

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Marcela Gonçalves de Souza

Efeito dos transtornos de ansiedade no desenvolvimento do Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço e avaliação do efeito antineoplásico do extrato de semente de *Persea americana* Mill nas linhagens SCC9, CAL 27 e Hacat

Montes Claros/MG
2022

Marcela Gonçalves de Souza

Efeito dos transtornos de ansiedade no desenvolvimento do Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço e avaliação do efeito antineoplásico do extrato de semente de *Persea americana* Mill nas linhagens SCC9, CAL 27 e Hacat

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Coorientador: Prof(a). Dr(a). Lucyana Conceição Farias

Montes Claros
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Professor Antônio Alvimar Souza

Vice-Reitora: Professora Ilva Ruas de Abreu

Pró-Reitora de Pesquisa: Professora Clarice Diniz Alvarenga Corsato

Coordenadoria de Controle e Acompanhamento de Projetos: Professor Virgílio Mesquita
Gomes

Coordenadoria de Iniciação Científica: Professor Marcelo Perim Baldo

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Professora Sara Gonçalves Antunes de Souza

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Professor André Luiz Sena Guimarães

Coordenadoria de Pós-Graduação Lato Sensu: Professor Allysson Steve Mota Lacerda

Coordenadoria de Pós-Graduação Stricto Sensu: Professor Marcos Flávio Silveira
Vasconcelos D'Ângelo

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora: Professora Cristina Andrade Sampaio

Coordenador Adjunto: Professor Renato Sobral Monteiro Junior

S729e

Souza, Marcela Gonçalves de.

Efeito dos transtornos de ansiedade no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e avaliação do efeito antineoplásico do extrato de semente de *Persea americana mill* nas linhagens SCC9, CAL 27 e HacaT [manuscrito] / Marcela Gonçalves de Souza. – Montes Claros (MG), 2022.

75 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde /PPGCS, 2022.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães.

Coorientadora: Profa. Dra. Lucyana Conceição Farias.

1 Transtornos da ansiedade - Efeitos. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Abacate - Semente. 4. Câncer - Tratamento. I. Guimarães, André Luiz Sena. II. Farias, Lucyana Conceição. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

Anexo nº Folha Aprovação - Marcela - Tese/UNIMONTES/PRPG/PPGCS/2022

PROCESSO Nº 2310.01.0004876/2022-42

Data da Defesa: 11/08/2022

NOME DO(A) DISCENTE: MARCELA GONÇALVES DE SOUZA

() Mestrado Acadêmico em Ciência Da Saúde

(x) Doutorado Acadêmico em Ciências Da Saúde

TÍTULO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC):

"EFEITO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE NO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO E AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO EXTRATO DE SEMENTE DE PERSEA AMERICANA MILL"

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças

BANCA (TITULARES)

PROF. DR. André Luiz Sena Guimarães

ORIENTADOR

PROF. DR. Otávio Cardoso Filho

PROF^a. DR^a Eliane Macedo Sobrinho Santos

PROF^a. DR^a Paula Rocha Moreira

PROF. DR. Flávio Júnior Barbosa Figueiredo

BANCA (SUPLENTE)

PROF. DR. João Marcus Oliveira Andrade

PROF. DR. Gefer Thiago Batista Corrêa

PROF. DR. Marcelo Perim Baldo

A análise realizada pelos membros examinadores da presente defesa pública de TCC teve como resultado parecer de:

[x] **APROVAÇÃO**

[] **REPROVAÇÃO**



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Sena Guimarães, Professor(a)**, em 11/08/2022, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Macedo Sobrinho Santos, Usuário Externo**, em 11/08/2022, às 19:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Rocha Moreira, Usuário Externo**, em 17/08/2022, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávio Júnior Barbosa Figueiredo, Usuário Externo**, em 17/08/2022, às 14:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Otávio Cardoso Filho, Professor de Educação Superior**, em 24/08/2022, às 20:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **51092823** e o código CRC **C4BC2A9D**.

Referência: Processo nº 2310.01.0004876/2022-42

SEI nº 51092823

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde para percorrer essa etapa;

Agradeço imensamente aos meus pais Nulcí e José Luiz (*in memoria*) por sempre me apoiarem em todos os meus sonhos e em cada passo e etapa da minha vida, por todo amor e carinho, pela compreensão e toda a torcida;

A minha irmã/amiga/madrinha Gabriela que sempre estar ao meu lado, por cada ajuda e por sempre me proteger;

A Sabrina pelo companheirismo, pela amizade dentro e fora da pós-graduação;

Emisael pelos ensinamentos e parceria no biotério;

A André, Lucyana, Patrícia e Carlos por todo ensinamentos e paciência ao longo destes anos que muito contribuíram para meu crescimento;

As minhas meninas Lorena Barbosa e Amanda Dias pela contribuição do trabalho animal, meninas as idas ao biotério se tornaram mais leves com vocês;

A Daniela Pola, Lorena, Lílian, Jaciara, Victor Hugo (Vituuu) e tantos outros que construir no Laboratório de Pesquisa em Saúde pela convivência diária;

A Marileide por todo cuidado e carinho com todos do laboratório;

A Rogério e Daniel pelas conversas descontraídas, pelas zoeira e amizade.

Agradeço aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde muito que contribuíram para minha formação;

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães, pelos ensinamentos, confiança e por todas as contribuições durante esses 10 anos de jornada científica e pessoal.

Ao Laboratório de Pesquisa em Saúde, pela estrutura oferecida e por possibilitar a realização deste trabalho.

Agradeço a FAPEMIG, pela concessão da bolsa de Doutorado. A CAPES e CNPq pelo financiamentos dos projetos.

À banca avaliadora disponibilidade de fazerem parte da mesma e pelas contribuições para o trabalho.

Agradeço a todos que de uma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Por ano são diagnosticadas mais de 650.000 neoplasias de cabeça e pescoço em todo o mundo. Mais de 90% das neoplasias de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas. Alguns dos principais fatores de risco para essa neoplasia incluem o uso de tabaco, associado ao consumo de álcool. A radiação é uma das principais modalidades de tratamento para o manejo do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e as decisões de tratamento são determinadas levando em consideração fatores como o local primário, estágio, acessibilidade cirúrgica, dentre outros fatores. Nosso primeiro estudo teve como objetivo avaliar se o transtorno de ansiedade (TA) está relacionado ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP). Este estudo é a combinação de um estudo básico animal e um estudo retrospectivo de caso e controle de pacientes com e sem a neoplasia. Como resultado, obtivemos que o estresse reduziu a atividade locomotora dos animais do grupo estresse e estresse + 4NqO ($p < 0,0001$). O estresse não mostrou influência na progressão da neoplasia em camundongos. Da mesma forma, o grupo caso não apresentou diferenças nos escores de ansiedade em relação ao controle. Além disso, não foi observada associação entre o estadiamento do CCECP e os escores de ansiedade em pacientes. Em conclusão, nossos achados *in vivo* em humanos e animais mostraram que não há relação entre TA e CCECP. O segundo estudo é um piloto do efeito de um extrato butanólico da semente de *Persea Americana* que nos mostrou que possui forte potencial para se tornar um estudo mais robusto e completo. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito de um tratamento extrato para uma neoplasia oral. Os dados *in vitro* preliminares demonstram que o extrato butanólico pode ser um tratamento adjuvante aos tratamentos comumente realizados. Ressaltamos que ainda é necessário realizar mais análises *in vitro* e um estudo *in vivo* como a formação de espécies reativas de oxigênio e a morte celular pelo método de brometo de etídio e laranja de acridina para entendermos qual o mecanismo que atua o extrato atua nas células neoplásicas. Acreditamos que poderemos ter mais dados promissores para o tratamento da neoplasia oral.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço; Transtorno da Ansiedade; Extrato.

ABSTRACT

More than 650,000 head and neck cancers are diagnosed each year worldwide. More than 90% of head and neck cancers are squamous cell carcinomas. Some of the main risk factors for this neoplasm include tobacco use and alcohol consumption. Radiation is one of the main treatment modalities for the management of head and neck squamous cell carcinoma and treatment decisions are determined taking into account factors such as primary site, stage, surgical accessibility, among other factors. Our first study aimed to assess whether anxiety disorder (AD) is related to the development of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). This study is a combination of a baseline animal study and a retrospective case and control study of patients with and without cancer. As a result, we found that stress reduced the locomotor activity of animals in the stress and stress + 4NqO group ($p < 0.0001$). Stress showed no influence on the progression of cancer in mice. Likewise, the case group showed no differences in anxiety scores in relation to the control. In addition, no association was observed between the staging of the HNSCC and the anxiety scores in patients. In conclusion, our in vivo findings in humans and animals showed that there is no relationship between AD and HNSCC. The second study is a pilot study of the effect of a butanolic extract from the seed of *Persea Americana* which showed us that it has strong potential to become a more robust and complete study. The pilot study aimed to evaluate the effect of a herbal treatment for an oral neoplasm. Preliminary in vitro data show that the butanolic extract can be an adjuvant treatment to commonly performed treatments. We emphasize that it is still necessary to carry out more in vitro analyzes and an in vivo study such as the formation of reactive oxygen species and cell death by the ethidium bromide and acridine orange method to understand the mechanism that the extract acts on neoplastic cells. We believe that we may have more promising data for the treatment of oral cancer.

Keywords: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, Anxiety Disorder, Herbal Medicine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço.....	10
1.2 Distúrbios da Ansiedade.....	12
1.3 Tratamentos.....	14
1.4 <i>Persea Americana</i> Mill.....	16
1.5 Cromatografia.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 PRODUTOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS GERADOS.....	22
3.1 Artigo 1: Might anxiety disorders promote Head and neck cancer development?.....	23
3.2 Artigo 2: Active compound base on <i>Persea americana</i> Mill seed extract with antineoplastic effect on oral squamous cell carcinoma	40
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço continua representando uma carga global significativa de doenças e mais de 90% dos neoplasias de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas (CCECP) (1, 2). É preocupante o aumento da incidência e mortalidade do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, com maior aumento nos países em desenvolvimento (2). Em todo o mundo, mais de 650.000 cânceres de cabeça e pescoço são diagnosticados a cada ano, e cerca de 50% dos pacientes são vencidos pela doença. Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço desenvolvem-se a partir do epitélio da mucosa da cavidade oral, faringe e laringe (1). Alguns dos principais fatores de risco incluem uso de tabaco, consumo de álcool e infecção pelo vírus do papiloma humano 16 (HPV16) (3). O tabaco é composto por mais de 5.000 produtos químicos diferentes, dos quais dezenas demonstraram ter atividade cancerígena, entre eles: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), incluindo benzo(a)pireno e nitrosaminas, incluindo 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1- butanona (NNK) e N-nitrosornicotina (NNN) que se acredita serem os maiores responsáveis pelos efeitos cancerígenos do tabaco (4, 5). É importante ressaltar que usuários pesados de ambas as substâncias têm risco >35 vezes maior de desenvolver CEC de cabeça e pescoço (3). Além dos fatores extrínsecos para o CCECP existe os fatores intrínsecos que são fatores genéticos também contribuem para o risco de CCECP, os polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo carcinogênico e na imunidade são exemplos de fatores genéticos associados a um risco aumentado de desenvolver CCECP (6).

Normalmente a progressão para CECCP invasivo começa com hiperplasia de células epiteliais, seguida por displasia leve, moderada ou grave, carcinoma *in situ* e, por fim, carcinoma invasivo. No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos pacientes diagnosticados com CECCP não tem histórico de lesão pré-maligna pré-existente.

Os homens têm risco entre 2 a 4 vezes maior do que as mulheres para desenvolver CCECP. A idade que mais pessoas são diagnosticadas com CCECP não relacionado ao HPV é em média de 66 anos, enquanto a idade média de diagnóstico para câncer de orofaringe associado ao HPV e

câncer de nasofaringe associado ao vírus Epstein-Barr é de aproximadamente 53 anos e 50 anos, respectivamente (7, 8).

O método de diagnósticos atual para CCECP é exame histológico patológico (9), a falta de marcadores para o diagnóstico precoce, o CCECP de cabeça e pescoço não é facilmente detectado e diagnosticado, e 60% dos pacientes quando diagnosticados estão em estágio avançado no momento do tratamento (1, 9). Os pacientes frequentemente apresentam doença em estágio avançado e as características de invasão e metástase precoces criam uma morbidade significativa e impacto na qualidade de vida. Por essas razões, apesar dos avanços no tratamento, a sobrevida em 5 anos do câncer de cabeça e pescoço permanece em torno de 60%, o que só melhorou ligeiramente nas últimas décadas (2). As decisões de tratamento são determinadas levando-se em consideração fatores como local primário, estágio, acessibilidade cirúrgica, morbidade associada e saúde geral do paciente. Com a recorrência após o manejo definitivo da doença avançada, as opções de tratamento são limitadas e geralmente resultam em baixa qualidade de vida e sobrevida. A fim de melhorar o controle local-regional e a sobrevida, pacientes selecionados com câncer de cabeça e pescoço de alto risco recebem radioterapia adjuvante, com ou sem quimioterapia concomitante ter sintomas específicos, como disfunção oral e problemas de deglutição e fala, durante o tratamento, que geralmente melhoram 6 meses após o tratamento (10).

A radiação é uma das principais modalidades de tratamento para o manejo do CCECP. A doença em estágio inicial geralmente é tratada com radiação ou cirurgia; a doença locorregionalmente avançada geralmente é tratada com abordagens combinadas, incluindo cirurgia seguida de terapia adjuvante, quimiorradiação definitiva ou biosseleção. Portanto, um determinante crítico do controle local de CCECP é dependente da sensibilidade do tumor à radiação (11). O papel significativo da radiação ionizante para o manejo do CCECP é irrefutável. Atualmente, um grande número de pacientes com CCECP são submetidos a alguma forma de radioterapia por feixe externo (EBRT). A terapia de radiação modulada por intensidade (IMRT) é uma forma de EBRT que fornece doses de radiação muito precisas para todo o tumor ou áreas específicas dentro do tumor, utilizando aceleradores de raios-X controlados por computador que se conformam com a estrutura tridimensional do tumor. Isso ajuda a reduzir significativamente os danos ao tecido normal vizinho durante o tratamento (11).

É comum encontrarmos estudos que associam diversas doenças infarto, hipertensão diabetes e as neoplásicas (12-15). Os distúrbios psicológicos são poucos relacionado as neoplasias e é

relatado que este aspecto é negligenciado pelos médicos no tratamento das neoplasias (16, 17). Os distúrbios psicológicos podem ser relacionados de uma reflexão ao diagnóstico do câncer (18), mas em alguns pacientes, essa reação pode persistir, causando uma sobrecarga durante todo o tratamento e dificultando o processo geral e controle dos sintomas, aumento do tempo de internação e até mesmo a diminuição da adesão ao tratamento (16, 19, 20).

1.2 Distúrbios da ansiedade

Na 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais a ansiedade é definida como a antecipação de uma ameaça futura; distingue-se do medo pela resposta emocional a uma ameaça iminente real ou percebida (21, 22). Os transtornos de ansiedade representam um dos principais grupos de transtornos na psiquiatria e também no restante da medicina (23). No Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais *III* (1980), o capítulo dos transtornos de ansiedade incluía (i) Transtornos fóbicos, subdivididos em Agorafobia, com ou sem ataques de pânico, Fobia Social e Fobia Simples; (ii) Estados de ansiedade, subdividido em transtorno do pânico (TP), transtorno da ansiedade generalizada (TAG) e transtorno obsessivo-compulsivo (TOC); e (iii) Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) (22).

A ansiedade é fundamental para a sobrevivência, o cérebro e os sistemas fisiológicos que mediam o medo e a ansiedade foram altamente conservados evolutivamente (24). A esse transtorno pode ser adaptativa, onde funciona para sinalizar ameaças ou perigos potenciais no ambiente e facilita o acompanhamento de estratégias de enfrentamento. Ou pode ser ansiedade patológica também denominada de ansiedade mal-adaptativa que é caracterizada por ansiedade excessivamente intensa ou que ocorre em situações ou contextos que, de outra forma, não seriam esperados por provocar ansiedade. As características da ansiedade patológica incluem preocupação excessiva, hipervigilância, excitação fisiológica e comportamentos de evitação (24).

A propensão a desenvolver transtornos de ansiedade é de aproximadamente 30% a 50% hereditária (25) e, como em outros transtornos psiquiátricos, a genética é complexa e envolve vários genes, cada um contribuindo com pequenas quantidades para o risco genético geral. Os fatores não genéticos que contribuem para o risco de transtornos de ansiedade, que não são específicos da ansiedade, envolvem experiências precoces como estilo parental (26),

aprendizagem social (27) e adversidades na infância, que podem incluir exposição ao estresse, maus-tratos e menor status socioeconômico (28, 29). Traços de personalidade que estão associados ao aumento da reatividade ao estresse e ao afeto negativo, como o neuroticismo, também têm sido associados a transtornos ansiosos e depressivos (30).

A síndrome de TEPT é uma mistura de memórias intrusivas do evento traumático, evitação de lembranças dele, entorpecimento emocional e hiperexcitação (31, 32). A reatividade a sinais relacionados ao trauma se correlaciona com a gravidade do transtorno (33, 34).

Existem diversos métodos para investigação da ansiedade, o mais comumente é o o Inventário de Ansiedade de Beck (do inglês Beck Anxiety Inventory (BAI)). O BAI foi desenvolvido para atender à necessidade de um instrumento que discriminasse de forma confiável a ansiedade da depressão, ao mesmo tempo que apresentasse validade convergente. O BAI oferece vantagens para fins clínicos e de pesquisa sobre as medidas de auto-relato de ansiedade em comparação a instrumentos já existentes (35, 36). Os animais também apresentam transtorno de ansiedade e existem diversos métodos para induzir e avaliar a ansiedade nos animais. Os modelos animais para indução da ansiedade podem ser divididos em testes não condicionados que consiste em modelos baseados em exploração como: Labirinto em cruz elevado, Labirinto zero elevado, Labirinto em T elevado, Caixa claro-escuro, Teste de placa de furo, Alimentação suprimida por novidade, Teste de interação social. Já os testes condicionados consistem em: Testes de conflito operante condicionado que são os Teste de Geller-Seifter, Teste de conflito de Vogel. E os Testes de condicionamento clássico como Respostas de condicionamento emocional, Vocalização de condicionamento ultrassônico, Sobressalto potencializado pelo medo e Teste de aversão ao lugar (37).

