmente, sendo o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço o de maior incidência dentro desse grupo (Kalavrezos, Scully, 2015).

Tendo como referência dados do *World Cancer Report* (IARC, 2017), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015 e espera-se que o número de novos casos aumente cerca de 70% nos próximos 20 anos. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2017) prevê para 2017 mais de 15.000 novos casos de câncer na cavidade oral.

Os fatores etiológicos do CCP são as diferentes formas de consumo de tabaco e álcool, além da infecção pelo papilomavírus humano (HPV), especialmente em câncer na região de orofaringe (Thavaraj et al., 2011). O tratamento é baseado em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia, e a taxa de mortalidade é considerada alta, geralmente com taxa de sobrevida global em 5 anos inferior a 50% (Pezzuto et al., 2015). Com isso, pontua-se a necessidade do desenvolvimento de novas terapias que sejam efetivas para o tratamento do câncer de forma a minimizar e/ou excluir os efeitos prejudiciais à saúde geral dos pacientes.

Os tratamentos a partir de substâncias naturais vêm sendo cada vez mais explorados como uma alternativa aos já estabelecidos métodos de combate ao câncer. Nesse contexto, protocolos de terapias que têm por alvo genes, proteínas e/ou vias de sinalização participantes do processo oncogênico tornaram-se objetos de estudos. Os resultados de pesquisas indicam um grande potencial para essas substâncias como agentes preventivos e terapêuticos (Elias et al., 2015; Turati et al., 2015).

A via PI3K/AKT/mTOR (Figura 1) é uma via de sinalização importante para o crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em condições fisiológicas (Martelli et al., 2010). Essa via, quando superativada, está presente em diversos tipos de câncer, o que instiga a pesquisa e o desenvolvimento de terapias neoplásicas que têm por alvo a proteína mTOR (Lin et al., 2010).

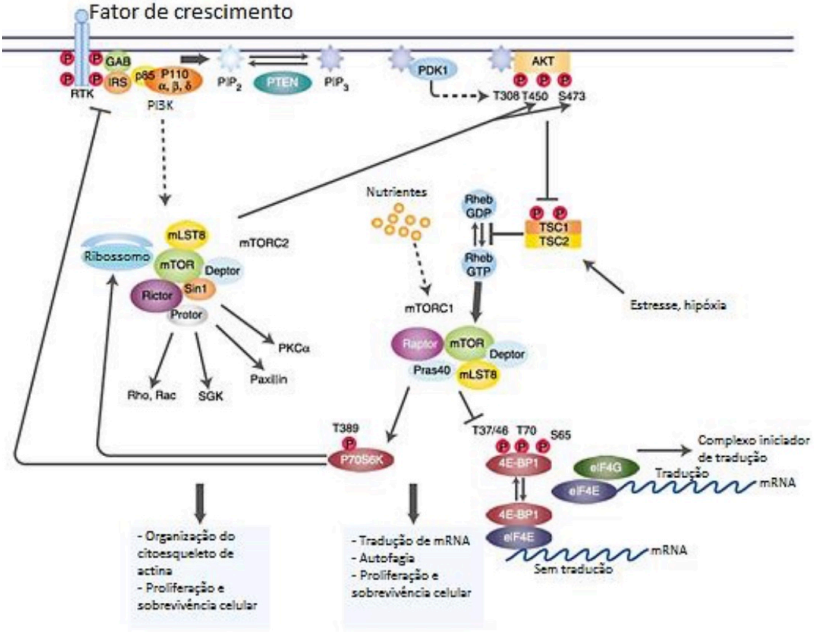

Figura 1. Representação esquemática da cascata de sinalização PI3K/AKT/mTOR (Willems et al., 2012).

A ativação da via PI3K/AKT/mTOR nas neoplasias ocorre por diversos meios, tais como inativação de PTEN, mutação de AKT, superexpressão de PI3K e/ou dos efetores de mTOR (alvo mecanístico da Rapamicina). Ao promover a inibição de proteínas dessa via, espera-se a redução da migração e proliferação de células oncogênicas (Memmel et al., 2017).

A desregulação da apoptose é um dos eventos mais comuns associados com a proliferação de células neoplásicas (Borges et al., 2017; Chen Q, et al., 2009; Banerjee M, et al., 2010). A apoptose, morte celular programada inerente às células, é desencadeada por dois mecanismos principais: a via intrínseca e a via extrínseca. Em ambas, as caspases desempenham papel importante como mediadoras. As caspases iniciadoras, caspase-8 e caspase-9 têm a função de clivar pró-formas inativas de caspases efetoras, tais como caspase-3 e caspase-7, cujas

formas ativas conduzem à morte celular por apoptose. Algumas proteínas da via PI3K/AKT/mTOR estão diretamente relacionadas a esse processo, como p53 e AKT (Koff et al., 2015).

