

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE APOPTÓTICA DE SUBSTÂNCIA PURA ISOLADA
DE *Cryptocarya mandioccana* EM CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL
IMORTALIZADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).**

Mestranda: Máisa Pasquotto Giocondo

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Araraquara-SP

2007

*"Nascer, morrer, renascer ainda e progredir
sem cessar, tal é a lei".*

Allan Kardec

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado fé, coragem e ter me iluminado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Mário e Isabel pelo dom da vida, por terem me apoiado e protegido, por me ensinarem a ponderar. À Tia Marta pelo incentivo e apoio durante toda minha vida, sempre acreditando em mim. Ao Saulo, meu irmão, por me ensinar que as diferenças nos fazem únicos e especiais. Amo vocês por toda eternidade!

Ao meu grande amor Osvaldo, por me entender, apoiar e me dar o amparo que tanto precisei, só Deus sabe o quanto você é importante pra mim. Simplesmente Te Amo!

À todos meus familiares que de alguma maneira me apoiaram e torceram por mim.

À prof. Dra. Christiane Pienna Soares pela oportunidade e principalmente pelos ensinamentos.

À Mariana pela amizade, apoio e compreensão. Obrigada pelo aconchego familiar dedicado a mim. Mariana e Tiago vocês me retomaram o verdadeiro significado da amizade.

Ao pessoal do laboratório pela amizade e convivência: Paula, Débora, Roberta, Renata, Gisela, Aline, Camila (s), Elaine, Naiara, Fernanda, Angélica, Mauro, Bel, Max, Juliana, Tarsia e Ana.

Ao respaldo do pessoal do Laboratório de Micologia e de Biologia Molecular que sempre estive de portas abertas para me ajudar.

Às secretárias do departamento de Análises Clínicas Eliane e Tirene pelos favores e momentos de descontração.

Às secretárias da pós-graduação: Laura, Sônia e Claudia.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Diversos estudos buscam identificar compostos com atividade seletiva para células tumorais e que possuam mecanismo de ação para desencadear a apoptose. Dentre as substâncias isoladas de *Cryptocarya sp*, algumas estirilpironas, como a goniotalamina, apresentam atividade antiproliferativa e apoptogênica em diferentes linhagens celulares. No presente estudo, foram avaliadas as atividades citotóxica e pró-apoptótica da estirilpirona (criptomoscatona D2) isolada de *Cryptocarya mandioccana*, em linhagens celulares de carcinoma cervical humano infectada por HPV (HeLa e SiHa), não infectada (C33A) e fibroblasto pulmonar humano transformado pelo SV-40 (MRC-5). A atividade citotóxica foi avaliada pelo ensaio do MTT e a apoptose foi avaliada, respectivamente, pelos ensaios de anexina V e a expressão de bak/bcl-2, por citometria de fluxo. Para o ensaio do MTT, as células foram tratadas com estirilpirona (criptomoscatona D2) nas concentrações de 15, 30, 60 e 90 μ M por 6, 24 e 48 horas e por 6 horas com período de recuperação de 24, 48 e 72 horas pós tratamento. Para os ensaios de apoptose, as células foram tratadas por 6 horas e período de recuperação de 24, 48 e 72 horas. O tratamento com a estirilpirona (criptomoscatona D2) ocasionou elevada citotoxicidade dose-resposta e tempo-resposta em HeLa, SiHa, C33A e MRC-5. Embora não haja diferença estatisticamente significativa de citotoxicidade entre as linhagens, aparentemente a citotoxicidade foi maior em HeLa e C33A (tratamento de 24 e 48 horas) que em MRC-5 e SiHa. Ainda, no período de recuperação, HeLa e SiHa aparentemente restabelecem sua capacidade proliferativa, que é diretamente proporcional ao tempo de recuperação, enquanto o mesmo comportamento não é observado em C33A. Ao avaliar a expressão de duas proteínas da via intrínseca de apoptose (bcl-2 e bak), não foi observada modulação dessa expressão entre as linhagens celulares, nas diferentes tempos de recuperação pós-tratamento. Na avaliação de Anexina V, foi observada baixa frequência de células apoptose precoce, bem como apoptose tardia/necrose em todas as linhagens celulares. Em conclusão, a estirilpirona criptomoscato D2 demonstrou elevada atividade antiproliferativa, porém, aparentemente, não possui atividade apoptótica nas concentrações e tempos de tratamento estudados. Possivelmente, a ausência de atividade apoptótica poderia ser resultante da presença de uma cadeia 1,3 butanodiol geralmente inexistente em pironas que possuem essa atividade (por exemplo a goniotalamina).