Evidências sugerem que os transtornos da ansiedade pode estar associada ao desenvolvimento do CCECP (38, 39). A ansiedade é uma resposta comum, com 10,3% dos pacientes recebendo tratamento para câncer (40). A experiência do câncer é frequentemente categorizada pela imprevisibilidade, incerteza, tratamentos estressantes e ameaças antecipatórias contínuas (41). Entre os pacientes com câncer, a ansiedade pode se manifestar em pensamentos intrusivos, hiperexcitação e sintomas de evitação semelhantes aos experimentados após outros eventos traumáticos (42).

1.3 Tratamentos

Os tratamentos comumente usados para CCECP são ressecção cirúrgica e radioterapia (RT) associada ou não com quimioterapia (43). A quimioterapia tem como alvo as células neoplásicas, que são células não saudáveis que se dividem e se reproduzem rapidamente (44). A maioria dos medicamentos utilizados na quimioterapia apresentam baixo índice terapêutico, ou seja, dose terapêutica muito próxima a dose tóxica (45).

A radiação ionizante é o agente terapêutico da radioterapia. A ionização torna o meio eletricamente instável. As radiações ionizantes agem sobre o DNA nuclear levando à apoptose ou à perda da sua capacidade reprodutiva (46). A exposição das células às radiações ionizantes provoca vários tipos de danos no DNA, tais como danos à base, rupturas de DNA de uma única cadeia e rupturas de dupla cadeia de DNA, levando à morte celular e às mutações (47). As rupturas de dupla cadeia de DNA são as lesões de DNA mais prejudiciais associadas à radiação ionizante. Quando o dano do DNA não é corrigido corretamente, pode ocorrer duas consequências. A primeira delas é quando danos residuais ou não reparados levam diretamente a aberrações cromossômicas, perda de material genético e morte celular. Além disso, danos não reparados ou incorretamente reparados (mal reparados) podem levar a mutações que podem resultar em carcinogênese ou morte celular (48). Na CCEB a radioterapia é o tratamento mais comumente utilizado e o resultado depende de vários fatores, tais como o estado de desempenho, idade, fase tumoral e hipóxia tumoral.

A eficácia terapêutica dos tratamentos convencionais é baixa (49-51) uma vez que o principal modo de ação é o dano ao DNA que afeta células normais adjacentes (49, 52). Para combater esta situação, há necessidade de abordagens terapêuticas alternativas e integração aos métodos convencionalmente utilizados com abordagem fitoterápica (49). Os fitoterápicos são medicamentos derivados a partir das plantas, empregando-se exclusivamente derivados de substâncias vegetais, os suplementos dietéticos herbáceos e as plantas medicinais, íntegras ou suas partes (45).

Os fitoterápicos possuem diversos mecanismos de ação, um destes mecanismos é através da inibição do crescimento celular pela proliferação celular é um processo através do qual as células entram no ciclo celular em G1, duplicam seu DNA, se preparam para a mitose em G2 e se dividem em mitoses (Figura 1).

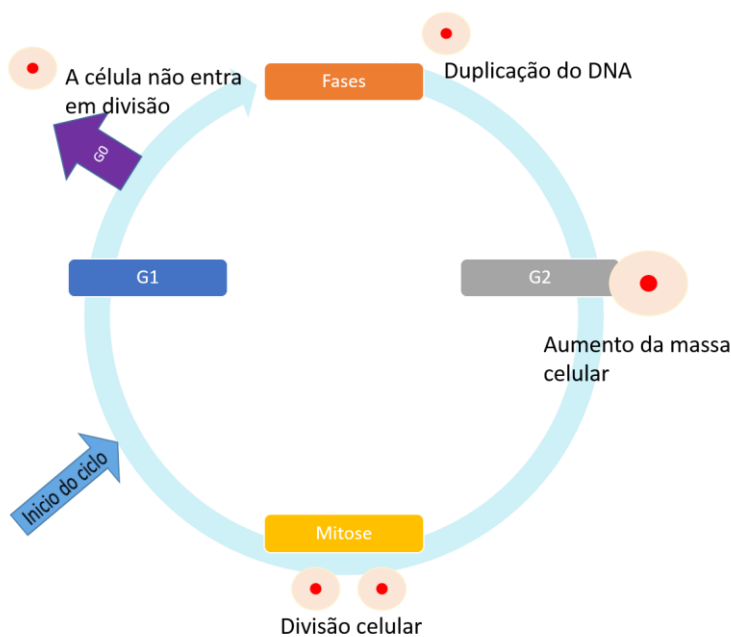


Figura 1: Esquema do Ciclo celular. Fonte: própria.

Este é um processo complexo e requer tempo e coordenação de muitos tipos diferentes de proteínas que atuam promovendo e impedindo a progressão da célula através do ciclo celular (53, 54). Os oncogenes e genes supressores de tumor foram identificados como reguladores positivos e negativos das proteínas do ciclo celular. Na maioria das células neoplásicas, esses genes que regulam a progressão ao longo do ciclo celular são frequentemente mutados levando a altos níveis de proliferação celular (55-58). Como a proliferação celular é muitas vezes maior nas células neoplásicas do que nas células normais, as drogas quimioterápicas geralmente têm como alvo o DNA ou as proteínas que regulam a progressão do ciclo celular, fazendo com que as células parem nas fases G0/G1, duplicação do DNA e G2/M do ciclo celular (59, 60). Para que um agente quimiopreventivo seja eficaz no uso a longo prazo, ele deve apresentar toxicidade mínima nas células normais. De fato, fitoterápicos e extratos preparados a partir de frutas foram identificados com baixa toxicidade enquanto inibidores seletivos do crescimento de células neoplásicas.

Outro mecanismo que os fitoterápicos atuam é através do mecanismo de apoptose. A apoptose é uma forma de morte celular, envolvendo múltiplas vias de sinalização, incluindo receptores de morte da superfície celular e ruptura das mitocôndrias (61). Durante as últimas décadas, as plantas medicinais desempenharam um papel significativo no desenvolvimento de drogas antineoplásicas com menos efeitos colaterais em diferentes continentes do mundo (49, 62).

1.4 *Persea Americana* Mill

Persea americana é um membro da família Lauraceae que cresce em muitas regiões tropicais e subtropicais, e cerca de 70 espécies do gênero *Persea* ocorrem nas regiões mais quentes das Américas do Norte, Central e do Sul, e 80 espécies no leste e sudeste da Ásia (61). O maior produtor mundial de abacate é o México, com 1.124.565 toneladas, seguido do Chile, Indonésia, República Dominicana e Colômbia. O Brasil ocupa a sexta posição, com 166 mil toneladas, em com sua produção concentrada principalmente na região sudeste, onde o Estado de São Paulo apresenta aproximadamente 41% da produção nacional, seguido de Minas Gerais, com 16% da produção (63).

É populamente conhecida como abacate (64). O abacateiro tem folhas elípticas e perenes brilhantes de 4 a 8 em número e 10 a 20 cm de comprimento, são frequentemente pubescentes e avermelhados quando jovens, tornando-se lisos, coriáceos e verde-escuros quando maduros. *P. americana* é uma árvore de médio a grande porte que o tamanho pode variar entre 9 e 20 metros de altura.

O abacate é classificado como perene, embora algumas variedades percam as folhas por um curto período de tempo antes da floração. Dependendo das localidades de implantação da cultura e das variedades cultivadas, pode-se ofertar ao mercado o produto em várias épocas do ano. Isso ocorre por que as plantas apresentam diferentes respostas fenológicas, conforme as condições climáticas e altitude do local de cultivo (63). Na região de Campinas, por exemplo, a época de colheita das variedades 'Fortuna' e 'Quintal' estende-se de Maio a Junho (63, 65) já, em Goiás, a época de colheita da variedade 'Fortuna' ocorre de Março a Julho, enquanto os frutos da variedade 'Quintal' são colhidos de Março a Agosto (63, 66).

A copa das árvores varia de baixa, densa e simétrica a ereta e assimétrica. As flores são verde amareladas e 1-1,3 cm de diâmetro. As inflorescências de muitas flores são suportadas em uma posição pseudoterminal. O eixo central da inflorescência termina em um broto. O fruto é uma baga, constituída por uma única semente grande, rodeada por uma polpa amanteigada. Contém 3-30% de óleo (variedades da Flórida variam de 3% a 15%). A pele é variável em espessura e textura. A cor da fruta na maturidade é verde, preta, roxa ou avermelhada, dependendo da variedade. A forma do fruto varia de esférica a piriforme, e pesa até 2,3 kg (67).

O abacate pode ser utilizado de diferentes formas, como fruta fresca, em pratos típicos e, além disso, da polpa extrai-se o óleo, que é muito utilizado, na indústria de cosméticos, em cremes, loções e outros produtos de beleza (63, 68). Além das formas de utilizações citadas, o abacate

pode ser uma nova fonte alternativa de biocombustível (63). As indústrias de processamento de polpa e óleo de abacate geram toneladas de subprodutos na forma de sementes, cascas, frutas podres. O tratamento e descarte desses resíduos alimentares é uma preocupação uma vez o descarte incorreto resulta em decomposição descontrolada somada ao aquecimento global e riscos à saúde. O transporte e manuseio desses resíduos também são geralmente caros, o que pode forçar as indústrias a considerar o tratamento no local de resíduos para aumentar o benefício econômico (69).

A maioria dos estudos químicos e de bioatividade são focados na polpa e pouco se sabe sobre a semente de abacate (70). Uma parte interessante do fruto abacate é a semente, que geralmente é desperdiçada e constitui 40- 60% da massa da fruta (69). Várias propriedades medicinais benéficas dos compostos presentes na semente e na casca do abacate foram relatados, que estão relacionados aos elevados níveis de compostos fenólicos (64% na semente, 23% na casca e 13% na polpa).

A semente contém metabólitos secundários que pertencem à classe dos alcalóides, triterpenóides, taninos, flavonóides, saponinas e polifenóis, que geralmente tem um efeito farmacológico (64, 71, 72) efeitos anti-inflamatórios, anticancerígenos, antimicrobianos, anti-hipertensivos, as sementes e cascas de abacate também contribuem 57% e 38% das capacidades antioxidantes de toda o frutas, respectivamente antioxidantes (70, 73, 74). Por isso a escolha dos solventes para obtenção dos bioativos é extremamente importante uma vez que o solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. A seletividade e a polaridade do solvente que se pode auxiliar na extração apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente. A tabela 1 representa alguns exemplos dos solventes, em ordem crescente de polaridade, mais utilizada e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos, a tabela 1 resume os solventes mais utilizados e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos (75).

Tabela 1: Solventes mais utilizados e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos.

Solvente	Tipos de substâncias preferencialmente extraídas
Éter de petróleo, hexano	Lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas
Tolueno, diclorometano, clorofórmio	Bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos voláteis
Acetato de etila, n-butanol	Flavonóides, cumarinas simples
Etanol, metanol	Heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas, água	Saponinas, taninos
Água acidificada	Alcalóides
Água alcalinizada	Saponinas

Os principais metabólitos secundários das várias partes da planta do abacate podem ser divididas em alcanóis (também às vezes denominados “acetogeninas alifáticas”), glicosídeos terpenóides, vários anéis furanos - contendo derivados, flavonóides e uma cumarina.

Os alcanóis do abacate exibiram atividades biológicas bastante diversas até agora. Por exemplo, isolado 1,2,4- trihidroxiheptadec-16-eno, 1,2,4-trihidroxiheptadec-16- yne e 1,2,4-trihidroxinonadecano dos frutos de *P. americana*, e descobriu que essas substâncias são moderadamente citotóxico quando avaliado contra um pequeno painel de linhagens de células neoplásicas (61). Outro composto com propriedade fitoterápicos são dois análogos, persenonas A e B, juntamente com persina, foram encontrados para inibir a geração de superóxido ($O_2 \ddot{y}$) e óxido nítrico (NO) na cultura celular e, portanto, podem servir como agentes quimiopreventivos do câncer em órgãos relacionados à inflamação (76, 77).

1.5 Cromatografia

O princípio da cromatografia é que as moléculas não apenas se dissolvem em líquidos, mas também podem absorver com a superfície dos sólidos. Se uma molécula dissolvida em um líquido passa por uma coluna de partículas sólidas com as quais interage, ela se moverá mais lentamente que o solvente, passando algum tempo dissolvida no líquido (fase líquida) e outro no sólido (fase sólida). Sendo assim essas moléculas demoram mais para passar pelo sólidos do que as moléculas que não interagem com a fase sólida (78).

A separação de moléculas por cromatografia depende da exploração das diferenças das propriedades físicas das moléculas nas amostras: sua solubilidade em água, solubilidade em solventes orgânicos, carga líquida positiva ou negativa e tamanho (78). A separação de moléculas de acordo com essas propriedades é descrita respectivamente como adsorção (ou fase normal), fase reversa, troca iônica ou cromatografia de exclusão de tamanho.

Cada método requer uma fase sólida com diferentes propriedades de superfície. Para cromatografia de adsorção, a fase sólida deve apresentar ambiente aquoso, enquanto que para cromatografia de fase reversa deve apresentar ambiente orgânico; para cromatografia de troca iônica deve ser carregado, e para cromatografia de exclusão de tamanho a fase sólida deve ser fisicamente capaz de retardar moléculas menores à medida que percorrer a coluna (78).

Uma cromatografia líquida de alta eficiência consiste em reservatórios de fase móvel, bombas, um misturador para misturar os solventes, uma válvula na qual a amostra é injetada, uma coluna de guarda, uma coluna contendo a fase estacionária, um detector e um registrador (79). Uma vez que os compostos foram separados na coluna, eles passam para o detector, onde um sinal eletrônico correspondente à quantidade de composto presente é registrado como um pico em um cromatograma. Conceitos-chave na teoria de HPLC são o tempo de retenção, o tempo desde a injeção da amostra até a detecção de um pico; fator de capacidade, uma medida de retenção corrigida para a eluição de um composto não retido; resolução, uma medida de quão bem dois picos estão separados; a seletividade do método; eficiência, ou poder de resolução; e o grau de simetria dos picos produzidos. A maioria das separações por HPLC são realizadas no modo de fase reversa, que envolve uma fase estacionária não polar e uma fase móvel em grande parte polar. Outros modos são fase normal, troca iônica e exclusão de tamanho (Tabela 2) (79).

Tabela 2 Características dos quatro modos de alto desempenho Cromatografia líquida

Modo cromatográfico	Fase móvel	Fase Estacionária
Fase normal	Em grande parte não polar (por exemplo, hexano, cloreto de metileno)	Polar (sílica, alumina, empacotamentos de fase ligada, como sílica modificada com ciano e aminodificada)
Fase reversa	Amplamente polar (por exemplo, água, tampões), com solventes orgânicos menos polares (por exemplo, metanol, acetonitrila)	Relativamente não polar (fases ligadas como C8 e C18 e fenilciano e sílica modificada com amino)
Troca iônica	Tampões com vários valores de pH e forças iônicas	Resinas quimicamente modificadas com cargas permanentes positivas (troca aniônica) ou negativas (troca catiônica)
Exclusão de tamanhos	Polar ou apolar; compostos a serem separados devem ser dissolvidos	Copolímeros porosos ou gel de sílica. Retenção baseada apenas no tamanho (peso molecular)

HPLC é um meio extremamente poderoso de separar moléculas de acordo com sua solubilidade em água, solubilidade em solventes orgânicos, carga líquida positiva, líquido carga negativa ou tamanho. A grande variedade de colunas e solventes disponíveis torna este método altamente adaptável à investigação de uma ampla gama de moléculas (78).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da ansiedade e do extrato de *Persea americana* em CCECP

2.2 Objetivos específicos

- A ansiedade influencia no desenvolvimento e estadiamento do CCECP de pacientes com a neoplasia.
- A ansiedade influencia no desenvolvimento e estadiamento de CCEB quimicamente induzida em camundongos Swiss.
- O extrato de *Persea americana* atua na viabilidade, migração celular, proliferação celular e na expressão de KI-67 nas linhagens celulares SCC9, CAL27 e Hacat.

3 PRODUTOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS GERADOS

3.1 Produto 1: *Might anxiety disorders promote head and neck cancer development* formatado segundo as normas para publicação do periódico IBRO Reports, publicado neste periódico.

3.2 Produto 2: *Active compound base on Persea americana Mill seed extract with antineoplastic effect on oral squamous cell carcinoma* segundo as normas para publicação do periódico PHYTOMEDICINE.

3.1 PRODUTO 1

IBRO Reports 9 (2020) 9–13



Contents lists available at ScienceDirect

IBRO Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibro



Research Paper

Might anxiety disorders promote head and neck cancer development?