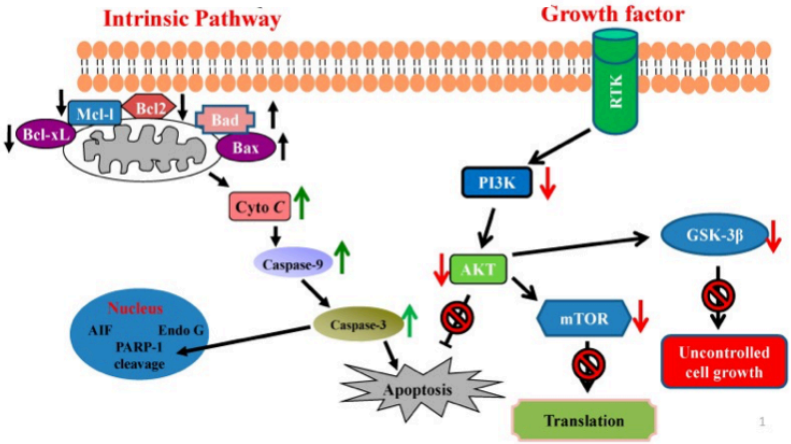

Figura 2. Imagem adaptada de Wu et. al., 2016 demonstrando que durante a apoptose, observa-se redução na expressão de proteínas PI3K e AKT, causando a inibição da ativação de mTOR, por sua vez reduzindo a proliferação celular, concominantemente ocorre um aumento na expressão de Caspase-3.

Tendo em vista a busca por tratamentos alternativos, os inibidores de mTOR surgem como uma possibilidade. A rapamicina, inibidor de mTOR, é um imunossupressor com propriedades antiproliferativas e efeito antitumoral. Em 2007, pela primeira vez um análogo da rapamicina, o temsirolimus, foi aprovado pela US FDA (*Food and Drug Administration)* para tratamento de carcinoma de células renais (Piguet et al., 2014).

Um outro análogo da rapamicina ganhou destaque, o everolimus, uma droga semi-sintética aprovada pela FDA para tratamento de câncer de rim, tumor neuroendócrino de pâncreas e câncer de mama (Chiarini et al., 2010). O everolimus atua por inibição de mTORC 1, assim como os outros rapanálogos, e tem-se demonstrado sua capacidade de inibir a proliferação endotelial

e angiogênese ao atuar na via PI3K/AKT (Chiang et al., 2007; Piguet et al., 2014).

Dentro do contexto da inibição da via PI3K/AKTmTOR, aparece a curcumina, um polifenol natural isolado da planta *Curcuma longa*. A Curcumina mostrou-se efetiva na redução de células neoplásicas por inibição da via AKT/mTOR em diversas linhagens celulares, tais como de leucemia, câncer mamário e colorretal (Guo et al., 2014; Mock et al., 2015; Johnson et al., 2009). Tem sido amplamente estudada por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais, por possuir efeito positivo no tratamento de doenças crônicas e ter se mostrado efetiva na terapia de diferentes tipos de câncer (He et al, 2015; Marchiani et al., 2014; Kim et al., 2009).

O mecanismo de ação da curcumina aponta para interferências na proliferação celular e na via de sinalização do mTOR, na qual ocorre a inibição do complexo proteico mTORC1 e indução de apoptose das células neoplásicas (Aggarwal et al., 2004) eventos que também contribuem com a redução da proliferação celular (Marques et al., 2015).

Diante destes estudos, o presente trabalho teve como objetivo geral averiguar os efeitos da curcumina em linhagens humanas de células de carcinoma de cabeça e pescoço através da análise das alterações morfológicas celulares do citoesqueleto, bem como a expressão da proteína pró-apoptótica caspase-3.

2. Materiais e Métodos

2.1 Inibidores de mTOR

Foram utilizados os inibidores de mTOR everolimus e curcumina. Ambos foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) em forma liofilizada e com grau de pureza de padrão analítico. Para realização dos experimentos os dois inibidores, everolimus (referência 07741, peso molecular 958,220 u) e curcumina (referência 08511, peso molecular 368,380 u) foram diluídos em DMSO nas concentrações de 10436 e 9953

μM respectivamente. Essas soluções foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

2.2 Cultura celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares provenientes de células humanas: SCC-9 (carcinoma espinocelular de língua) e FaDu (carcinoma espinocelular de hipofaringe). Todas as linhagens foram doadas pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e estão descritas na American Type Culture Collection (ATCC). Para a linhagem SCC-9 foi utilizado meio de cultura Dulbelcco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12, na proporção de 1:1, acrescido de Soro Fetal Bovino a 10%, penicilina e estreptomicina nas concentrações de 100ng/mL e 1μg/mL e hidrocortisona a 400ng/mL. Para linhagem FaDu, o meio de cultura também foi o DMEM complementado com soro fetal bovino à 10%, penicilina e estreptomicina à 1%. Os meios de cultura foram esterilizados por filtração em membrana de 0,2μm e mantidos à 4°C, sendo aquecidos em banho-maria a 37°C antes do uso. As células foram mantidas em incubadora com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C.

2.3 Teste de viabilidade celular (MTT) – Curva dose-resposta

O teste de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difenil) tetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular. Esse teste avalia a capacidade das enzimas mitocondriais celulares em converter o MTT em formazam. Os cristais de formazam se apresentam com uma coloração arroxeada, que após diluição em solvente alcoólico, podem ter sua absorbância aferida e comparada à absorbância do controle.