Marcela Gonçalves de Souza^a, Emisael Stênio Batista Gomes^a, Lorena Barbosa Costa^a, Amanda Dias Silva Andrade^a, Sabrina Ferreira de Jesus^a, Daniela Paola Santos de Paula^a, Rogério Gonçalves da Rocha^a, Sérgio Henrique Sousa Santos^b, Alfredo Maurício Batista de Paula^a, Lucyana Conceição Farias^a, André Luiz Sena Guimaraes^{a,*}

^a Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

^b Institute of Agricultural Sciences, Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil



ABSTRACT

Cancer patients present a higher risk of experiencing anxiety disorders (AD). However, it is not clear if AD might be associated with cancer development. Thus, our study aimed to evaluate if AD might be related to head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) development. The combination of an applied animal basic study and a retrospective diagnostic case and control study in patients was performed. As a result, we obtained that stress reduced the locomotor activity of the animals in the group stress and stress + 4NqO ($p < 0.0001$). The stress showed no influence on the progression of neoplasia in mice. In the same way, the case group did not present differences in anxiety scores in comparison to control. Moreover, no association between HNSCC staging and anxiety scores was observed. In conclusion, our in vivo findings in humans and animals have shown that there is no relationship between AD and oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Neoplasm

Stress disorders

Anxiety

Freezing reaction

ABBREVIATIONS: AD, anxiety disorders; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; UV, ultraviolet; BAI, Beck Anxiety Inventory; 4NqO, 4-nitroquinoline-1-oxide; RT, radiotherapy

1. Introduction

Anxiety disorders (AD) include disorders that share features of excessive fear and anxiety besides related behavioral disturbances (American Psychiatric Association, 2013). Modern life has many stress factors related to anxiety disorders (McLaughlin and Hatzenbuehler, 2009). Currently, the prevalence of AD is high in population subgroups across the globe (Remes et al., 2016). AD is not only commonly associated with other mental disorders (Disease et al., 2017) but also with head and neck diseases (Gomes et al., 2013; Mendes et al., 2013; Gomes et al., 2019). Interestingly enough, some studies lack the association of stressed people and head and neck diseases (Perdigao et al., 2007; Godinho et al., 2011; Mendes et al., 2013). The way that AD interferes with head and neck diseases still controversial.

Cancer is recognized as a threat to global development; in 2017, there were 24.5 million incident cancer cases worldwide and 9.6 million cancer deaths (Global Burden of Disease Cancer et al., 2019). In developing countries, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a major global public health problem (De Paula et al., 2009; Pinheiro et al., 2015). Despite progress in research and therapy, patient survival has not significantly improved in recent years, posing a significant challenge for science (Fraga et al., 2012; Oliveira et al., 2014) from 15 to 61 % of HNSCC arising derived from leukoplakia (Domingos et al., 2017). Although retrospective cohort studies have shown that younger individuals are also at risk for the development of this neoplasm, HNSCC usually develops in middle-aged and older individuals (Farias et al., 2010; Marques-Silva et al., 2012; Bewley and Farwell, 2017). HNSCC is a preventable disease, in which smoking and alcohol, considered the main risk factors, is associated with 90 % of the cases (De Paula et al., 2009). Tobacco and alcohol show a synergistic effect. The risk of developing HNSCC is five to nine times higher for smokers than for non-smokers (Bewley and Farwell, 2017). Another risk factor, such as human papillomavirus, also has a role in HNSCC development (Marques-Silva et al., 2012).

The commonly used treatment for this neoplasm is surgical excision alone or with radiation therapy and chemotherapy (Solomon et al., 2018). Studies report that the patient with HNSCC most often suffers from the physical, mental, and psychosomatic impacts inherent to the diagnosis of the neoplasia and its treatment; above all, it is possible to

highlight Anxiety and depression as a result of such impacts (Chen et al., 2009). On the other hand, recently, it was demonstrated that HNSCC patients display sympathetic nervous system hyperactivity and that changes in circulating catecholamines may be associated with alcohol consumption (Bastos et al., 2018). Moreover, chronic stress was related to oral carcinoma growth rate and progression (Xie et al., 2015). It was suggested that stress hormones might affect HNSCC behavior by influencing the tumor micro-environment through the circulating blood (Xie et al., 2014). Taken all these facts together, the purpose of the current study is to evaluate if anxiety could interfere in the HNSCC development and staging.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval

2.1.1. Animal study

As it is a study with animal experimentation, this study was submitted and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation and Welfare - CEEBEA of the Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil through the process n° 140/2017.

2.1.2. Ethical approval of case and control study

To follow the ethical standards of international and national Research Committees throughout the procedures involving human participants, the 1964 Helsinki Declaration and its subsequent amendments, or comparable ethical standards, were observed. The ethical certificate approval of this study (number 1.736.940) was obtained from the Montes Claros State University Research Ethics Committee. Data were collected from October 2015 to October 2019. All patients signed an informed consent form.

2.1.3. Compliance with ethical standards

The authors declare that they have no conflicts of interest.

2.2. Experimental design

The current study combines two study designs: one on animals and the other on patients. First, we used an applied animal basic study and validate the data in a retrospective diagnostic controlled case and control study (Rohrig et al., 2009).

2.2.1. Animal basic study

2.2.1.1. Mice groups. Forty-two day-olds male Swiss mice were obtained from the Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES). The mice were randomly divided into four groups (n = ten each) and respectively subject to the following conditions: conditioned fear stress, 4NqO, CFS plus 4NqO, and control group (group without intervention, Fig. 1).

2.2.1.2. Cancer induction. Cancer induction was performed as described before (Sobrinho Santos et al., 2017). Briefly, the mice received -nitroquinoline-1-oxide (4NqO; N8141-5 G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in drinking water to a final concentration of 50 µg/mL for 16 weeks. After 4NqO administration, the mice were followed for 13 weeks (Fig. 1). During all 29 weeks of experiments, mice had free access to water and food. Mice were housed in a 12 -h light-dark cycle, and the temperature was maintained at 23.0 ± 2.0 °C.

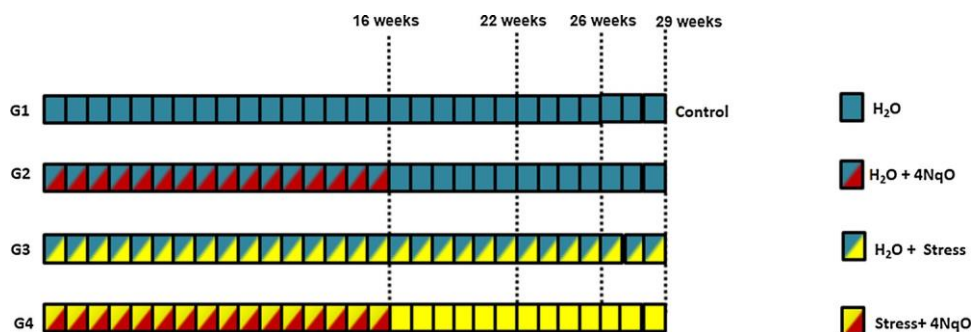


Fig. 1. Animal study design scheme.

The four groups are represented green for the water; red represents 4NqO, and yellow represents the CFS. Each square represents one week.

2.2.1.3. Conditioned fear stress (CFS)-induced freezing behavior. To simulate AD, CFS was used as previously described (Aguar et al., 2013; Gomes et al., 2013). Briefly, in stressed groups, animals were submitted to CFS during all the experiments (29 weeks, Fig. 1). The CFS was performed in a CFS chamber (37cm × 25cm x 21 cm, Skinner Box, ELT-02, Eltrones, Joinville, SC, BR). The CFS session was lasted for 185 s with an interval of 25 s between each sound and shock. It is importante to emphasize that the animals in the control group were also placed individually in the chamber and submitted to the same experimental conditions without the presence of shocks. The CFS session was performed with an isolated animal to prevent other animals from hearing noises released by the animal that was subjected to the experiment. The chamber was cleaned with 70 % ethanol before and after the entry of each mice. Freezing behavior is associated with stress during CFS (Gomes et al., 2019). To quantify the number of movements ImageJ software was used to analyze the experiment movies (Rueden et al., 2017).

2.2.1.4. Sacrifice of animals. Animals were sacrificed via decapitation through a guillotine after 29 weeks of experiments. So that the mice could not smell the blood of the animals previously sacrificed, after the sacrifice the guillotine was cleaned with 70 % alcohol. Immediately afterward, the heads of each animal were taken individually to another experimental room, where the tongue was removed. The material was placed in properly labeled containers and was fixed in a 10 % formalina solution for 48 h.

2.2.1.5. Histological preparation and analyses. The samples were included in paraffin. The specimens were submitted to complete serial sections of 5 μm each obtained using a

microtome (Easy Path EP-MR10). Each section was dewaxed, rehydrated and stained with hematoxylin and eosin. The samples were covered with glass coverslips for observation and histological quantification by microscopy (Olympus FSx100, Center Valley, Palo Alto, CA) for analysis by the same pathologist, blinded for the groups. The pathologist graded the lesions of mice in absent, mild, moderate, severe dysplasia, and carcinoma as described before (Sobrinho Santos et al., 2017)

2.2.2. Case-control study

The sample size calculation was performed to achieve an alpha of 0.05, the beta of 0.05, and the study power of 0.95, and to reach a minimal between-group difference of 50 % of HNSCC incidence. A total of 108 patients were enrolled in the study; 53 patients were cases and 55 control patients. The inclusion criteria for patients cases were with HNSCC. The exclusion criteria were patients who had cancer lesions associated with UV light, patients who had already started HNSCC treatment, or did not agree to participate in the study. The inclusion criteria for control patients' absence of HNSCC. The Beck Anxiety Inventory (BAI) questionnaire was applied to assess Anxiety in patients (Beck et al., 1988).

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the PASW Statistics18–SPSS software (IBM, Armonk, NY). A chi-square test was used. Statistical analysis showing confidence above 95 % ($P < 0.05$) was considered to be significant. Graphs were created using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. Conditioned fear stress (CFS) reduced locomotor activity

CSF has been shown to impact on the general locomotor activity of animals. In both

the stress and stress + 4NqO groups, fear conditioned to stress resulted in a reduction or almost total absence of general locomotor activity. Freezing behaviors were characterized by complete immobility while breathing and reflex expression (as characterized by fear-potentiated startle) were not considered ($p < 0.0001$, Fig. 2 and video 1).

3.2. Conditioned fear stress does not interfere with 4NqO induced oral carcinogenesis

The morphological aspects of epithelial such as keratinization, nuclear polymorphism, tumor-stroma interaction (pattern of invasion), and the lymphocytic infiltration were used to define the worse histological grading (Pereira et al., 2012). No association with cancer progress, in terms of cell and organ morphology of the mice tongue, was observed (Table 1 and Fig. 3). CFS did not promote changes in the incidences of HNSCC in the animal model in comparison to 4NqO without CFS (Table 1).

3.3. Anxiety is not associated with HNSCC staging

Interestingly enough, HNSCC and control patients did not present differences in the BAI score (Table 2). Also, BAI scores that were not associated with HNSCC grading were observed in patients (Table 3). The study included 108 patients. Their details are shown in supplementary material 2.

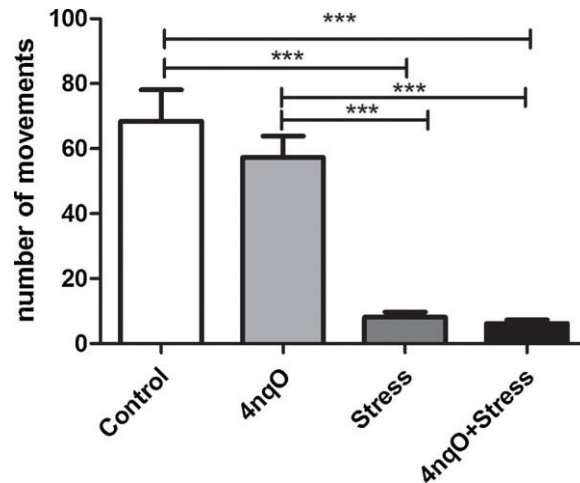


Fig. 2. Conditioned fear stress reduced locomotor activity. Number of movements were quantified by ImageJ software, breathing and re-flex expression were not considered

Table 1 Conditioned fear stress and HNSCC progression in mice

	Dysplasia Absent	Dysplasia Mild/Moderate	Dysplasia Severe/Carcinoma	p-value
Control	7(100 %)	0(0 %)	0(0 %)	0.377
4NqO	1(11,1 %)	1(11,1 %)	7(77,7 %)	
Stress	9(100 %)	0(0 %)	0(0 %)	
Stress+ 4NqO	0(0 %)	3(30 %)	7(70 %)	

4. Discussion

The relation between HNSCC treatment and the increase in anxiety is very well established (Cheung et al., 2013; Curran et al., 2017; Kumar et al., 2018). Evidence demonstrated that anxiety affects 10.3 % of patients receiving treatment for neoplasms in general (Mitchell et al., 2011; Curran et al., 2017). Moreover, anxiety scores increased between diagnosis and intervention and gradually decreased (Kumar et al., 2018). Also, there is a close affinity between symptoms of stress, such as chronic arousal, tension, fatigue, worry, nervousness, discouragement, lack of patience, restlessness, interrupted sleep, avoidance, and irritability, with the HNSCC treatment (Lazarus, 1993; Kumar et al., 2018). The CFS is considered a standard animal model for the study of

Anxiety or fear (Fanselow, 1980). Freezing is defined as the lack of all observable body movements, except for breathing (Fanselow, 1980; Yoshioka et al., 1996). It was observed that rats that presented freezing even 24 after the CFS induction animals in the chamber (Fanselow, 1980; Yoshioka et al., 1996). The post-shock freezing behavior is the result of a conditioned fear caused by signs associated with the shock (Yoshioka et al., 1996). Studies indicate that animals submitted to CFS show more squatting and freezing (Blanchard and Blanchard, 1969; Bolles and Collier, 1976; Fanselow, 1980) in the CFS reduced animal locomotor activity and freezing behavior. Our data are in agreement with previous studies that used the same animal model (Aguar et al., 2013; Gomes et al., 2013, 2019).

Evidence suggested that AD might be associated with HNSCC development (Xie et al., 2014, 2015), which diverges with the current research. The divergence might be related to the cancer differences in study design. A previous animal study (Xie et al., 2015) used implante CAL 27 cells to simulate the HNSCC while in the current study, we used chemical carcinogenesis. Ectopic models of HNSCC lack of host immunity-tumor cell interaction and do not consider the anatomical site (Supsavhad et al., 2016). In HNSCC, the anatomical site is an essential factor related to prognosis (Vered et al., 2011).

On the other hand, the model used in the current study also permits the development of premalignant lesions; also, our model conserved host-tumor cell interaction (Supsavhad et al., 2016). Furthermore, stressors reduce the increase in most neoplasms induced by chemical carcinogens (Strange et al., 2000). Our data demonstrated that CFS does not interfere with cancer progression. 4NqO is a carcinogen widely used in HNSCC study models (Sobrinho Santos et al., 2017).

In the current study, no differences were observed in BAI scores in the case and control group. Similar BAI results were found before (Bastos et al., 2018). Stressful events that occur in the presence of social support have less emotional consequences than if they happen in the absence of social support. Social support can help patients deal with stress so that it is no longer considered stressful and/or provides resources, thereby reducing the severity of the stressful event (Kornblith et al., 2001). In two studies with breast cancer patients and survivors, less social support, a more extended history of pre-cancer trauma, and more stressful life events directly predicted higher levels of post traumatic stress disorder symptoms and general distress (Kornblith et al., 2001).

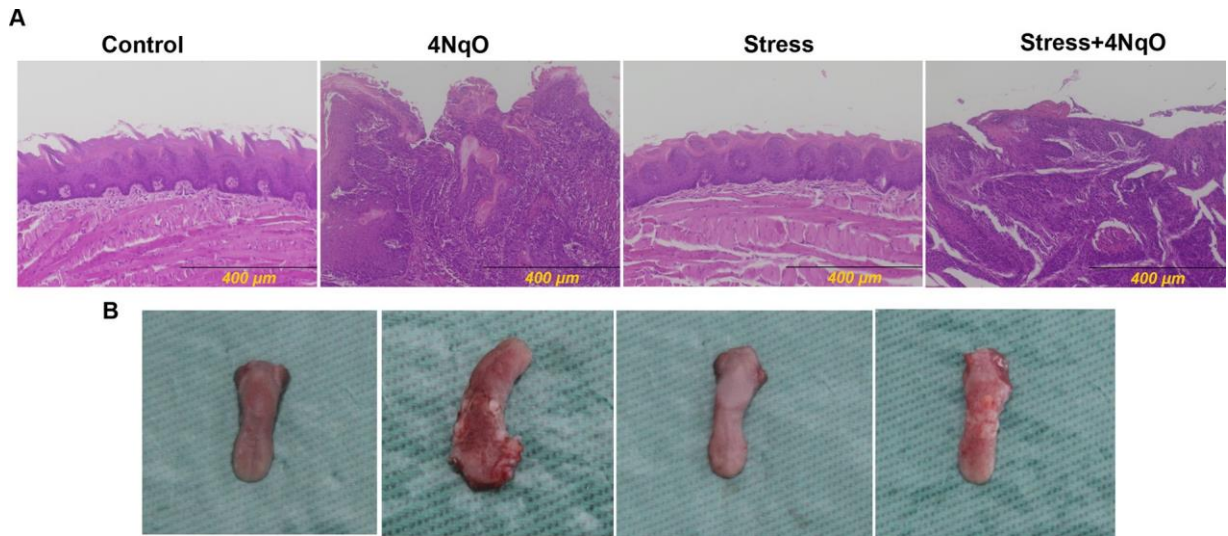


Fig. 3. Stress from conditioned fear and histological analysis.

Table 2

Beck Anxiety Inventory scores in case and control patients.

	Case	Control	p-value
Low Anxiety	35(49 %)	36(51 %)	0.386
Moderate Anxiety	17(53 %)	15(47 %)	
Potentially Concerning	1(20 %)	4(80 %)	
Levels of Anxiety			

Table 3

Anxiety and HNSCC staging.

TNM	Low Anxiety	Moderate Anxiety	Potentially Concerning Levels of Anxiety	p-value
TX	2(3,77 %)	1(1,88 %)	0(0%)	0.788
T1-T2	18(339 %)	10(19 %)	0(0%)	
T3-T4	15(283 %)	6(11, %)	1(1,88 %)	
N0	5(9,4 %)	2(3,77 %)	0(0 %)	0.744
N1-N2-N3	29(54;7 %)	13(245%)	1(1,88 %)	
N4	1(1,88 %)	2(3,77 %)	0 (0 %)	
M0	10 (10 %)	2 (3,77 %)	0 (0 %)	0.342
M1-M2	25 (471 %)	15(283)	1(1,88 %)	

Our findings are consistent with the literature that younger survivors may face more financial and social challenges, and the emotional response of elderly patients with HNSCC is more favorable since our patients are elderly (Smith et al., 2008; Rogers et al., 2015; Moschopoulou et al., 2018). Our findings, together with the results of Moschopoulou et al. (2018), demonstrate that there is no relationship between the stage of the neoplasm with Anxiety (Hahn et al., 2015; Richardson et al., 2016; Moschopoulou et al., 2018) in our results patients with low Anxiety characterize the T3 / T4, M1 / M2. Our data, together with literature, show that AD might be a consequence of the diagnose and HNSCC treatment.

It is essential to highlight that our study also presents limitations because it was a Unicenter study. Also, the animal model needs validation in multiple populations.

In conclusion, the current study did not observe the association of anxiety disorders and HNSCC development.

Author(s) contribution

Study concepts: De Souza MG,Guimaraes ALS, Gomes ESB, Santos SHS, de Paula AMB, Farias LC, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., de Jesus_F, Paula DPS, Rocha GR.

Study design: Guimaraes ALS, De Souza MG, Gomes ESB, Santos SHS, de Paula AMB, Farias LC, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., de Jesus SF, Paula DPS, Rocha GR..

Data acquisition: De Souza MG, Gomes ESB, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., Guimaraes ALS, Santos SHS, de Paula AMB, Farias LC, de Jesus SF, Paula DPS, Rocha GR.

Quality control of data and algorithms: De Souza MG,Guimaraes ALS, Gomes ESB, Santos SHS, de Paula AMB, Farias LC, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., de Jesus SF, Paula DPS, Rocha GR.

Data analysis and interpretation De Souza MG,Guimaraes ALS, Gomes ESB, Santos SHS, de Paula AMB, Farias LC, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., de Jesus SF, Paula DPS, Rocha GR.

Statistical analysis: De Souza MG,Guimaraes ALS, Santos SHS, de Paula AMB, Gomes ESB, Farias LC, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., de

Jesus SF, Paula DPS, Rocha GR.
Manuscript editing: De Souza MG,Guimaraes ALS, Santos SHS, de Paula AMB, Farias LC, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., de Jesus SF, Paula DPS, Rocha GR. Gomes ESB.
Manuscript review: De Souza MG,Guimaraes ALS, Santos SHS, de Paula AMB, Farias LC, Andrade, A. D. S., Costa, L. B., de Jesus SF, Paula DPS, Rocha GR, Gomes ESB.
Name and Title of Corresponding Author: André Luiz Sena Guimarães, p.H.D.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr. Guimarães, Dr. Santos, and Dr. de Paula are research fellows of the CNPq.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.06.001>.

References

Aguiar, J.C., Gomes, E.P., Fonseca-Silva, T., Velloso, N.A., Vieira, L.T., Fernandes, M.F., Santos, S.H., Neto, J.F., De-Paula, A.M., Guimaraes, A.L., 2013. Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. *J. Periodont. Res.* 48, 632–637.
American Psychiatric Association, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5*. American Psychiatric Association, Arlington, VA.

Bastos, D.B., Sarafim-Silva, B.A.M., Sundefeld, M., Ribeiro, A.A., Brandao, J.D.P., Biasoli, E.R., Miyahara, G.I., Casarini, D.E., Bernabe, D.G., 2018. Circulating catecholamines are associated with biobehavioral factors and anxiety symptoms in head and neck cancer patients. *PLoS One* 13, e0202515.

Beck, A.T., Epstein, N., Brown, G., Steer, R.A., 1988. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J. Consult. Clin. Psychol.* 56, 893–897.

Bewley, A.F., Farwell, D.G., 2017. Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin. Dermatol.* 35, 461–467.

Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1969. Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 370–375.

Bolles, R.C., Collier, A.C., 1976. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Anim. Learn. Behav.* 4, 6–8.

Chen, S.C., Liao, C.T., Lin, C.C., Chang, J.T., Lai, Y.H., 2009. Distress and care needs in newly diagnosed oral cavity cancer patients receiving surgery. *Oral Oncol.* 45, 815–820.

Cheung, Y.T., Lee, H.H., Chan, A., 2013. Exploring clinical determinants and anxiety symptom domains among Asian breast cancer patients. *Support. Care Cancer* 21, 2185–2194.

Curran, L., Sharpe, L., Butow, P., 2017. Anxiety in the context of cancer: a systematic review and development of an integrated model. *Clin. Psychol. Rev.* 56, 40–54.

De Paula, A.M., Souza, L.R., Farias, L.C., Correa, G.T., Fraga, C.A., Eleuterio, N.B., Silveira, A.C., Santos, F.B., Haikal, D.S., Guimaraes, A.L., Gomez, R.S., 2009. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol.* 45, 777–782.

Disease, G.B.D., Injury, I., Prevalence, C., 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390, 1211–1259.

Domingos, P.L.B., Souza, M.G., Guimaraes, T.A., Santos, E.S., Farias, L.C., de Carvalho Fraga, C.A., Jones, K.M., Santos, E.S.H.S., de Paula, A.M.B., Guimaraes, T.A.L.S., 2017. Hypoxia reduces the E-cadherin expression and increases OSCC cell migration regardless of the E-cadherin methylation profile. *Pathol. Res. Pract.* 213, 496–501.

Fanselow, M.S., 1980. Conditional and unconditional components of post-shock freezing.

Pavlov. J. Biol. Sci. 15, 177–182.

Farias, Lc, Fraga, Ca, De Oliveira, M.V., Silva, T.F., Marques-Silva, L., Moreira, P.R., DePaula, A.M., Gomez, R.S., Guimaraes, A.L., 2010. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *Int. J. Oncol.* 37, 167–176.

Fraga, C.A., de Oliveira, M.V., de Oliveira, E.S., Barros, L.O., Santos, F.B., Gomez, R.S., De-Paula, A.M., Guimaraes, A.L., 2012. A high HIF-1alpha expression genotype is associated with poor prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma patients. *Oral Oncol.* 48, 130–135.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice, C., Abate, D., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdel-Rahman, O., Abdelalim, A., Abdoli, A., Abdollahpour, I., Abdulle, A.S.M., Abebe, N.D., Abraha, H.N., Abu-Raddad, L.J., Abualhasan, A., Adedeji, I.A., Advani, S.M., Afarideh, M., Afshari, M., Aghaali, M., Agius, D., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmadian, E., Ahmadpour, E., Ahmed, M.B., Akbari, M.E., Akinyemiju, T., Al-Aly, Z., AlAbdulKader, A.M., Alahdab, F., Alam, T., Alamene, G.M., Alemnew, B.T.T., Alene, K.A., Alinia, C., Alipour, V., Aljunid, S.M., Bakeshei, F.A., Almadi, M.A.H., Almasi-Hashiani, A., Alsharif, U., Alsowaidi, S., Alvis-Guzman, N., Amini, E., Amini, S., Amoako, Y.A., Anbari, Z., Anber, N.H., Andrei, C.L., et al., 2019. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 4, 1553–1568.

Godinho, E.L., Farias, L.C., Aguiar, J.C., Martelli-Junior, H., Bonan, P.R., Ferreira, R.C., De Paula, A.M., Martins, A.M., Guimaraes, A.L., 2011. No association between periodontal disease and GHQ-12 in a Brazilian Police population. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 16, e857–863.

Gomes, E.P., Aguiar, J.C., Fonseca-Silva, T., Dias, L.C., Moura-Boas, K.P., Roy, A., Velloso, N.A., Rodrigues-Neto, J.F., De-Paula, A.M., Guimaraes, A.L., 2013. Diazepam reverses the alveolar bone loss and hippocampal interleukin-1beta and interleukin-6 enhanced by conditioned fear stress in ligature-induced periodontal disease in rats. *J. Periodont. Res.* 48, 151–158.

Gomes, E.S.B., Farias, L.C., Silveira, L.H., Jesus, C.I., Rocha, R.G.D., Ramos, G.V., Magalhaes, H., Brito-Junior, M., Santos, S.H.S., Jham, B.C., de Paula, A.M.B.,

Guimaraes, A.L.S., 2019. Conditioned fear stress increases bone resorption in apical periodontitis lesions in Wistar male rats. *Arch. Oral Biol.* 97, 35–41.

Hahn, E.E., Hays, R.D., Kahn, K.L., Litwin, M.S., Ganz, P.A., 2015. Post-traumatic stress symptoms in cancer survivors: relationship to the impact of cancer scale and other associated risk factors. *Psychooncology* 24, 643–652.

Kornblith, A.B., Herndon 2nd, J.E., Zuckerman, E., Viscoli, C.M., Horwitz, R.I., Cooper, M.R., Harris, L., Tkaczuk, K.H., Perry, M.C., Budman, D., Norton, L.C., Holland, J., Cancer, Leukemia Group B, 2001. Social support as a buffer to the psychological impact of stressful life events in women with breast cancer. *Cancer* 91, 443–454.

Kumar, K., Kumar, S., Mehrotra, D., Tiwari, S.C., Kumar, V., Khandpur, S., Dwivedi, R.C., 2018. Prospective evaluation of psychological burden in patients with oral cancer. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 56, 918–924.

Lazarus, R.S., 1993. From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Annu. Rev. Psychol.* 44, 1–21.

Marques-Silva, L., Farias, L.C., Fraga, C.A., de Oliveira, M.V., Cardos, C.M., Fonseca-Silva, T., Gomes, C.C., De-Paula, A.M., Gomez, R.S., Guimaraes, A.L., 2012. HPV-16/18 detection does not affect the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma in younger and older patients. *Oncol. Lett.* 3, 945–949.

McLaughlin, K.A., Hatzenbuehler, M.L., 2009. Stressful life events, anxiety sensitivity, and internalizing symptoms in adolescents. *J. Abnorm. Psychol.* 118, 659–669.

Mendes, D.C., Silva, T.F., Barros Lde, O., de Oliveira, M.V., Vieira, L.T., Haikal, D.S., Guimaraes, A.L., De Paula, A.M., 2013. Analysis of the normative conditions of oral health, depression and serotonin-transporter-linked promoter region polymorphisms in an elderly population. *Geriatr. Gerontol. Int.* 13, 98–106.

Mitchell, A.J., Chan, M., Bhatti, H., Halton, M., Grassi, L., Johansen, C., Meader, N., 2011. Prevalence of depression, anxiety, and adjustment disorder in oncological, haematological, and palliative-care settings: a meta-analysis of 94 interview-based studies. *Lancet Oncol.* 12, 160–174.

Moschopoulou, E., Hutchison, I., Bhui, K., Korszun, A., 2018. Post-traumatic stress in head and neck cancer survivors and their partners. *Support. Care Cancer* 26, 3003–3011.

Oliveira, M.V., Fraga, C.A., Barros, L.O., Pereira, C.S., Santos, S.H., Basile, J.R., Gomez,

R.S., Guimaraes, A.L., De-Paula, A.M., 2014. High expression of S100A4 and endoglin is associated with metastatic disease in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 31, 639–649.

Perdigao, P.F., Guimaraes, A.L., Victoria, J.M., Xavier, G.M., Romano-Silva, M.A., Gomez, R.S., 2007. Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) in patients with oral lichen planus. *Arch. Oral Biol.* 52, 889–893.

Pereira, C.S., Oliveira, M.V., Fraga, C.A., Barros, L.O., Domingos, P.L., Roy, A., De-Paula, A.M., Guimaraes, A.L., 2012. Impact of the epithelial dysplasia grading and Ki67 proliferation index in the adjacent non-malignant mucosa on recurrence and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 208, 651–656.

Pinheiro, U.B., Fraga, C.A., Mendes, D.C., Farias, L.C., Cardoso, C.M., Silveira, C.M., D'Angelo, M.F., Jones, K.M., Santos, S.H., de Paula, A.M., Guimaraes, A.L., 2015. Fuzzy clustering demonstrates that codon 72 SNP rs1042522 of TP53 gene associated with HNSCC but not with prognoses. *Tumour Biol.* 36, 9259–9265.

Remes, O., Brayne, C., van der Linde, R., Lafortune, L., 2016. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. *Brain Behav.* 6, e00497.

Richardson, A.E., Morton, R.P., Broadbent, E.A., 2016. Illness perceptions and coping predict post-traumatic stress in caregivers of patients with head and neck cancer. *Support. Care Cancer* 24, 4443–4450.

Rogers, Sn, Audisio, Ra, Lowe, D., 2015. Do the elderly raise different issues when using the Patient Concerns Inventory in routine head and neck cancer follow-up clinics? *Eur. J. Cancer Care* 24, 189–197.

Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Eliceiri, K.W., 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinform.* 18, 529.

Smith, S.K., Zimmerman, S., Williams, C.S., Preisser, J.S., Clipp, E.C., 2008. Post-traumatic stress outcomes in non-Hodgkin's lymphoma survivors. *J. Clin. Oncol.* 26, 934–941.

Sobrinho Santos, E.M., Guimaraes, T.A., Santos, H.O., Cangussu, L.M.B., de Jesus, S.F., Fraga, C.A.C., Cardoso, C.M., Santos, S.H.S., de Paula, A.M.B., Gomez, R.S.,

Guimaraes, T.A.L.S., Farias, L.C., 2017. Leptin acts on neoplastic behavior and expression levels of genes related to hypoxia, angiogenesis, and invasiveness in oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 39, 1010428317699130.

Solomon, B., Young, R.J., Rischin, D., 2018. Head and neck squamous cell carcinoma: genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin. Cancer Biol.* 52, 228–240.

Strange, K.S., Kerr, L.R., Andrews, H.N., Emerman, J.T., Weinberg, J., 2000. Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 89–102.

Supravhad, W., Dirksen, W.P., Martin, C.K., Rosol, T.J., 2016. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *Vet. J.* 210, 7–16.

Vered, M., Dayan, D., Salo, T., 2011. The role of the tumour microenvironment in the biology of head and neck cancer: lessons from mobile tongue cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 382 author reply 382.

Xie, H., Li, B., Li, L., Zou, X.L., Zhu, C.R., Li, Y., Gao, N., Chen, Q., Li, L., 2014. Association of increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels with risk of psychological problems in oral neoplasm patients. *PLoS One* 9, e99179.

Xie, H., Li, C., He, Y., Griffin, R., Ye, Q., Li, L., 2015. Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. *Oral Oncol.* 51, 991–997.

Yoshioka, M., Matsumoto, M., Togashi, H., Saito, H., 1996. Effect of conditioned fear stress on dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Neurosci. Lett.* 209, 201–203

3.2 PRODUTO 2

Active compound base on *Persea americana* Mill seed extract with antineoplastic effect on oral squamous cell carcinoma

Marcela Gonçalves de Souza^a, Lilian Mendes Borburema Cangussu^a, Agna Soares da Silva Menezes^a, Gabriela Luize Guimarães Sanches^a, Jamil Silvano de Oliveirab, Geraldo Aclécio Meloc, Alfredo Maurício Batista de Paulaa, Lucyana Conceição Fariasa, Sérgio Henrique Sousa Santos^d, and André Luiz Sena Guimarães^e,e#

^aDepartment of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

^bInstitute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil

^cDepartment of Biology, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

^dInstitute of Agricultural Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

^eDilson Godinho Hospital, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author:

André Luiz Sena Guimarães. Laboratório de Pesquisa em Saúde, Hospital Universitário Clemente Faria, Universidade Estadual de Montes Claros, 562 Av. Cula Mangabeira Santo Expedito, Montes Claros, Minas Gerais, 39401-001 Brazil. E-mail: andreluizguimaraes@gmail.com

Abstract

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a worldwide health problem and is the most common malignant neoplasm of the oral cavity, it is responsible for more than 95% of all head and neck neoplasms and is among the eight main causes of cancer. **Purpose:** to investigate the anticancer action of *Persea Americana* on OSCC. **Study Design:** This is an in vitro laboratory investigation study. **Methods:** The crude extract (CE) was macerated in Ethyl Acetate and Butanol in the SCC9, CAL 27 and Hacat strains, treated with 125 µg/mL of each extract for cell viability, migration, proliferation and immunocytochemistry tests. **Results:** The butanolic extract of *P. Americana* inhibited cell proliferation and migration, as well as cell viability. A reduction in KI-67 expression was observed, ie there was an inhibition of cell

division. Conclusion: *Persea Americana* seed butanolic extract has shown strong potential to become a more robust and complete study. Preliminary in vitro data show that the butanolic extract of *P. americana* seed could be an adjuvant treatment in the future. In vitro data demonstrate that *P. americana* seed ethanol extract may be an adjuvant treatment in the near future.

Keywords: Cancer; oral; *Persea Americana*; phytochemicals; HPLC.

Introduction

Cancer is one of the leading causes of death in the world with a high incidence and mortality. These levels of mortality, combined with the lack of effective treatment, have stimulated interest in research into the use of natural, biological or synthetic agents capable of suppressing, reversing or preventing the early stages of carcinogenesis, known as chemopreventives. (Ding et al., 2007; Freire et al., 2021; Sporn, 1976). Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a worldwide health problem and is the most common malignant neoplasm of the oral cavity (de Souza et al., 2020; Guimaraes et al., 2016b), responsible for more than 95% of all head and neck neoplasms and is among the eight leading causes of cancer-related death worldwide (Peng et al., 2020).

Alcohol and tobacco consumption are currently the most critical risk factors for OSCC (Guimaraes et al., 2016b; Warnakulasuriya, 2009). However, intrinsic factors are associated with its occurrence and development, which makes the treatment process complex due to many factors such as a variety of genes that participate and play a synergistic role, and different genes that play distinct roles (Guimaraes et al., 2016b; Speksnijder et al., 2010; Stelzle et al., 2013; Warnakulasuriya, 2009; Zhang et al., 2021).