Para o experimento, as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $5x10^3$ células/poço e mantidas por 24 horas em incubadora nas condições ideais. Após esse período as células foram tratadas

com inibidores de mTOR, diluídos em meio de cultura para atingir concentrações específicas para cada inibidor de acordo com a curva dose-resposta. Para curcumina as concentrações utilizadas foram 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,75 μM e para everolimus 10, 7,5, 5, 2,5, 1,25, 0,75 e 0,375 μM por 24 horas. As células controle foram tratadas com DMSO com concentrações semelhantes à maior utilizada com cada um dos inibidores de mTOR. Após 24 horas de tratamento, 10 μL de solução MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) a 5mg/mL foram adicionados aos poços. Após 4 horas, os cristais de formazam foram diluídos com isopropanol acidificado e a absorbância verificada em uma leitora de microplaca a 570 nm (Thermo Plate TP Reader). Para obter viabilidade resultante do tratamento, a absorbância das células tratadas foi comparada à absorbância de seu controle, estabilizado como 100% de células viáveis.

O IC_{50}, concentração necessária para induzir 50% de citotoxicidade celular, dos inibidores foi calculado e o resultado obtido tornou possível estimar o índice de seletividade tumoral (IST) a partir da razão entre o IC_{50} obtido para as células controle e para as células neoplásicas (FaDu e SCC-9) conforme publicado por Horii et al., 2012.

2.4 Análise de citoesqueleto

Para análise de alterações no citoesqueleto as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro em placas de 12 poços (concentração de 1,6 x 10^5 células/poço) e tratadas com curcumina, everolimus ou DMSO. Após o tratamento células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente, seguida de três lavagens com PBS 1x durante 5 minutos cada lavagem. Células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% por 10 minutos e depois lavadas com PBS 1x três vezes por 5 minutos cada. As células foram incubadas com Faloidina conjugada com fluoresceina 1:200 (Fluorescein Phalloidin, Invitrogen, OR, USA) por 50 minutos na

ausência de luz e no gelo, seguida de três lavagens com PBS 1x por 5 minutos na ausência de luz. As lamínulas contendo as células foram montadas em lâminas para análise em microscópio com 10µL de meio de montagem adicionado de DAPI (DAPI Fluoromount-G, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). As imagens foram capturadas em aumento de 20X e 40X em microscópio de fluorescência Axio Imager.M2 e analisadas no software Zen (ZEISS, Oberkochen, Alemanha). Um total de 15 núcleos e citoplasmas foram dimensionados de cada amostra. Esse experimento foi realizado em triplicata.

2.5 Western Blot

Para análise da expressão de proteínas as células foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de $5x10^5$ e tratadas com a concentração IC_{50} dos inibidores de mTOR por 24 horas. As células foram lavadas com PBS 1X, lisadas e coletadas. As amostras foram centrifugadas a 15.000g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi mantido a -80°C até a sua utilização. Um total de 30µg de proteínas extraídas foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida a 10%, transferidas para membranas bloqueadas com solução bloqueadora (leite desnatado a 5% em TBST). As membranas foram incubadas overnight a 4°C, na presença dos anticorpos primários para Caspase-3 e GAPDH (controle) (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA). Após seis lavagens com TBST, as membranas foram incubadas por 1 hora e 4°C com anticorpo secundário. Novas lavagens foram realizadas e as bandas visualizadas utilizando-se de um kit de detecção de quimioluminescência (Amersham ECL Prime, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) em um fotodocumentador (Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences, Litte Chalfont, UK).

2.6 Análise estatística

Para o cálculo do IC_{50} foram realizadas curvas dose-resposta, com as quais os valores foram estabelecidos através de uma regressão não-linear com variável *slope* da dose de inibição *versus* resposta. As amostras de diâmetro dos núcleos e de diâmetro celular foram consideradas de distribuição normal, analisadas pelo teste One Way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

3. RESULTADOS

Nas células de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9) a curcumina resultou em IC_{50} de 40,93 μM e o everolimus de 12,85 μM em 24 horas. Nas células de carcinoma espinocelular de hipofaringe (FaDu) a curcumina resultou em IC_{50} de 24,84 μM e o everolimus de 27,4 μM em 24 horas (Borges et al., 2017).

Na análise de alteração de citoesqueleto, as células controle tratadas com DMSO (Figura 3), apresentaram-se mononucleadas, com núcleos bem definidos, com formato ovóide, no centro das células, circundado por filamentos de F-actina bem organizados, formando uma rede com padrão de fibras de stress (Figura 3-A).

Nas células tratadas com everolimus (Figura 4) observou-se a presença de células multinucleadas (Figura 4-B). Percebeu-se também uma desorganização no citoesqueleto, com diminuição do número de filamentos de F-actina, e uma redução evidente das fibras de stress.

Nas células tratadas com curcumina (Figura 5) as alterações no núcleo e no citoesqueleto tornam-se ainda mais evidentes, com a presença de células multinucleadas (Figura 5). As fibras de stress claramente visíveis no controle, e ainda presentes no tratamento com everolimus, praticamente

desapareceram após tratamento com curcumina. Há uma nítida desorganização na rede de fibras de F-actina.