OSCC treatment aims to establish effective preventive and therapeutic measures against the neoplasm, preserve or restore form and function, minimize treatment sequelae and prevent recurrence (Cangussu et al., 2022; Guimaraes et al., 2016a; Guimaraes et al., 2016b). Modalities currently available for OSCC include surgery, radiation therapy, chemotherapy, combined modality treatments, and primary and secondary prevention strategies, including lifestyle changes and chemoprevention (Cangussu et al., 2022; Shah and Gil, 2009).

It is reported that vegetable consumption can reduce the risk of neoplasia since the protective effect of fruits and vegetables depends on several antineoplastic components present in these foods. Efforts continue to identify individuals and combinations of phytochemicals that aim to selectively act on preneoplastic and neoplastic cells.

Avocado, the fruit of the *Persea americana* tree, is widely consumed as food around the world, and this plant is also used for medicinal purposes. The health benefits of avocado may be due to its content of more than 20 essential nutrients and several phytochemicals potentially exerting cancer-preventing effects. (Ding et al., 2007).

This vegetable is a member of the Lauraceae family, common in tropical and subtropical regions. Avocado is mainly consumed as a fresh fruit, resulting in the production of a considerable amount of solid waste worldwide (Kosinska et al., 2012). A part of the avocado is the seed, which is usually wasted. The seed contains secondary metabolites that belong to the class of alkaloids, triterpenoids, tannins, flavonoids, saponins and polyphenols, which generally have a pharmacological effect (Abubakar et al., 2017). Although the health benefits of avocados have been known for many years, the cellular and molecular mechanisms of the phytochemicals responsible for cancer prevention are largely unknown. Therefore, this article aimed to investigate the antineoplastic action of the fruit of *Persea Americana* in OSCC.

Material and Methods

Ethical approval

All performed procedures involving this study were conducted following the ethical standards of the institutional and national research committees. Ethical approval for this study (Nº. 52760016.9.0000.5146) was obtained from the Institutional Review Board.

Getting the Avocado Seed

The avocado (*Persea americana*) seeds used in the study were obtained from a rural producer (16°52'49.8"S 43°57'23.3"W) with a plantation located in the city of Montes Claros-MG Brazil, between the months of May and June 2018, which coincide with the fruit's ripening season. Ripe avocados were selected based on skin appearance, fruit palpability (slightly yielding to gentle pressure) and pulp appearance (green/yellow creamy flesh without black spots) (Silva-Platas et al., 2012).

Obtaining Extracts

The seed was sanitized, sectioned to facilitate drying, dried and crushed to an extremely fine powder. The process of obtaining the crude extract (CE) consisted of the exhaustive maceration of 100g of the powder in ethanol 99% P.A. (Synth) for 7 days protected from light (Extraction). After maceration, the solution was dried in a circulating oven for ethanol evaporation.

For the fractionation of CE, 1g of the powder obtained after evaporation of ethanol was partitioned using Petroleum Ether P.A./ACS (NEON, MSDS No. 01190) as a solvent to eliminate the lipid constituents (Abubakar et al., 2017). Then the CE was macerated in Dichloromethane (Anhydrol- Code: PAP.A-1986), Ethyl Acetate (Anidrol, Code: PAP.A-8457) and Butanol (Anhydrol, Code: PAP.A-1205) respectively. At the end of each solvent, the residual plant material and the liquid fraction went through a drying process.

Cells and experimental conditions

The SCC9 (Code. 0196) and CAL 27 (Code. 0326) cell line, tongue squamous cell carcinoma, both were acquired at the Bank of Cells of Rio de Janeiro (BCRJ). The cell line Hacat, human immortalized keratinocytes, are donation Lídia Maria de Andrade-DDS / Ph.D. Nanobiomedical Research Group- Department of Physics - ICEX / Federal University of Minas Gerais - UFMG. Cells were cultured in DMEM/Ham's F-12 supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.4 µg/mL hydrocortisone (Gibco, USA, Catalog number: 10437028), at 37°C with 5% CO₂ in a humidified air atmosphere. All experiments were performed in triplicate. For use in in vitro biological tests, initially 50 mg/mL of each extract was diluted in 100µL of ethanol. To this mixture was then added 900 µL of incomplete medium (stock solution). To obtain the solution to be used for the treatment of cell lines, the stock solution was diluted to a final concentration of 125 µg/mL in incomplete medium.

HPLC chromatography

For HPLC chromatography at the Laboratory of Enzymology and Protein Physical-Chemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Luna column, 5µ, C18 (2), 100 Å, 250 mm x 10.0 mm (Phenomenex) with a Supelco pre-column filter, 0.015 inches, attached to a SHIMADZU UFLC system (composed of LC-20AD pump modules, DGU-20A3 decaseifier, SIL-10AF auto-injector, UV/ Vis SPD-20A, communication CBM-20A), a PHARMACIA LKB 2155 column oven and a FRAC-100

PHARMACIA fraction collector. The sample was washed with mobile phase in 100% acetonitrile solution plus 0.1% trifluoroacetic acid (B). Soon after, it was equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid solution (A). The samples applied in aliquots between 40 and 60 mg were solubilized in 450 μ L of the mobile phase (A), centrifuged at 12,000 x g for 5 minutes, then the supernatant was filtered through a 0.45 μ m filter. This volume was applied to the column and the following gradient was performed: from 0 to 20 minutes for 100% of the phase (A), 20 to 140 minutes for 80% of the phase (B), 140 to 142 minutes for 100% of the phase (B) and 142 to 162 minutes of phase (B). Following a flow of 60 mL.h⁻¹, the eluted material was monitored at absorbances of 220 and 280 nm, with a temperature of 40°C for the oven where the column was present.

Cell viability assay

The cell viability was checked through MTT assay. Cells were seeded in 96-well plate at the density of 5×10^3 cells/well and left in complete media containing 10% FBS for 24h. The cells were treated with 500, 250 and 125 μ g/mL for 24h for determination the concentration. Next, the cells were incubated with 0.5 mg/mL MTT (dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide, Invitrogen, EUA) for 4 h. Posteriorly, MTT solution was removed and the formazan crystals were solubilized in dimethyl sulfoxide. Absorbance at 540 nm was measured with a spectrophotometer (dr-200b microplate reader –DIATEK). And a cell viability assay by MTT was performed after each degree of purification.

Cell proliferation

Cells were counted using a Newbauer chamber, in the density of 2×10^5 OSCC and HacaT cells (Guimaraes et al., 2016a; Sobrinho Santos et al., 2017). Was plated 24-well plate and incubated at 37 ° C in CO₂ atmosphere for approximately 24h to establish adherent monolayers. Then, cells were treated with the butanol extract concentration de 125 μ g/mL was previously defined through in the MTT assay. All groups were performed in triplicate.

Migration assay

Wound healing method was used to test the cell migration (de Souza et al., 2020; Domingos et al., 2017; Guimaraes et al., 2016a; Sobrinho Santos et al., 2017). SCC9 cells were in plated 24-well plate at a density of 2.5×10^5 cells and maintained in culture for 24h. Before treatment, to determine the cell migration, a lesion was created on the monolayer cells using a

sterile 10 μ L pipette tip. Next, all experimental groups were photographed using an Olympus IX81 inverted microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) coupled to camera SC30 (Olympus, Center Valley, PA, USA), and subsequently incubated with the different treatments by 24h. The changes in the distance between the lesion edges area were monitored with the new photography. The migration rate (%) was measured by software Image J as the distance that cells migrate regarding the original distance of the lesion.

Images of the wounded cell monolayers were taken before and at 24h after wounding.

Immunocytochemical assay

Immunocytochemical was performed as described before (Guimaraes et al., 2016b) with necessary adaptations. A density of 6×10^4 OSCC cells was plated in 6 wells culture plates and submitted to the treatment. Then the cells were fixed with 70% ethanol for 30 min. Endogenous peroxidase was blocked by incubation with 0.3% H₂O₂ in ethanol for 30 min. The following primary monoclonal antibodies were used: anti-Ki-67 (1:100, H-300: catalog: sc-15402, Santa Cruz, CA, EUA). The monoclonal antibody was incubated for 18h at 4°C. The primary antibody against Ki-67 was detected using the Universal HRP Immunostaining Kit (KP-500, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA). Signals were developed with 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride for 1 min and counterstained with Mayer's hematoxylin for 3 min. Negative controls were performed by replacing the primary antibody with PBS. Slides were photographed on Brightfield microscope Carl Zeiss Axioskop 40 microscope and Axiovision software at 20 \times . The manual counts were performed in merge image by ImageJ software 28. Immunocytochemistry analysis of investigated antigen was carried out by determining the percentage of positively stained viable cells in all fields counted.

The numbers of positively stained and no stained cells were recorded separately. A negative result was defined as the absence of stained and viable nuclei.

Statistical analysis

Kolmogorov Smirnov and the Shapiro-Wilk Tests were carried out to evaluate data distribution. After the definition of the data distribution, an appropriate test was conducted. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$. Analyses were performed using SPSS (Version 18.0) and GraphPad Prism software (Version 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Determination of working concentration by cell viability test (MTT)

The concentration of 125 µg/mL had a significant effect on the SCC9 cell line in both the acetate extract (Figure 1A) and butanol (Figure 1B), when compared to the control and vehicle groups. After this test, we chose only one concentration for the other experiments. This assay showed that the concentration of 125 µg/mL presented the best result and was therefore chosen. This was the minimum dose of both extracts among those tested capable of producing a therapeutic effect (Figure 1).

HPLC purification steps

The extract “Acetate 125 µg/mL” was purified by HPLC chromatography (Figure 2). The actives present at the times 9 to 11 minutes (acetate 1 1°HPLC), 37 and 38 minutes (acetate 2 1°HPLC), 43-48 minutes (acetate 4 1°HPLC) and 49-80 minutes (acetate 5 1°HPLC) underwent a new cell viability test to verify the biological activity of each active on the SCC9 strain (Figure C).

The extract “Butanol 125 µg/mL” was purified by HPLC (Figure 2b). The actives present at times 9 to 11 minutes (butanol 1 1°HPLC), 37 and 38 minutes (butanol 2 1°HPLC), 41-48 minutes (butanol 3 1°HPLC) and 49-80 minutes (butanol 4 1°HPLC) underwent a new cell viability test to verify the biological activity of each active on the SCC9 strain (Figure D). Only the actives present in “Butanol 4” at a concentration of 125µg/mL, showed antineoplastic activity in SCC9 (Figure D). Therefore, only this active present between 49 and 80 minutes of retention went through a new HPLC purification step.

After the purification step, new cell viability tests were performed to determine which actives present in each retention peak would present better biological activity. The peaks between the times 54-57 minutes (butanol 1 125µg/mL) and 61-64 minutes (butanol 3 125µg/mL) were selected for these new times and only the peaks between the times 61 to 64 minutes showed efficient results. on the cell viability of the SCC9 lineage (Figure 3).

Dose-response curve of butanol extract in different cell lines

A new MTT test was performed to verify the effect of butanol at a concentration of 125µg/mL in HacaT and Cal27 strains. We observed that both strains showed low cell viability when

these cells were treated with the butanol extract and compared with the control and vehicle groups (Figures 4A and 4B). These results show that the same concentration of 125µg/mL used in the SCC9 strain has a significant effect on the Hacat and Cal27 strains.

Butanol extract reduces cell migration

The migration assay results indicate that after 24 hours, cells treated with the butanol extract at a concentration of 125 µg/mL significantly inhibited cell migration compared to the control and vehicle groups in the SCC9, Cal27 and Hacat lines (Figure 5A, 5B and 5C). These results indicate that the actives present in the butanol extract, have an effect that inhibits migration in the tested strains.

Butanol extract reduces cell proliferation

The results of the cell proliferation assay indicate that after 24 hours, the groups treated with butanol extract at a concentration of 125 µg / mL purification degree 1, the cells showed a significant reduction in cell proliferation when compared to the control and vehicle groups in the SCC9 lines, Cal27 and Hacat (Figure 6A, 6B and 6C). These results indicate that the actives present in the butanol extract present antiproliferative substances in the tested strains.

Butanol extract reduces cell proliferation and migration of the SCC9 strain

The migration assay results indicate that after 24 hours, cells treated with the butanol extract at a concentration of 125 µg/mL had significantly inhibited cell proliferation and migration compared to control and vehicle groups in the SCC9 strain (Figure 7). These results indicate that the actives present in the butanol extract have an effect that inhibits proliferation and, consequently, migration in the SCC9 strain.

Butanol extract reduces the expression of both Ki-67

Ki-67 significantly influences the malignancy of oral diseases that already have the potential for malignancy. SCC9 cells exhibit robust expression of the proliferation marker Ki-67 (Figure 8). The butanol extract group dramatically reduced Ki-67 staining (Figure 8). In this study, our results demonstrate that KI-67 protein expression was dramatically reduced by butanol extract treatment (Figure 8). Furthermore, a clear hypotrophy was observed in the treated SCC9 cells.

Discussion

The fruits of *Persea americana* are widely consumed by the population. The pulp contains up to 33% oil and is rich in monounsaturated fatty acids. Avocado seed is discarded in most countries, although in some, such as Niger, the seed is consumed. These residues of avocado peel and seed are contaminants of nature and the main concern is the treatment and disposal of these food residues, which results in uncontrolled decomposition added to global warming and health risks (Ojewole et al., 2007; Ortiz et al., 2004; Owolabi et al., 2005; Padilla-Camberos et al., 2013; Tesfaye et al., 2022).

Epidemiological studies show a protective effect of diets rich in vegetables in relation to neoplasms, drawing attention to the possibility that biologically active secondary metabolites present in different parts of plants exert antineoplastic activity (Silva-Platas et al., 2012). This huge group of compounds called “phytochemicals” are responsible for the flavor and color of edible plants and beverages derived from them (Domingos et al., 2017; Sobrinho Santos et al., 2017). Many of these compounds have also exerted antineoplastic effects in studies of animal models of malignant tumor development, in which many investigations were carried out to define their diverse biological activities at the molecular level (Ortiz et al., 2004). Chemoprevention with pharmacological doses of compounds isolated from plants and fruits or the development of “custom” vegetables can be valuable, but these strategies require a risk-benefit ratio based on a thorough understanding of long-term biological effects (Ojewole et al., 2007).

Several parts of *P. americana* Mill are widely used in traditional medicines by Africans (Padilla-Camberos et al., 2013) for the treatment, management and/or control of a variety of human diseases, including childhood seizures and epilepsy (Paul et al., 2011).

Other findings report that phytochemicals extracted from avocado induce cell cycle arrest, inhibiting growth, leading to apoptosis in pre-malignant and neoplastic cell lines (Falodun et al., 2013).

Medicinal plants represent a vital source of new bioactive compounds that can be used as chemotherapeutic agents against cancer (Martin-Cordero et al., 2012). In addition, other studies have shown that *P. americana* Mill (Lauraceae) inhibits growth and/or induces apoptosis in prostate and oral epithelial cancer cell lines (Bonilla-Porras et al., 2013; D'Ambrosio et al., 2011).

Falodun *et al.* (2013) reported that a *P. americana* extract at a concentration of 10 µg/mL induced a significant reduction in MCF-7 proliferation, similar to the results found in our study. In contrast, proliferation of MCF-12a cells (non-tumorigenic mammary epithelial cell line) was significantly stimulated by 10 µg/mL (Falodun *et al.*, 2013).

Results found by Paul *et al.* (2011) demonstrated that an ethanolic extract of avocado has an inhibitory action on the proliferation and death of human oral malignant cells through the action of reactive oxygen species (ROS) inducing apoptosis (Paul *et al.*, 2011). D'Ambrosio *et al.* (2011) demonstrated that a chloroform extract of *P. americana* inhibited the growth of human oral cancer cell lines (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

Studies by Ding H and D'Ambrosio (2007) identified that the potential anticancer activity of avocado pulp extracts may be related to the inhibition of cell growth through the induction of tumor suppressor p21 and reduction of cell cycle proteins, cyclins D1, B1, A (Ding *et al.*, 2007). Previously published studies indicated that the chloroform extract of avocado induces apoptosis through the modulation of mitochondrial ROS production at concentrations ≥ 30 µg/ml, suggesting that the possible mechanism that acts in the inhibition of migration and proliferation of the SCC9, CAL27 and Hacat cell lines used in this study may be associated with the production of ROS (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

The cellular response to harmful agents contained in extracts, such as polyphenols, steroids, triptenoids and tannins, may be related to a sequence of events that cause cellular apoptosis (Ding *et al.*, 2007). The avocado extract showed the presence of a wide variety of secondary metabolites, which can be used as anticancer compounds (Bonilla-Porras *et al.*, 2013). As in our findings, the results by Velderrain *et al.* showed that avocado peel, pulp and seed extracts decreased the viability of Caco-2 cell lines in a dose-dependent and time-dependent manner. According to these results, avocado peel and seed extracts produced a greater antiproliferative effect than pulp extracts. (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2021).

Phenolic compounds are abundant in the bark and seed of *P. Americana* (Rodríguez Carpena *et al.*, 2011). Phenolic acids, flavonoids and tannins are among the most relevant types of phenolic compounds present in avocados. (Salazar-López *et al.*, 2020). The amount of this compound found in the seed is 50 mg GAE/g extraction for 10 days and ethanol as extraction solvent, similar to the extraction performed in this study.

Conclusion

Our study with the butanol extract of *Persea Americana* seed showed that it has strong potential to become a more robust and complete study. Preliminary in vitro data show that the butanolic extract of *P. americana* seed could be an adjuvant treatment in the future. In the study it is still necessary to carry out more in vitro analyzes such as the formation of reactive oxygen species and cell death by the ethidium bromide and acridine orange method to understand the mechanism that the extract acts on neoplastic cells. The study aimed to evaluate the feasibility of a treatment with active compounds in a type of oral neoplasm in vitro. We believe that we may have more promising data for the treatment of oral neoplasia in the studied strain.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Figure legends

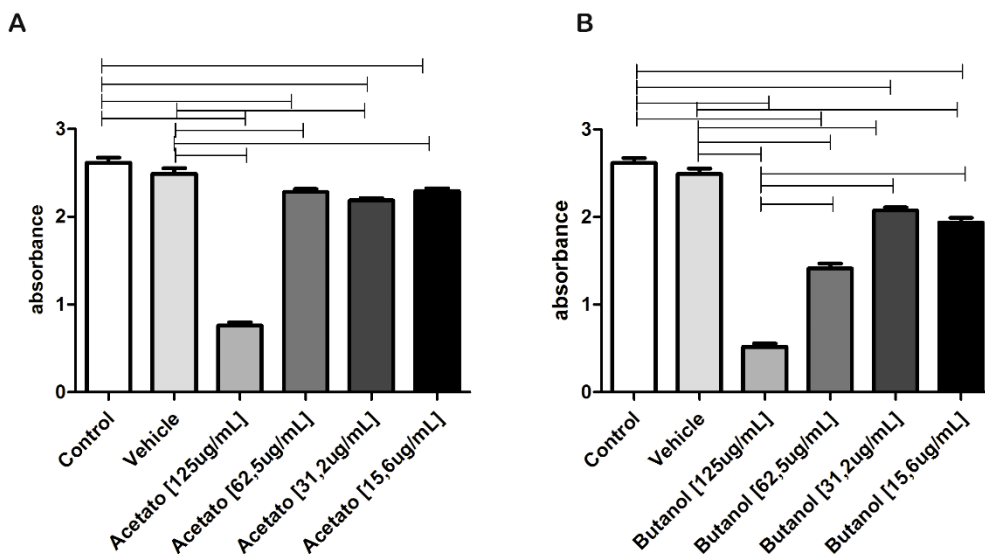


Figure 1: Determination of the working dose through the MTT test.

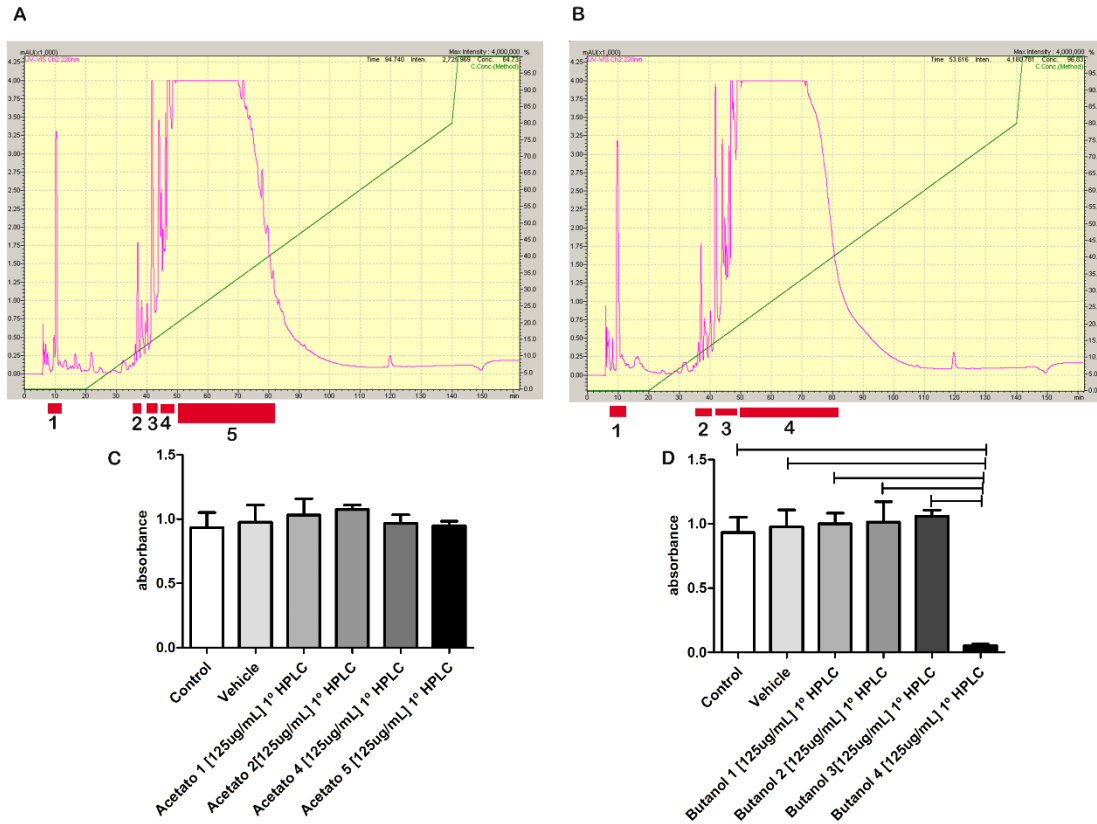


Figure 2: Figures A and B consist of the purification chart referring to the best performing actives of the acetate and butanol extracts, respectively. Figure C demonstrates the cell viability test of the SCC9 strain of the active peaks the aceto extract and Figure D demonstrates the cell viability test of the SCC9 strain of the active butanol extract.

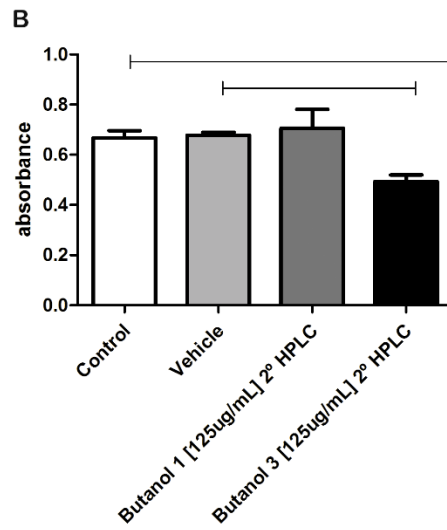


Figure 3: Cell viability test after the 2nd chromatography.

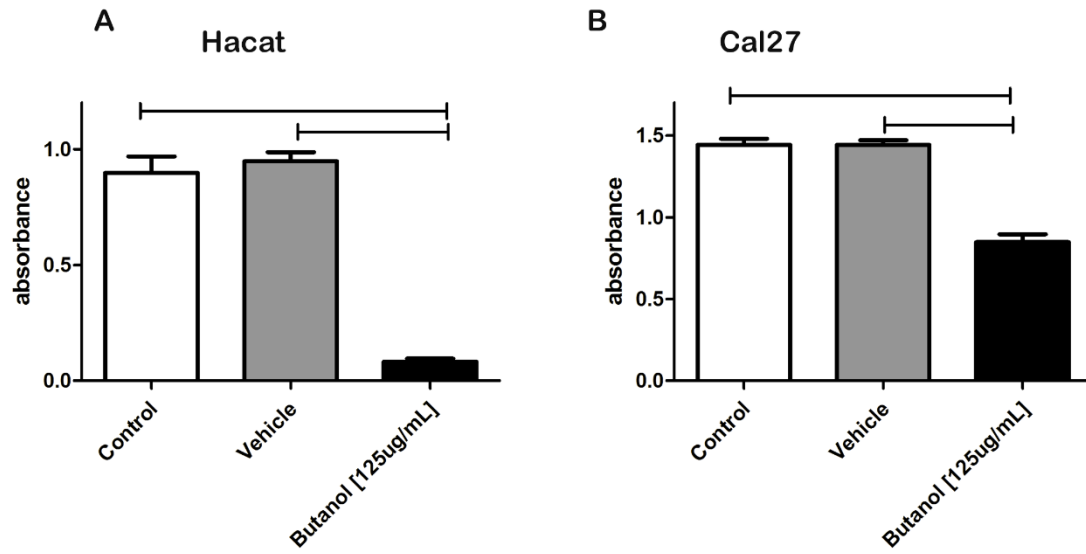
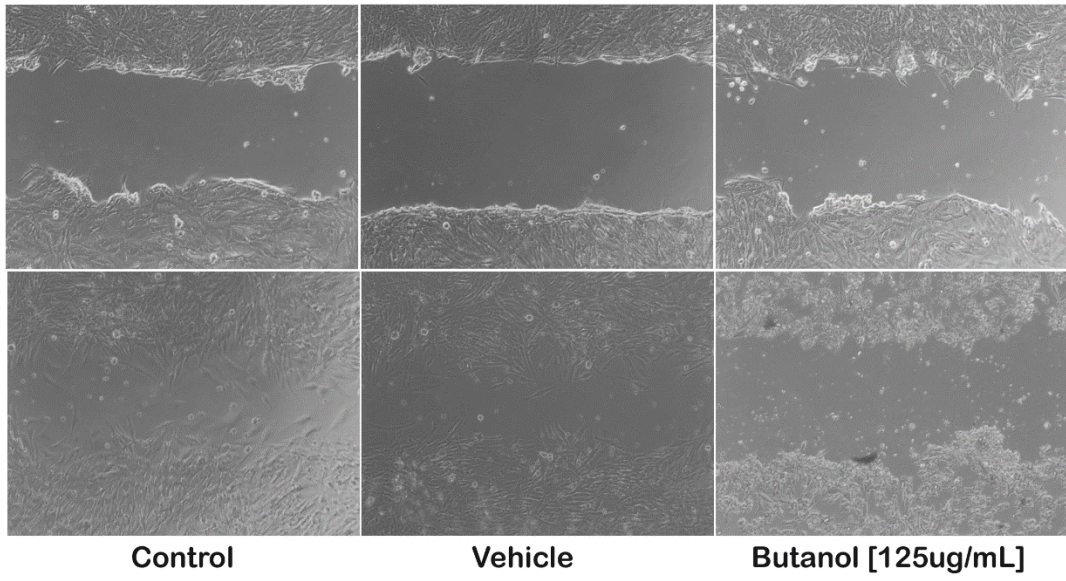
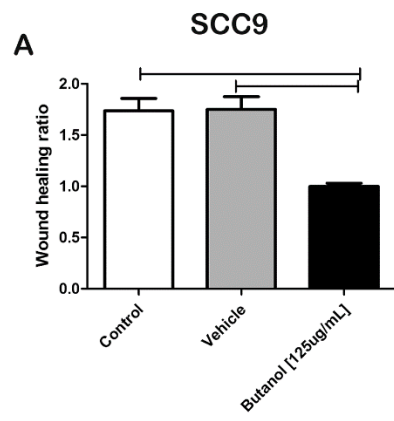
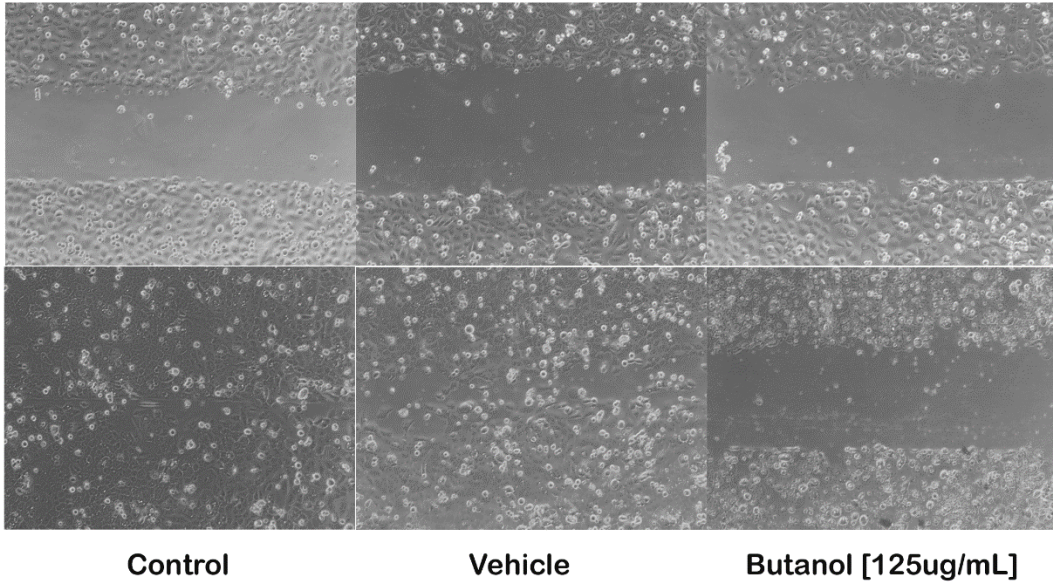
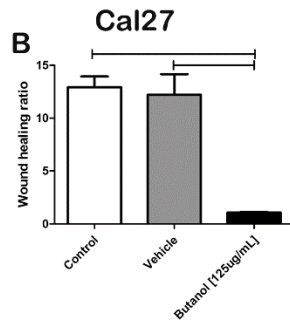


Figure 4: Evaluation of the effect of butanol extract at a concentration of 125 μ g/mL in Hacat and Cal27 strains.





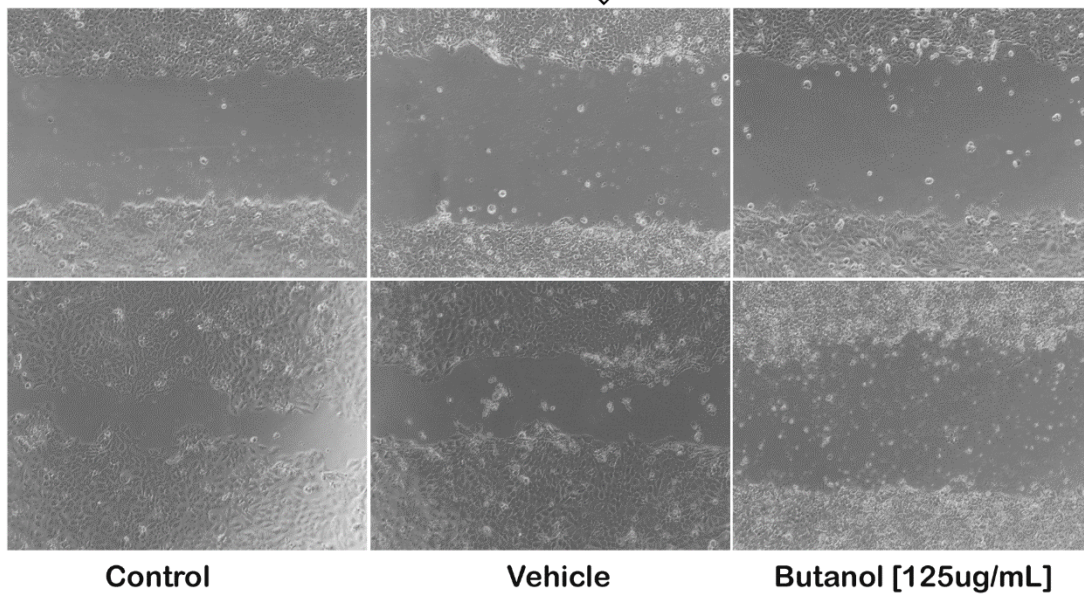
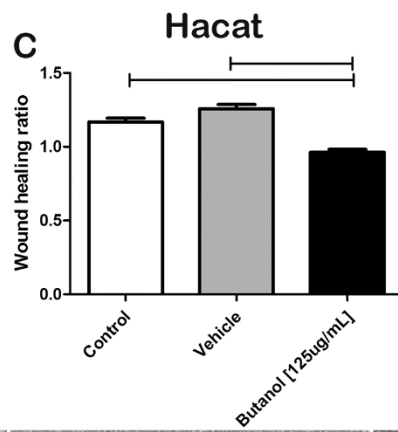


Figure 5: Effect of butanol extract 125 μ g/mL purification grade 1 on cell migration in SCC9, CAL27 and Hacat lines.

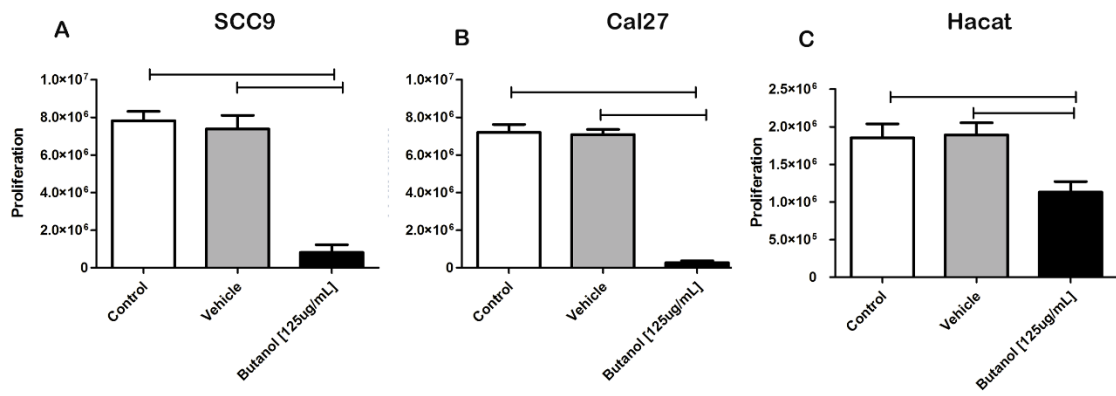


Figure 6: Antiproliferative effect of butanol extract on SCC9 (Figure 6A), Cal27 (Figure 6B) and Hacat (Figure 6C) strains.