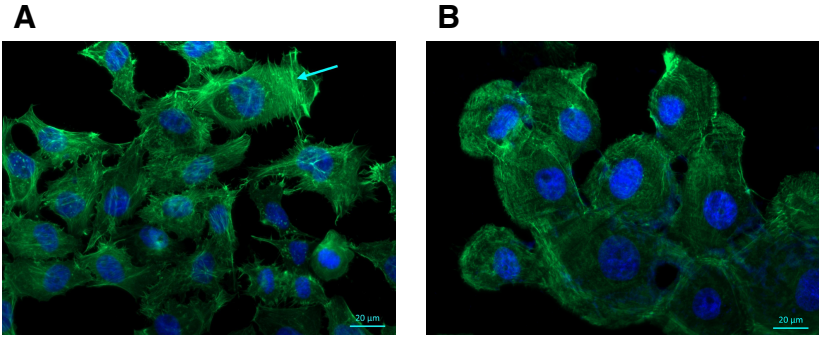

Figura 3. Células FaDu (A) e SCC9 (B), tratadas com DMSO - células controle. Células coradas com DAPI e faloidina. Analisadas em microscopia de fluorescência. A seta na figura A evidencia as fibras de stress de F-actina.

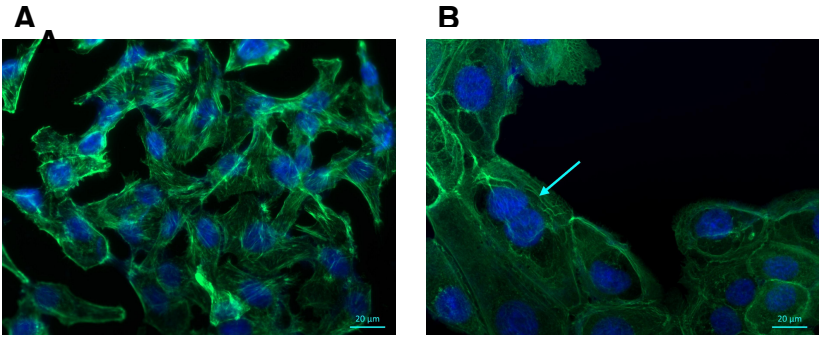

Figura 4. Células FaDu (A) e SCC9 (B), tratadas com everolimus. Células coradas com DAPI e faloidina. Analisadas em microscopia de fluorescência. A seta na figura B indica a presença de uma célula binucleada.

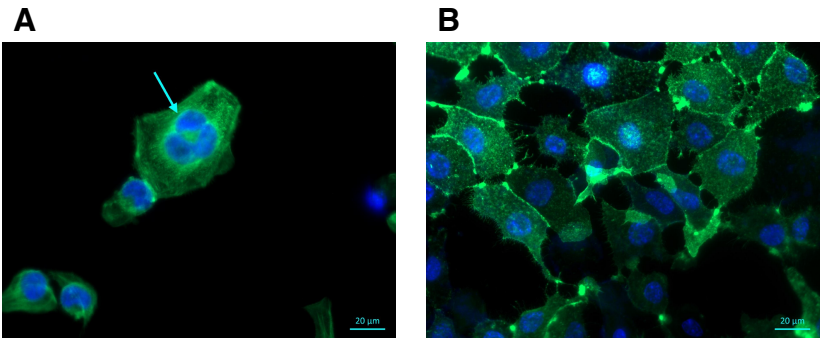

Figura 5. Células FaDu (A) e SCC9 (B), tratadas com curcumina. Células coradas com DAPI e faloidina. Analisadas em microscopia de fluorescência. A seta na figura A indica a presença de uma célula multinucleada.

Nas células tratadas com curcumina as alterações no núcleo e no citoesqueleto tornam-se ainda mais evidentes. O núcleo parece estar em formato circular, além da presença de células multinucleadas (Figura 5). As fibras de stress claramente visíveis no controle, e ainda presentes no tratamento com everolimus, praticamente desapareceram após tratamento com curcumina. Há uma nítida desorganização na rede de fibras de F-actina.

Quanto ao diâmetro dos núcleos, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as células FaDu controle e as células tratadas com everolimus ou curcumina. Quanto ao diâmetro da célula, também não foi observada diferença significativa (Figura 6).

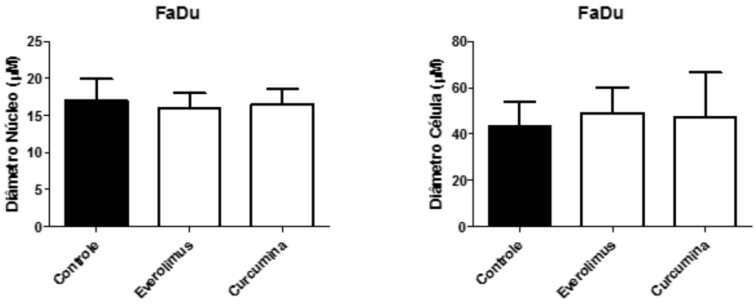

Figura 6. Diâmetro do núcleo e da célula em linhagem FaDu tratadas com DMSO (controle), everolimus e curcumina. Representação das médias de 15 medidas de células distintas, com desvio padrão p*<0,05.