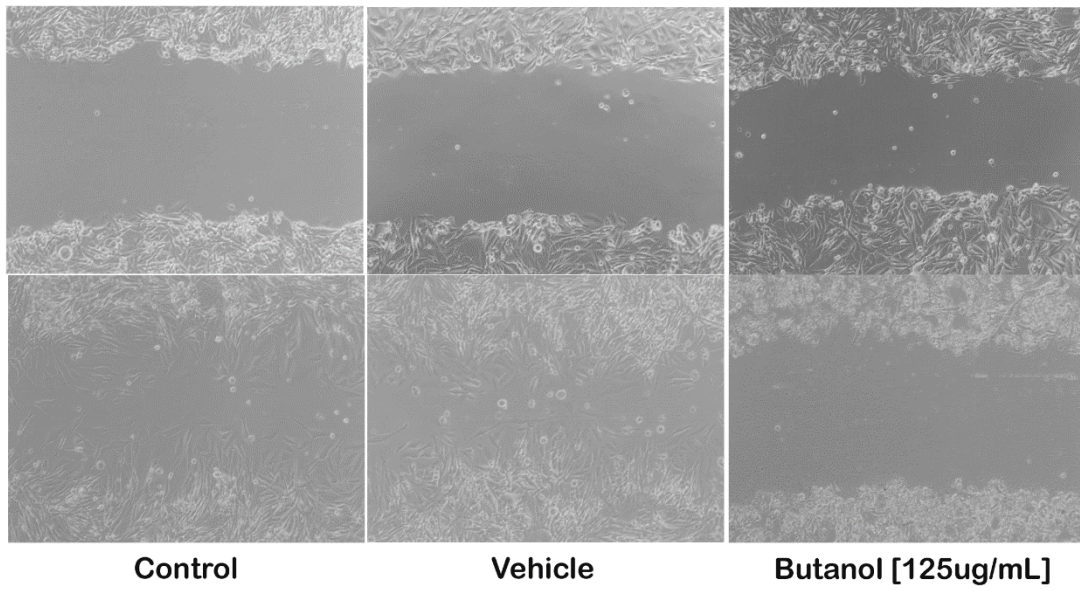
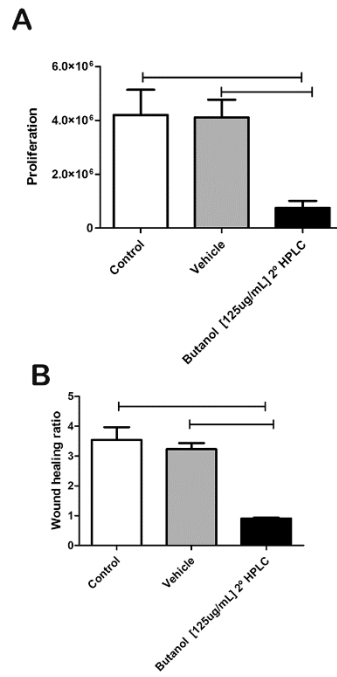


Figure 7: Effect of 125µg/mL Butanol extract after 2nd HPLC (purification phase) on cell proliferation and migration in the SCC9 strain.

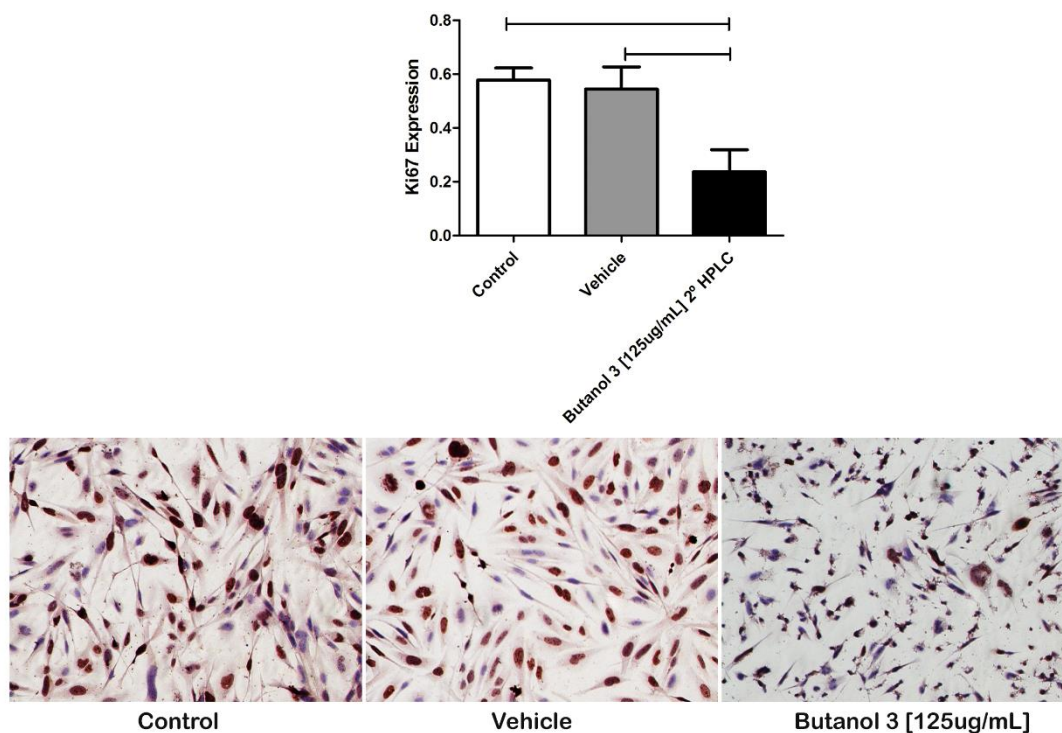


Figure 8: Effect of 125µg/mL Butanol extract on cell proliferation through the assay with KI67 marker in the SCC9 lineage.

Referencias

- Abubakar, A.N.F., Achmadi, S.S., Suparto, I.H.J.A.P.J.o.T.B., 2017. Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. *7*, 397-400.
- Bonilla-Porras, A.R., Salazar-Ospina, A., Jimenez-Del-Rio, M., Pereanez-Jimenez, A., Velez-Pardo, C., 2013. Pro-apoptotic effect of *Persea americana* var. Hass (avocado) on Jurkat lymphoblastic leukemia cells. *Pharm Biol.*
- Cangussu, L.M.B., de Souza, L.R., de Souza, M.G., Junior, R.S.M., Muehlmann, L.A., de Souza, P.N., Farias, L.C., Santos, S.H.S., de Paula, A.M.B., Guimaraes, A.L.S., 2022. Photodynamic therapy mediated by nanoparticles Aluminum Chloro Phthalocyanine in oral squamous carcinoma cells. *Lasers Med Sci.*

D'Ambrosio, S.M., Han, C., Pan, L., Kinghorn, A.D., Ding, H., 2011. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 465-469.

de Souza, M.G., de Jesus, S.F., Santos, E.M., Gomes, E.S.B., de Paulo Santiago Filho, A., Santos, E.M.S., da Silveira, L.H., Santos, S.H.S., de Paula, A.M.B., Farias, L.C., Guimaraes, A.L.S., 2020. Radiation Therapy Reduced Blood Levels of LDH, HIF-1alpha, and miR-210 in OSCC. *Pathol Oncol Res* 26, 433-442.

Ding, H., Chin, Y.W., Kinghorn, A.D., D'Ambrosio, S.M., 2007. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Semin Cancer Biol* 17, 386-394.

Domingos, P.L.B., Souza, M.G., Guimaraes, T.A., Santos, E.S., Farias, L.C., de Carvalho Fraga, C.A., Jones, K.M., Santos, S.H.S., de Paula, A.M.B., Guimaraes, A.L.S., 2017. Hypoxia reduces the E-cadherin expression and increases OSCC cell migration regardless of the E-cadherin methylation profile. *Pathol Res Pract* 213, 496-501.

Falodun, A., Engel, N., Kragl, U., Nebe, B., Langer, P., 2013. Novel anticancer alkene lactone from *Persea americana*. *Pharm Biol* 51, 700-706.

Freire, D.R.G.C., Cassiano, C.Z.d.C., Soares, K.L., Lemos, M.F., Pimentel-Schmitt, E.F., Fronza, M., Endringer, D.C., Scherer, R.J.C.R., 2021. Atividades quimiopreventiva de câncer e antioxidante de sementes, casca e polpa de uva híbridas Maximo (IAC 138-22) em cinco diferentes estágios de maturação. 52.

Guimaraes, T.A., Farias, L.C., Fraga, C.A., Feltenberger, J.D., Melo, G.A., Coletta, R.D., Souza Santos, S.H., de Paula, A.M., Guimaraes, A.L., 2016a. Evaluation of the antineoplastic activity of gallic acid in oral squamous cell carcinoma under hypoxic conditions. *Anticancer Drugs* 27, 407-416.

Guimaraes, T.A., Farias, L.C., Santos, E.S., de Carvalho Fraga, C.A., Orsini, L.A., de Freitas Teles, L., Feltenberger, J.D., de Jesus, S.F., de Souza, M.G., Santos, S.H., de Paula, A.M., Gomez, R.S., Guimaraes, A.L., 2016b. Metformin increases PDH and suppresses HIF-1alpha under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7, 55057-55068.

Kosinska, A., Karamac, M., Estrella, I., Hernandez, T., Bartolome, B., Dykes, G.A., 2012. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. *J Agric Food Chem* 60, 4613-4619.

Martin-Cordero, C., Leon-Gonzalez, A.J., Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., Lopez-Lazaro, M., 2012. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Curr Drug Targets* 13, 1006-1028.

Ojewole, J.A., Kamadyaapa, D.R., Gondwe, M.M., Moodley, K., Musabayane, C.T., 2007. Cardiovascular effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (avocado) aqueous leaf extract in experimental animals. *Cardiovasc J Afr* 18, 69-76.

Ortiz, M.A., Dorantes, A.L., Gallindez, M.J., Cardenas, S.E., 2004. Effect of a novel oil extraction method on avocado (*Persea americana* Mill) pulp microstructure. *Plant Foods Hum Nutr* 59, 11-14.

Owolabi, M.A., Jaja, S.I., Coker, H.A., 2005. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. *Fitoterapia* 76, 567-573.

Padilla-Camberos, E., Martinez-Velazquez, M., Flores-Fernandez, J.M., Villanueva-Rodriguez, S., 2013. Acute toxicity and genotoxic activity of avocado seed extract (*Persea americana* Mill., c.v. Hass). *ScientificWorldJournal* 2013, 245828.

Paul, R., Kulkarni, P., Ganesh, N., 2011. Avocado fruit (*Persea americana* Mill) exhibits chemo-protective potentiality against cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocyte culture. *J Exp Ther Oncol* 9, 221-230.

Peng, Q.S., Cheng, Y.N., Zhang, W.B., Fan, H., Mao, Q.H., Xu, P., 2020. circRNA_0000140 suppresses oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by targeting miR-31 to inhibit Hippo signaling pathway. *Cell Death Dis* 11, 112.

Salazar-López, N.J., Domínguez-Avila, J.A., Yahia, E.M., Belmonte-Herrera, B.H., Wall-Medrano, A., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.J.F.R.I., 2020. Avocado fruit and by-products as potential sources of bioactive compounds. 138, 109774.

Shah, J.P., Gil, Z., 2009. Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol* 45, 394-401.

Silva-Platas, C., Garcia, N., Fernandez-Sada, E., Davila, D., Hernandez-Brenes, C., Rodriguez, D., Garcia-Rivas, G., 2012. Cardiotoxicity of acetogenins from *Persea americana* occurs through the mitochondrial permeability transition pore and caspase-dependent apoptosis pathways. *J Bioenerg Biomembr* 44, 461-471.

Sobrinho Santos, E.M., Guimaraes, T.A., Santos, H.O., Cangussu, L.M.B., de Jesus, S.F., Fraga, C.A.C., Cardoso, C.M., Santos, S.H.S., de Paula, A.M.B., Gomez, R.S., Guimaraes, A.L.S., Farias, L.C., 2017. Leptin acts on neoplastic behavior and expression levels of genes

related to hypoxia, angiogenesis, and invasiveness in oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 39, 1010428317699130.

Speksnijder, C.M., van der Glas, H.W., van der Bilt, A., van Es, R.J., van der Rijt, E., Koole, R., 2010. Oral function after oncological intervention in the oral cavity: a retrospective study. *J Oral Maxillofac Surg* 68, 1231-1237.

Sporn, M.B.J.C.r., 1976. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. 36, 2699-2702.

Stelzle, F., Knipfer, C., Schuster, M., Bocklet, T., Noth, E., Adler, W., Schempf, L., Vieler, P., Riemann, M., Neukam, F.W., Nkenke, E., 2013. Factors influencing relative speech intelligibility in patients with oral squamous cell carcinoma: a prospective study using automatic, computer-based speech analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42, 1377-1384.

Tesfaye, T., Mebrate, M.A., Gibril, M., Ferede, E., Limeneh, D.Y., Kong, F.J.C.R.i.G., Chemistry, S., 2022. Beneficiation of avocado processing industry by-product: A review on future prospect. 100253.

Velderrain-Rodriguez, G.R., Quero, J., Osada, J., Martin-Belloso, O., Rodriguez-Yoldi, M.J., 2021. Phenolic-Rich Extracts from Avocado Fruit Residues as Functional Food Ingredients with Antioxidant and Antiproliferative Properties. *Biomolecules* 11.

Warnakulasuriya, S., 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45, 309-316.

Zhang, Y., Wang, A., Zhang, X., Wang, X., Zhang, J., Ma, J., 2021. lncRNA LINC01296 Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Development by Binding with SRSF1. *Biomed Res Int* 2021, 6661520.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Achados *in vivo* em humanos e animais mostraram que não há relação entre TA e carcinoma bucal.

Já os dados do nosso estudo piloto com o extrato butanólico da semente de *Persia Americana* mostrou que tem forte potencial para se tornar um estudo mais robusto e completo. Os dados *in vitro* preliminares demonstram que o extrato butanólico da semente da *P. americana* pode ser um tratamento adjuvante num futuro próximo. No estudo piloto ainda é necessário realizar mais análises *in vitro* como a formação de espécies reativas de oxigênio e a morte celular pelo método de brometo de etídio e laranja de acridina para entendermos qual o mecanismo que atua o extrato atua nas células neoplásicas. Ressaltamos que além desses dados é necessário um estudo *in vivo*. O estudo piloto teve como objetivo avaliar a viabilidade de um tratamento fitoterápico para uma neoplasia oral. Acreditamos que poderemos ter mais dados promissores para o tratamento da neoplasia oral.

REFERÊNCIAS

1. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):92.
2. Payne K, Spruce R, Beggs A, Sharma N, Kong A, Martin T, et al. Circulating tumor DNA as a biomarker and liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2018;40(7):1598-604.
3. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988;48(11):3282-7.
4. Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health*. 1997;50(4):307-64.
5. Warnakulasuriya S, Straif K. Carcinogenicity of smokeless tobacco: Evidence from studies in humans & experimental animals. *Indian J Med Res*. 2018;148(6):681-6.
6. Cadoni G, Boccia S, Petrelli L, Di Giannantonio P, Arzani D, Giorgio A, et al. A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2012;32(1):1-11.
7. Windon MJ, D'Souza G, Rettig EM, Westra WH, van Zante A, Wang SJ, et al. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*. 2018;124(14):2993-9.
8. Fung SY, Lam JW, Chan KC. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. *Chin Clin Oncol*. 2016;5(2):18.
9. Xu L, Li YY, Zhang YC, Wu YX, Guo DD, Long D, et al. A Novel Ferroptosis-Related Gene Signature to Predict Prognosis in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Dis Markers*. 2021;2021:5759927.
10. Hammerlid E, Silander E, Hornestam L, Sullivan M. Health-related quality of life three years after diagnosis of head and neck cancer--a longitudinal study. *Head Neck*. 2001;23(2):113-25.
11. Hutchinson MND, Mierzwa M, D'Silva NJ. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene*. 2020;39(18):3638-49.
12. Matsumoto T, Saito Y, Yamashita D, Sato T, Wakabayashi S, Kitahara H, et al. Impact of Active and Historical Cancer on Short- and Long-Term Outcomes in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2021;159:59-64.
13. Itzhaki Ben Zadok O, Hasdai D, Gottlieb S, Porter A, Beigel R, Shimony A, et al. Characteristics and outcomes of patients with cancer presenting with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis*. 2019;30(5):332-8.
14. Tosaka K, Ishida M, Tsuji K, Kanehama N, Koeda Y, Niiyama M, et al. Prevalence, clinical characteristics, and impact of active cancer in patients with acute myocardial infarction: data from an all-comer registry. *J Cardiol*. 2021;78(3):193-200.
15. Yap HY, Tashima CK, Blumenschein GR, Eckles N. Diabetes insipidus and breast cancer. *Arch Intern Med*. 1979;139(9):1009-11.
16. Hong JS, Tian J. Prevalence of anxiety and depression and their risk factors in Chinese cancer patients. *Support Care Cancer*. 2014;22(2):453-9.
17. Stoudemire A, Thompson TL, 2nd. Medication noncompliance: systematic approaches to evaluation and intervention. *Gen Hosp Psychiatry*. 1983;5(4):233-9.