É significativa a diferença entre o diâmetro do núcleo das células SCC9 controle quando comparado ao das células da mesma linhagem tratadas com curcumina. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entro o diâmetro do núcleo das células controle e o diâmetro do núcleo de células tratadas com everolimus. Quanto ao diâmetro da célula também não foi observada diferença significativa (Figura 7).

Não houve alterações estatisticamente significativas quanto a alterações no diâmetro das células em nenhum dos tratamentos, apenas na linhagem SCC9 tratada com curcumina houve uma redução significativa com relação ao diâmetro do núcleo.

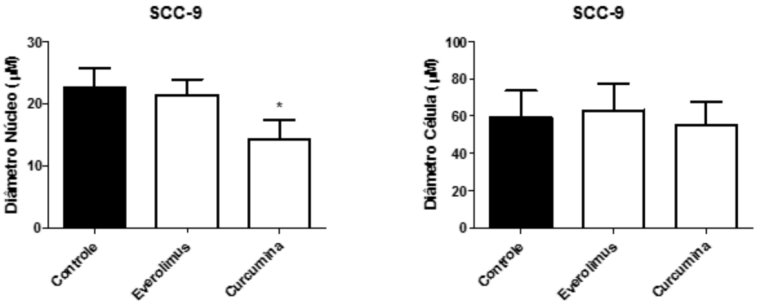

Figura 7. Diâmetro do núcleo e da célula em linhagem FaDu tratadas com DMSO (controle), everolimus e curcumina. Representação das médias de 15 medidas de células distintas, com desvio padrão p*<0,05.

O teste de Western Blot foi realizado com a linhagem FaDu e SCC9 tratadas com everolimus e com curcumina em seus respectivos IC50. O experimento foi realizado objetivando a análise da expressão da proteína pró-apoptótica caspase-3. Foi constatada a redução na expressão de pró-caspase-3 (Figura 8), o que significa que essa proteína foi clivada em caspase-3, sua forma ativa. Esse resultado sugere que a curcumina induz apoptose. A proteína GAPDH, uma proteína controle, apresentou-se de maneira uniforme em todos os *blots*, de ambas as linhagens, e em todos os tratamentos, como esperado.

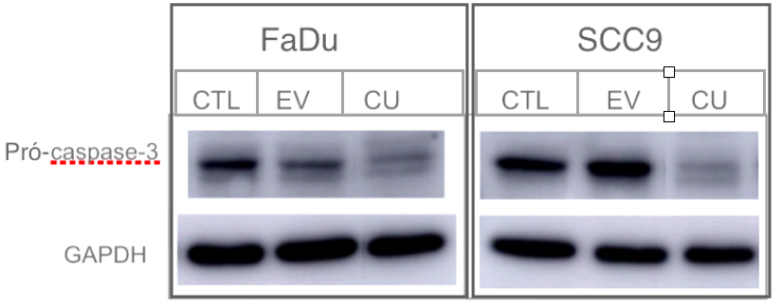

Figura 8. Teste de Western Blot para FaDu e SCC9. Sendo a primeira linha análise de expressão de proteína pró-caspase-3 e a segunda linha análise de expressão de GAPDH.

4. Discussão

A via PI3K/AKT/mTOR é uma via de sinalização em células de mamíferos e possui um papel fundamental no crescimento, na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Martelli et al., 2010). Alguns mecanismos podem levar à ativação dessa via nas neoplasias, tais como inativação da proteína p53, mutação do AKT e superexpressão dos efetores do mTOR (Fasolo, Sessa, 2012; Dowling et al., 2010, Memmel et al., 2017). Essa via e seus inibidores têm ganhado espaço nas pesquisas contra o câncer e se tornado objeto de estudo de diversos pesquisadores ao redor do mundo. A ativação da via PI3K/AKT/mTOR é importante para a sobrevivência e para o crescimento das células, uma vez que a inibição dessa via pode levar à apoptose (Syed et al., 2012).

A curcumina tem se mostrado efetiva na inibição da proliferação celular, um fenômeno importante durante a carcinogênese (Corrêa et al., 2009). Um estudo em células A549, de adenocarcinoma de pulmão humano, de Chen et al. (2009) mostrou que o tratamento com a curcumina a uma concentração

de 10 μM por 24 horas causou uma inibição da proliferação celular considerável, enquanto que um tratamento com 5 μM não mostrou resultados significativos. Holy (2002), em um estudo com células de câncer de mama, MCF-7, relata que o tratamento com 10 μM de curcumina mostrou-se mais efetivo do que 20 μM por 3 dias.

Um estudo elaborado por Jiao et al. (2016) descreveu que o pré tratamento com curcumina nas linhagens celulares de câncer de pulmão A549 e PC-9 poderia inibir a angiogênese ao bloquear a via PI3K/AKT/mTOR. O estudo correlacionou os efeitos da curcumina aos tratamentos com inibidores de mTOR como a rapamicina.

Uma das explicações para os efeitos anti-proliferativos da curcumina inclui o bloqueio de estágios específicos do ciclo celular (Holy, 2004) que pode ou não desencadear apoptose (Liu et al., 2011; Banik et al., 2017). A curcumina causa apoptose em células malignas de cólon e células de carcinoma basocelular, porém foi descrita por seu potencial de inibir apoptose em linfócitos-T de humanos e ratos, e em células HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) (Holy, 2002). Estudos mostram que a curcumina desencadeia falhas nos eventos mitóticos e uma pausa no ciclo na fase G2/M (Borges et al., 2017; Banerjee et al., 2010; Liu et al., 2011; Blakemore et al., 2012). A falha no processo mitótico pode ter por consequência a indução de morte celular via apoptose dependente da inativação da p-53 (Banerjee et al., 2010).

Alguns estudos apontam que a apoptose induzida pela curcumina pode estar relacionada à desorganização do citoesqueleto celular (Chen et al., 2009). Recentemente foi comprovado que a curcumina altera a expressão de proteínas importantes para a transição da fase G2/M, como a tubulina e a p53, sugerindo-se que a curcumina atua alterando a conformação do citoesqueleto (Banerjee et al., 2010; Gupta et al, 2006). Tanto a curcumina como o everolimus parecem interagir

sobre citoesqueleto das células, fato observado e descrito em nosso experimento. Ao avaliar mudanças no citoesqueleto, observou-se um declínio na polimerização de actina, sugerindo que a curcumina promove a remodelação das fibras de actina nessas células, como anteriormente descrito por Chen et al., (2014).

Em 2009, uma pesquisa com células A549 (células de adenocarcinoma de pulmão humano) demonstrou que células expostas à curcumina na concentração entre 5-40 μM resultam no rompimento da rede de filamentos de actina e que a desorganização dos filamentos de F-actina ocorre concomitantemente à apoptose celular (Chen et al., 2009). Outro estudo examinou o efeito da curcumina na atividade metastática de carcinomas hepatocelulares e indicou que curcumina a 20 μM causa uma diminuição na quantidade de F-actina dessas células (Holy, 2004). Esses experimentos corroboram com nossos achados, as células tratadas com curcumina e everolimus foram observadas em microscopia de fluorescência e os microfilamentos de F-actina estavam alterados quando comparados ao controle, com uma redução na densidade de filamentos e uma desorganização dos mesmos. No nosso experimento a concentração de curcumina utilizada na linhagem SCC-9 e FaDu foram respectivamente 40,93 μM e 24,84 μM, dentro da faixa de concentração dos estudos citados.

Holy (2004) examinou linhagens celulares de câncer de próstata, PC-3 e LNCaP, e observou uma alteração na mobilidade celular, no formato das células e na organização das fibras de F-actina quando da exposição das células cancerígenas à curcumina. Nesse estudo, as 2 linhagens de células de câncer de próstata sob a concentração de 60 μM de curcumina promoveram a formação de microfilamentos e aumentaram a quantidade de F-actina contrastando com os achados na literatura e com nossos resultados. Essa discrepância pode refletir uma diferença na resposta do citoesqueleto de diferentes

tipos celulares à curcumina. Um fato importante de se ressaltar com esse estudo é a concentração da curcumina utilizada para o experimento. Nos estudos relatados e no nosso experimento a dosagem máxima foi de 40 μM e no estudo de Holy (2004) a dosagem utilizada foi de 60 μM.

Algumas alterações foram analisadas no núcleo celular durante nosso experimento. Observou-se uma redução do tamanho do núcleo das células tratadas com everolimus e curcumina, quando comparado às células controle, além da presença de células multinucleadas. Em um estudo com células MCF-7 (células de câncer de mama) foi descrito que a curcumina estimula a micronucleação (Banerjee et al., 2010). Lee et al. (2016), sugeriu após experimento com HeLa e curcumina à 10 μM que as células quando tratadas com curcumina encolhem devido à ligação da curcumina aos microtúbulos. Holy (2002) em seu estudo com células MCF-7 demonstrou que em 3 dias de tratamento com 10 μM ou 20 μM de curcumina, consegue-se atingir o maior número de células multinucleadas com pouca morte celular.

5. Conclusão

O presente estudo demonstrou que a curcumina induz alteração na morfologia celular de linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço. As alterações no citoesqueleto, induzidas pelo tratamento, podem estar relacionadas às alterações na expressão de proteínas e interferências no ciclo celular. A atuação da curcumina se dá de forma similar a do everolimus, por inibição da via PI3K/AKT/mTOR. Todas essas alterações parecem ser dose-dependente e depender do tipo de célula envolvida, além de sugerir indução da apoptose.

Mais estudos aprofundando a ação da curcumina nas linhagens celulares de CCP humanas são necessários, pois a curcumina vem se mostrando uma alternativa de tratamento com grande potencial.

REFERÊNCIAS

Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. Int. J. Cancer. 2004 sep; 111(5):679-92.