18. van't Spijker A, Trijsburg RW, Duivenvoorden HJ. Psychological sequelae of cancer diagnosis: a meta-analytical review of 58 studies after 1980. *Psychosom Med.* 1997;59(3):280-93.
19. Takahashi T, Hondo M, Nishimura K, Kitani A, Yamano T, Yanagita H, et al. Evaluation of quality of life and psychological response in cancer patients treated with radiotherapy. *Radiat Med.* 2008;26(7):396-401.
20. Grav S, Hellzen O, Romild U, Stordal E. Association between social support and depression in the general population: the HUNT study, a cross-sectional survey. *J Clin Nurs.* 2012;21(1-2):111-20.
21. Association AP. American psychiatric association. 2019.
22. Crocq MA. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. *Dialogues Clin Neurosci.* 2015;17(3):319-25.
23. Kupfer DJ. Anxiety and DSM-5. *Dialogues Clin Neurosci.* 2015;17(3):245-6.
24. Kalin NH. Novel Insights Into Pathological Anxiety and Anxiety-Related Disorders. *Am J Psychiatry.* 2020;177(3):187-9.
25. Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Hettema JMJP, neurosciences c. Genetics of anxiety disorders: Genetic epidemiological and molecular studies in humans. 2015;69(7):388-401.
26. Otowa T, Gardner CO, Kendler KS, Hettema JMJS, epidemiology p. Parenting and risk for mood, anxiety and substance use disorders: a study in population-based male twins. 2013;48(11):1841-9.
27. Mineka S, Zinbarg RJAp. A contemporary learning theory perspective on the etiology of anxiety disorders: it's not what you thought it was. 2006;61(1):10.
28. Jaffee SRJARocp. Child maltreatment and risk for psychopathology in childhood and adulthood. 2017;13:525-51.
29. Gur RE, Moore TM, Rosen AF, Barzilay R, Roalf DR, Calkins ME, et al. Burden of environmental adversity associated with psychopathology, maturation, and brain behavior parameters in youths. 2019;76(9):966-75.
30. Barlow DH, Ellard KK, Sauer-Zavala S, Bullis JR, Carl JRJPS. The origins of neuroticism. 2014;9(5):481-96.
31. Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(11):769-87.
32. Association AP. DSM 5 diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM 5 Diagnostic and statistical manual of mental disorders 2013. p. 947 p.- p.
33. Blanchard EB, Hickling EJ, Buckley TC, Taylor AE, Vollmer A, Loos WR. Psychophysiology of posttraumatic stress disorder related to motor vehicle accidents: replication and extension. *J Consult Clin Psychol.* 1996;64(4):742-51.
34. Kleim B, Wilhelm FH, Glucksman E, Ehlers A. Sex differences in heart rate responses to script-driven imagery soon after trauma and risk of posttraumatic stress disorder. *Psychosom Med.* 2010;72(9):917-24.
35. Menezes A, Sanches GLG, Gomes ESB, Soares RG, Duraes CP, Fonseca LL, et al. The combination of traditional and auricular acupuncture to prevent xerostomia and anxiety in irradiated patients with HNSCC: a preventive, parallel, single-blind, 2-arm controlled study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2021;131(6):675-83.
36. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol.* 1988;56(6):893-7.
37. Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimaraes FSJBJoP. Animal models of anxiety disorders and stress. 2013;35:S101-S11.

38. de Souza MG, Gomes ESB, Costa LB, Andrade ADS, de Jesus SF, de Paula DPS, et al. Might anxiety disorders promote head and neck cancer development? *IBRO Rep.* 2020;9:9-13.
39. Xie H, Li B, Li L, Zou XL, Zhu CR, Li Y, et al. Association of increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels with risk of psychological problems in oral neoplasm patients. *PLoS One.* 2014;9(7):e99179.
40. Curran L, Sharpe L, Butow P. Anxiety in the context of cancer: A systematic review and development of an integrated model. *Clin Psychol Rev.* 2017;56:40-54.
41. Gurevich M, Devins GM, Rodin GM. Stress response syndromes and cancer: conceptual and assessment issues. *Psychosomatics.* 2002;43(4):259-81.
42. Alter CL, Pelcovitz D, Axelrod A, Goldenberg B, Harris H, Meyers B, et al. Identification of PTSD in cancer survivors. *Psychosomatics.* 1996;37(2):137-43.
43. de Souza MG, de Jesus SF, Santos EM, Gomes ESB, de Paulo Santiago Filho A, Santos EMS, et al. Radiation Therapy Reduced Blood Levels of LDH, HIF-1alpha, and miR-210 in OSCC. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(1):433-42.
44. Paul R, Kulkarni P, Ganesh N. Avocado fruit (*Persea americana* Mill) exhibits chemoprotective potentiality against cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocyte culture. *J Exp Ther Oncol.* 2011;9(3):221-30.
45. Fukumasu H, Latorre AO, Bracci N, Górniak SL, Dagli MLZJRBdt. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. 2008;21(2):49-59.
46. Jham BC, ARS F. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(5):704-8.
47. Nakano T, Xu X, Salem AM, Shoukamy MI, Ide H. Radiation-induced DNA-protein cross-links: Mechanisms and biological significance. *Free radical biology & medicine.* 2016.
48. Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nature reviews Cancer.* 2009;9(5):351-60.
49. Tariq A, Sadia S, Pan K, Ullah I, Mussarat S, Sun F, et al. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. *Phytother Res.* 2017;31(2):202-64.
50. Halabi MF, Sheikh BY. Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* extract. *Biomed Res Int.* 2014;2014:906239.
51. Choedon T, Shukla SK, Kumar V. Chemopreventive and anti-cancer properties of the aqueous extract of flowers of *Butea monosperma*. *J Ethnopharmacol.* 2010;129(2):208-13.
52. Samet I, Han J, Jlaiel L, Sayadi S, Isoda H. Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:927619.
53. Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene.* 2005;24(17):2787-95.
54. Brown L, Boswell S, Raj L, Lee SW. Transcriptional targets of p53 that regulate cellular proliferation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2007;17(1):73-85.
55. Dong Y, Sui L, Tai Y, Sugimoto K, Tokuda M. The overexpression of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2001;21(1A):103-8.
56. Ding H, Han C, Gibson-D'Ambrosio R, Steele VE, D'Ambrosio SM. Piroxicam selectively inhibits the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by limiting their progression through the S phase and reducing the levels of cyclins and AP-1. *Int J Cancer.* 2003;107(5):830-6.
57. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2001;23(2):147-59.

58. Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.* 2000;36(2):145-51.
59. Narayanan BA. Chemopreventive agents alters global gene expression pattern: predicting their mode of action and targets. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006;6(8):711-27.
60. Gibbs E, Pan ZQ, Niu H, Hurwitz J. Studies on the in vitro phosphorylation of HSSB-p34 and -p107 by cyclin-dependent kinases. Cyclin-substrate interactions dictate the efficiency of phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22847-54.
61. Ding H, Chin YW, Kinghorn AD, D'Ambrosio SM. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(5):386-94.
62. Nisa S, Bibi Y, Zia M, Waheed A, Chaudhary MF. Anticancer investigations on *Carissa opaca* and *Toona ciliata* extracts against human breast carcinoma cell line. *Pak J Pharm Sci.* 2013;26(5):1009-12.
63. Silva FOdR, Ramos JD, Oliveira MCd, Rufini JCM, Ramos PdSJRC. Fenologia reprodutiva e caracterização físico-química de abacateiros em Carmo da Cachoeira, Minas Gerais. 2014;61(1):105-11.
64. Abubakar ANF, Achmadi SS, Suparto IHJAPJoTB. Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. 2017;7(5):397-400.
65. Tango JS, Carvalho CRL, Soares NBJRBdF. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. 2004;26(1):17-23.
66. RAMOS D, SAMPAIO AJL, S., SAMPAIO. Principais variedades de abacateiro. 2008.
67. Yasir M, Das S, Kharya MD. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(7):77-84.
68. Falcão MdA, PARALUPPI ND, CLEMENT CR, KERR WE, Silva MFJAA. Fenologia e produtividade do abacate (*Persea americana* Mill.) na Amazônia Central. 2001;31:3-9.
69. Tesfaye T, Mebrate MA, Gibril M, Ferede E, Limeneh DY, Kong FJCRiG, et al. Beneficiation of avocado processing industry by-product: A review on future prospect. 2022:100253.
70. Athaydes BR, Alves GM, Assis A, Gomes JVD, Rodrigues RP, Campagnaro BP, et al. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Food Res Int.* 2019;119:751-60.
71. Torres RC, Garbo AG, Walde RZ. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7S1:S167-70.
72. Kosinska A, Karamac M, Estrella I, Hernandez T, Bartolome B, Dykes GA. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. *J Agric Food Chem.* 2012;60(18):4613-9.
73. Dabas D, Shegog RM, Ziegler GR, Lambert JD. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Curr Pharm Des.* 2013;19(34):6133-40.
74. Pahua-Ramos ME, Ortiz-Moreno A, Chamorro-Cevallos G, Hernandez-Navarro MD, Garduno-Siciliano L, Necochea-Mondragon H, et al. Hypolipidemic effect of avocado (*Persea americana* Mill) seed in a hypercholesterolemic mouse model. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012;67(1):10-6.
75. Simões CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento: UFRGS; Florianópolis: UFSC; 2001.*
76. del Refugio Ramos M, Jerz G, Villanueva S, Lopez-Dellamary F, Waibel R, Winterhalter P. Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). *Phytochemistry.* 2004;65(7):955-62.

77. Hashimura H, Ueda C, Kawabata J, Kasai T. Acetyl-CoA carboxylase inhibitors from avocado (*Persea americana* Mill) fruits. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001;65(7):1656-8.
78. Bird IM. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*. 1989;299(6702):783-7.
79. Hagan RL. High-performance liquid chromatography for small-scale studies of drug stability. *Am J Hosp Pharm*. 1994;51(17):2162-75.

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa Produto 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MONTES CLAROS -
UNIMONTES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Uso da laserterapia de baixa potência e da acupuntura no tratamento da mucosite e radiodermatite radioinduzidas em portadores de câncer de cabeça e pescoço

Pesquisador: André Luiz Sena Guimarães

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 48215415.0.0000.5146

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.736.940

Apresentação do Projeto:

Projeto aprovado em dezembro de 2015, solicita a seguinte emenda:

"Surgiu-se a necessidade de avaliar o impacto do câncer na qualidade de vida do indivíduo, por representar uma condição de grave comprometimento, não apenas físico, mas psicológico, emocional, social e ambiental. E, para tanto, será necessário avaliar dentre indivíduos saudáveis a qualidade de vida, para em seguida comparar com indivíduos que receberam esse diagnóstico de doença tão grave e entender a qualidade de vida no início e final do tratamento oncológico em portadores de CCECP".

Avaliação ética da emenda:

A aplicação de questionário para avaliar a qualidade de vida já estava prevista no projeto aprovado em 13/12/2015, contudo o público alvo previsto era composto por 100 indivíduos com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, na revisão da proposta, a população de estudo foi redefinida em dois grupos: 50 indivíduos com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço e 50 indivíduos considerados saudáveis, ou seja, sem esse diagnóstico.

Continuação do Parecer: 1.736.940

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A comparação entre qualidade de vida do paciente oncológico com a de um indivíduo saudável, ativo na sociedade, poderá ajudar nas estratégias de fortalecimento do sujeito convivendo com o câncer. Como desconfortos/riscos foi previsto o possível desconforto em responder questões relativas à vida pessoal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, que já tem aprovação ética. Apresenta emenda para distribuir a população de estudo em dois grupos, com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço e, pessoas saudáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados, apresentado novo TCLE para atender a emenda.

Recomendações:

Apresentação de relatório final por meio da plataforma Brasil, em "enviar notificação".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada a emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda do projeto respeita os preceitos éticos da pesquisa em seres humanos, sendo assim somos favoráveis à aprovação da mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_778997 E1.pdf	29/08/2016 15:33:15		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Análise	TERMO_CONSENTIMENTO_EMENDA.docx	29/08/2016 15:31:09	RAQUEL GUSMÃO SOARES	Aceito

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MONTES CLAROS -
UNIMONTES



Continuação do Parecer: 1.736.940

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2.pdf	17/11/2015 21:09:57	RAQUEL GUSMÃO SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_1.pdf	17/11/2015 21:09:18	RAQUEL GUSMÃO SOARES	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_PDF.pdf	17/11/2015 20:52:17	RAQUEL GUSMÃO SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE BIOBANCO (1).doc	09/07/2015 17:43:38		Aceito
Outros	TCLE BIOBANCO (1).doc	09/07/2015 17:36:39		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MONTES CLAROS, 13 de Setembro de 2016

Assinado por:
SIMONE DE MELO COSTA
(Coordenador)

ANEXO B- Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL 

PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 07 de julho de 2017.
Processo N.º 140
Título do Projeto: AÇÕES METABÓLICAS EM DOENÇAS BUCAIS
Coordenador: Prof. Dr. André Luiz Sosa Guimarães

Histórico

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é a neoplasia maligna mais frequente da região de cabeça e pescoço, representa um dos principais problemas de saúde pública não só no Brasil, mas também em muitos países do mundo devido a sua alta mortalidade e constante mutação. Evidências demonstram que diversas alterações genéticas, epigenéticas e metabólicas estão associadas à patogênese do CCEB. De acordo com a American Cancer Society são esperados cerca de 45.000 novos casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) a ser diagnosticados até o fim de 2015. Apesar do enorme avanço na quimioterapia, radioterapia e procedimentos cirúrgicos, a taxa de sobrevivência pouco mudou nos últimos 30 anos em muitos países. Mais significativamente, para a maioria dos pacientes com CECP, a doença é altamente maligna, com um prognóstico ruim e baixa taxa de sobrevivência. Esta alta taxa de morbidade é devido não só à recorrência da neoplasia local, mas também, devido à metástase para outros órgãos vitais. Abordagens terapêuticas atuais para doenças complexas são limitadas pela falta de caracterização molecular das vias essenciais na iniciação, progressão e cronidade da doença. Estudos recentes demonstram que o Captopril (D-3-mercaptopropanil-L-prolina), um inibidor oralmente ativo da enzima conversora de angiotensina (ACE) que converte a angiotensina I em angiotensina II, é amplamente utilizada no tratamento de hipertensão e insuficiência cardíaca. Além de sua capacidade de reduzir a pressão arterial, captopril tem também várias outras atividades biológicas. Pode melhorar a artrose, reticopatia diabética reversa, aumentar a sensibilidade à insulina, diminuir o risco trombotico, diminuir a aterosclerose ou insuficiência renal. Além disso, os inibidores da ECA são indicados para diminuir o risco de câncer devido a redução de atividade da angiotensina II, que em estudos experimentais foi mostrado que estimula a neovascularização, aumentando a produção do fator de crescimento endotelial vascular, potencializar os efeitos mitogênicos de fator de crescimento epidérmico e induzir oncogenes celulares c-myc, c-fos, cN-myc e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante β .

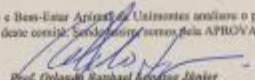
Método

Avaliar Alterações Metabólicas em Doenças Bucais com os Objetivos Específicos:

1. Avaliar o efeito do captopril sobre a proliferação, migração e invaso em linhagens de células neoplásicas de CCEB.
2. Verificar a influência do captopril e do estresse sobre a expressão dos genes Ki67, BAX, BCL2, P53, em células neoplásicas de CCEB.
3. Verificar a influência do captopril sobre a expressão do gene MMP2, TIMP (1-2-3), em células neoplásicas de CCEB.
4. Avaliar uma possível correlação entre a expressão dos genes Ki67, BAX, BCL2, P53 com os parâmetros histológicos, proliferação, migração e invaso em linhagens de células neoplásicas de CCEB tratado com captopril.
5. Analisar, in vivo, o efeito do captopril sobre parâmetros clínicos tumorais (tamanho, metástase locoregional e metástase a distância) na carcinogênese de boca quimicamente induzida.
6. Analisar, in vivo, o efeito do captopril sobre parâmetros clínicos tumorais (tamanho, metástase locoregional e metástase a distância) com carcinogênese de boca quimicamente induzida.
7. Analisar e quantificar a evolução da lesão periapical, e sua perda óssea, em seus aspectos radiográficos e histológicos, em camundongos condicionados ao estresse.
8. Avaliar, e elucidar as questões relacionadas ao presente trabalho no desenvolvimento da lesão periapical e sua perda óssea em camundongos expostos ao estresse.
9. Induzir obesidade e suas características metabólicas através do consumo de dieta hipolipídica em camundongos da linhagem Swiss com carcinogênese de boca quimicamente induzida.
10. Avaliar a evolução no ganho de peso corporal e ingestão calórica dos animais durante o período experimental.
11. Analisar a resistência à insulina da glicose plasmática em jejum, níveis de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL, teste de tolerância de glicose e sensibilidade à insulina. Baseada nas informações contidas no projeto e no Protocolo para uso de animais em Pesquisa e Projeto em Método.

Parecer

A Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal de Unimontes analisou o processo 140 e entende que o mesmo encontra-se completo e dentro das normas deste comitê. Sendo assim, segue pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa


Prof. Orlando Raphael de Jesus Júnior
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal de UNIMONTES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MONTES CLAROS -
UNIMONTES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DE COMPOSTOS DE ANTIHIPÓXICOS EM CARCINOMA DE ESCAMOSAS DE BOCA: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Pesquisador: André Luiz Sena Guimarães

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52760016.9.0000.5146

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.416.795

Apresentação do Projeto:

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é a neoplasia maligna mais frequente da região de

ANEXO D – Questionário Beck Anxiety Inventory (BAI) Produto 1

Beck Anxiety Inventory (BAI)

About: This scale is a self-report measure of anxiety.

Items: 21

Reliability:

Internal consistency for the BAI = (Cronbach's $\alpha=0.92$)
Test-retest reliability (1 week) for the BAI = 0.75 (Beck, Epstein, Brown, & Steer, 1988).

Validity:

The BAI was moderately correlated with the revised Hamilton Anxiety Rating Scale (.51), and mildly correlated with the Hamilton Depression Rating Scale (.25) (Beck et al., 1988)

Scoring:

	Not At All	Mildly but it didn't bother me much	Moderately - it wasn't pleasant at times	Severely - it bothered me a lot
All questions	0	1	2	3

The total score is calculated by finding the sum of the 21 items.
Score of 0 – 21 = low anxiety
Score of 22 – 35 = moderate anxiety
Score of 36 and above = potentially concerning levels of anxiety

References:

Beck, A. T., Epstein, N., Brown, G., Steer, R. A. (1988). [An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties.](#) *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 56, 893-897.

Beck Anxiety Inventory (BAI)

Below is a list of common symptoms of anxiety. Please carefully read each item in the list. Indicate how much you have been bothered by that symptom during the past month, including today, by circling the number in the corresponding space in the column next to each symptom.

	Not At All	Mildly but it didn't bother me much	Moderately - it wasn't pleasant at times	Severely – it bothered me a lot
Numbness or tingling	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Feeling hot	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wobbliness in legs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Unable to relax	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fear of worst happening	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dizzy or lightheaded	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Heart pounding/racing	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Unsteady	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Terrified or afraid	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nervous	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Feeling of choking	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hands trembling	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Shaky / unsteady	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fear of losing control	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Difficulty in breathing	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fear of dying	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Scared	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Indigestion	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Faint / lightheaded	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Face flushed	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hot/cold sweats	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>