Assad DX. Avaliação dos efeitos biológicos dos inibidores do mTOR associados ou não à radioterapia em linhagem celular de carcinoma de colo do útero [tese mestrado]. Brasília: Universidade de Brasília, 2015.

Banerjee M, Singh P, Panda D. Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. FEBS J. 2010 jul; 277:3437-448.

Banik U, Parasuraman S, Adhikary AK, Othman NH. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. J. Exp. Clin.Cancer Res. 2017 jul; 36:98.

Bar-Sela G, Epelbaum R, Schaffer M. Curcumin as an anti-cancer agent: review of the gap between basic and clinical applications. Curr Med Chem. 2010; 17(3):190-7.

Bian JL, Wang MM, Tong EJ, Sun J, Li M, Miao ZB, Li YL, Zhu BH Xu JJ. Benefit of everolimus in treatment of an intrahepatic cholangiocarcinoma patient with a PIK3CA mutation. World J.Gastroenterol. 2017 jun; 23(23):4311-316.

Blakemore LM, Boes C, Cordell R,.Manson MM. Curcumin-induced mitotic arrest is characterized by spindle abnormalities, defects in chromosomal congression and DNA damage. Carcinogenesis. 2012 nov; 34(2):351-60.

Borges GA, Rêgo DF, Assad DX, Coletta RD, Canto GDL, Guerra ENS. In vivo and in vitro effects of cur cumin on head and neck carcinoma: a systematic review. J Oral Pathol Med. 2017 apr; 46: 3-20.

Casati MFM, Vasconcelos JA, Vergnhanini GS, Contreiro PF, Graça TB, Kanda JL, Akerman M, Matos LL. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço. 2012 oct-nov-dec; 41(4):186-191.

Chen Q, Lu G, Wang Y, Xu Y, Zheng Y, Yan L, Jiang Z, Yang L, Zhan J, Wu Y, Zhou J. Cytoskeleton Disorganization during Apoptosis Induced by Curcumin in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. Planta Med. 2009 mar; 75(8):808-13.

Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. Trends Mol Med. 2007 Oct; 13(10):433-42.

Chiarini F, Evangelisti C, McCubrey JA, Martelli AM. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. Trends Pharmacol Sci. 2015;36(2):124-35. 40. Zhou H, Luo Y, Huang S. Updates of mTOR inhibitors. Anti-cancer agents in medicinal chemistry. 2010;10(7):571-81.

Corrêa MPD, Gollner AM, Guerra MCS, Ferreira AP, Rodrigues MF. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. An. Bras. Dermatol. 2009 jul; 84(6): 606-14.

Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. Biochim. Biophys. Acta. 2010 mar; 1804(3):433-9.

Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rego DF, Simeoni LA, Silveira D, Bazzo YMF, de Paula JE, Fagg CW, Barros IMC, Abreu WC, Junior DSP, Magalhães PO, Neves FAR, Porto AL, Guerra ENS. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. Clin. oral investig. 2015 apr; 19(3):637-46.

Elias ST, Salles PM, de Paula JE, Simeoni LA, Silveira D, Guerra ENS, Motoyama AB. Cytotoxic effect of Pouteria torta leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. J. of cancer res. ther. 2013; 9(4):601-6.

Fasolo A, Sessa C. Targeting mTOR pathways in human malignancies. Curr Pharm Des. 2012;18(19):2766-77

Guo Y, Shan Q, Gong Y, Lin J, Shi F, Shi R, Yang X. Curcumin induces apoptosis via simultaneously targeting AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK survival signaling pathways in human leukemia THP-1 cells. Pharmazie. 2014; 69(3):229-33.

Gupta KK, Bharne SS, Rathinasamy K, Naik NR, Panda D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. FEBS J. 2006 oct; 273(23):5320-332.

He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? Molecules. 2015 may; 20(5):9183-213.

Holy J. Curcumin Inhibits Cell Motility and Alters Microfilament Organization and Function in Prostate Cancer Cells. Cell Motil. Cytoskeleton. 2004 aug; 58(4):253–268.

Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. Mutat. Res. 2002 jun; 518(1):71–84.

Horii H, Suzuki R, Sakagami H, Umemura N, Ueda JY, Shirataki Y. Induction of non-apoptotic cell death in human oral squamous cell carcinoma cell lines by Rhinacanthus nasutus extract. In Vivo. 2012 mar-apr; 26(2):305-9.

Internation Agency for Research on Cancer (IARC). World Cancer Report. Lyon: Stewart BW, Kleihues P; 2017.

Jackson SJT, Murphy LL, Venema RC, Singletary KW, Young AJ. Curcumin binds tubulin, induces mitotic catastrophe, and impedes normal endothelial cell proliferation. Food Chem. Toxicol. 2013 oct; 60:431-38.

Jiao, D, Wang J, Lu W, Tang X, Chen J, Mou H, Chen Q. Curcumin inhibited HGF-induced EMT and angiogenesis through regulating c-Met dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in lung cancer. Mol. Ther. Oncolytics. 2016 aug; 3:16018.

Johnson SM, Gulhati P, Arrieta I, Wang X, Uchida T, Gao T, Evers BM. Curcumin Inhibits Proliferation of Colorectal Carcinoma by Modulating Akt/mTOR Signaling. Anticancer Res. 2009 aug; 29(8):3185-190.

Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians. Part 2: Epidemiology. Dent. update. 2015 may; 42(4):354-6,8- 9.

Kim D, Kim SJ, Kang SS, Jin EJ. Curcumin inhibits cellular condensation and alters microfilament organization during chondrogenic differentiation of limb bud mesenchymal cells. Exp. Mol. Med. 2009 sep; 41(9):656-64.

Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. International journal of molecular sciences. 2015;16(2)2942-55.

Lee JK, Park S, Kim SY, Um SH, Moon EY. Curcumin hampers the antitumor effect of vinblastine via the inhibition of microtubule dynamics and mitochondrial membrane potential in HeLa cervical cancer cells. Phytomedicine. 2016 jun; 23(7):705-13.

Lin YC, Chen HW, Kuo YC, Chang YF, Lee YJ, Hwang JJ. Therapeutic Efficacy Evaluation of Curcumin on Human Oral Squamous Cell Carcinoma Xenograft Using Multimodalities of Molecular Imaging. Am. J. Chin. Med. 2010; 38(2):343-58.

Lin YL, Lin CY, Chi CW, Huang YT. Study on Antifibrotic Effects of Curcumin in Rat Hepatic Stellate Cells. Phytother. Res. 2009 jul; 23(7):927-32.

Liu HS, Ke CS, Cheng HC, Huang CYF, Su CL. Curcumin-Induced Mitotic Spindle Defect and Cell Cycle Arrest in Human Bladder Cancer Cells Occurs Partly through Inhibition of Aurora A. Mol. Pharmacol. 2011 jul; 80:638-46.

Marchiani A, Rozzo C, Fadda A, Delogu G, Ruzza P. Curcumin and Curcumin-like Molecules: From Spice to Drugs. Curr. Med. Chem. 2014; 21(2):204-22.

Marques AE, Elias ST, Porporatti AL, Castilho RM, Squarize CH, De Luca GC, Guerra E. mTOR pathway protein immunoexpression as a prognostic factor for survival in head and neck cancer patients: a systematic review and meta-analysis. J. Oral Pathol. Med. 2015 dec; 45(5):319-28.

Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Grimaldi C, Ognibene A, Manzoli L, Billi AN, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/ mammalian target of rapamycin signaling network and the control of normal myelopoiesis. Histology and histopathology. 2010; 25(5):669-80

Memmel S, Sisario D, Zoller C, Fiedler V, Kastzer A, Heiden R, et al. Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities. Oncotarget. 2017 Jul 11; 8(28): 45298-4531.

Mock CD, Jordan BC, Selvam C. Recent Advances of Curcumin and its Analogues in Breast Cancer Prevention and Treatment. RSC Advances. 2015 sep; 5(92).

National Institutes of Health. FDA Approval for Everolimus Bethesda: National Cancer Institute at the National Institute of Health; 2015. Available from: http://www.cancer.gov/about-cancer/ treatment/drugs/fda- everolimus

Pezzuto F, Buonaguro L, Caponigro F, Ionna F, Starita N, Annunziata C, Buonaguro FM, Tornesello ML. Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies. Oncology. 2015 may; 89(3):125-36.

Piguet AC, Madjumder S, Maheshwari U, Manjunathan R, Saran U, Chatterjee, et al. Everolimus is a potent inhibitor of activated hepatic stellate cell functions in vitro and in vivo, while demonstrating anti-angiogenic activities. Cila Sci (Lond). 2014 Jun; 126(11):775-84.

Syed F, Sherrie D, Paus R, Varmeh S, Singh S, Pandolfi PP, et al. Keloid disease can be inhibited by antagonizing excessive mTOR signaling with a novel dual TORC1/2 inhibitor. 2012 Nov; 181(5): 1642-58.

Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, Okpokam A, Sloan P, Odell E, Robinson M. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. J Clin Pathol. 2011 apr; 64(4):308-12.

Tian B, Zhao Y, Liang T, Ye X, Li Z, Yan D, Fu Q, Li Y. Curcumin inhibits urothelial tumor development by suppressing IGF2 and IGF2-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. J. Drug Target. 2017 mar; 25(7):626-36.

Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. Br. J. Nutr. 2015 apr; 113 Suppl 2:S102-10.

Willems L, Tamburini J, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. Curr Oncol Rep. 2012;14(2):129-38.

Wu YJ, Wong BS, Yea SH, Lu CI, Weng SH. Sinularin Induces Apoptosis through Mitochondria Dysfunction and Inactivation of the pI3K/Akt/mTOR Pathway in Gastric Carcinoma Cells. Mar Drugs. 2016 jul; 14(8):142.

Zhou H, Luo Y, Huang S. Updates of mTOR inhibitors. Anti-cancer agents in med. chem. 2010 sep; 10(7):571-81.

ANEXO

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 Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

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: ***I***ncreased 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, https://doi.org/10.1029/2001JB000884. 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.