ABSTRACT

Several attempts have been made to identify chemical compounds with selective cytotoxicity against cancer cells and apoptosis trigger activity. Among the substances isolated from *Cryptocarya sp*, some styrylpyrones, such as goniotalamine, demonstrate antiproliferative and apoptotic activity in abroad human cell lines. In the present study, we evaluated the antiproliferative and apoptotic activities of the styrylpyrone (cryptomoschatone D2) isolated from *Cryptocarya mandioccana* in HPV-infected (HeLa and SiHa) and non-infected (C33A) human cervical carcinoma cell lines, and in human lung's fibroblast immortalized with SV-40 (MRC-5). The antiproliferative activity was evaluated by the MTT assay and the apoptotic activity was investigated by measuring the expression levels of annexin V and bak/bcl-2 by flow cytometry. In the MTT assay, cells were treated with styrylpyrone (cryptomoschatone D2) at a 15, 30, 60 or 90 μ M concentration for 6, 24 or 48 hours as well as for 6 hours followed by a recovery posttreatment period of 24, 48 or 72 hours. In the apoptotic assays, cells were treated for 6 hours followed by a recovery posttreatment period of 24, 48 or 72 hours. High cytotoxicity (dose-response and time-response) was observed in HeLa, SiHa, C33A and MRC-5 cell lines. Although the styrylpyrone cytotoxicity was not significantly different among the cell lines tested, the cytotoxicity was apparently higher in HeLa and C33A than MRC-5 and SiHa in the case of treatments for 24 or 48 hours. Moreover, HeLa and SiHa were able to recover their proliferative status, which were directly proportional to the posttreatment recovery time. On the other hand, C33A did not demonstrate a similar posttreatment recovery. Despite the posttreatment recovery time, the expression of the apoptotic proteins bcl-2 and bak seems not to be modulated by the treatment. In the case of annexin V, it was observed low frequency of early apoptotic as well as late apoptotic/necrotic cells in all cell lines after the posttreatment recovery time. Taken together these results suggest that styrylpyrone (cryptomoschatone D2) possesses high antiproliferative activity but does not apparently trigger either dose-response or time-response apoptotic signals. In addition, the absence of apoptotic activity might be related to the 1,3 butanediol chain, which is not found in pyrones with apoptotic activity (e.g. goniotalamine).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Características morfológicas de apoptose e necrose, p. 10.
- Figura 2:** Regulação das vias intrínseca e extrínseca durante a apoptose, p.10.
- Figura 3:** Sinais de apoptose de via extrínseca e intrínseca, p.12.
- Figura 4:** Mecanismo de permeabilização da membrana externa mitocondrial, p.14.
- Figura 5:** Fórmula estrutural da estirilpirona (criptomoscatona D2) extraída de *Cryptocarya mandioccana*, p.23.
- Figura 6:** Ensaio de citotoxicidade (MTT). Tratamento por 6, 24 e 48 horas , p.33.
- Figura 7:** Ensaio de citotoxicidade (MTT). Tratamento por 6 horas e recuperação de 24, 48 e 72 horas, p.34.
- Figura 8:** Expressão quantitativa de bak e bcl-2, p.37.
- Figura 9:** Ensaio de apoptose (Anexina V), p. 39.
- Figura 10:** Grupos farmacofóricos da goniotalamina, e criptomoscatoona D2, p.46.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – América Type Culture Collection

ATV – Associação de tripsina e versene

¹³C – carbono 13

CDK – quinase dependente de ciclina

CN – controle negativo

CP – controle positivo

CV – controle de veículo

CO₂ – gás carbônico

DMEM – Dulbecco's modification of Eagle's medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

E - early

EGFR – receptor de fator de crescimento epidermal

EM – espectro de massa

EP – erro padrão

FITC – isotiocianato de fluoresceína

g – gravidade

¹H – hidrogênio 1

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HPV - papillomavírus humano

IC₅₀ – índice citotóxico de 50%

IV – infravermelho

KCl – cloreto de potássio

L – late

M – média

mg - miligrama

mL – mililitros

MTT – 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato básico de sódio

ORF - open reading frames

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PE – ficoeritrina

PS – fosfatidilserina

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucleico

UV – ultravioleta

µg - micrograma

µM - micromolar

SUMÁRIO

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Lista de figuras	VI
Lista de abreviaturas	VII
1- INTRODUÇÃO	
1.1- Câncer cervical	02
1.2- Papilomavirus Humano (HPV) e a Célula hospedeira	04
1.3- Morte Celular – Apoptose e Necrose	07
1.4- Apoptose e Anexina V	14
1.5- HPV, Terapia e Apoptose	15
2- OBJETIVOS	20
3- MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1- Extração e preparação da criptomoscatoxa D2	23
3.2- Cultura de células	24
3.3- Determinação do IC50	25
3.4- Citotoxicidade (MTT)	
3.4.1- Tratamento das Linhagens	26
3.4.2- Ensaio de MTT	26
3.5. Expressão de bak e bcl-2	27

3.6- Ensaio de Apoptose (Anexina V)	28
3.7- Análise Estatística	29
4- RESULTADOS	
4.1- Citotoxicidade (MTT)	31
4.2- Expressão bak e bcl-2	35
4.3- Ensaio de Apoptose (Anexina V)	38
5- DISCUSSÃO	40
6- CONCLUSÕES	48
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1.1-Câncer Cervical

O câncer cervical é um problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (VALDESPINO GOMEZ e VALDESPINO CASTILLO, 2004), representando 12% de todos os tipos de neoplasias malignas que acometem as mulheres, e a segunda neoplasia ginecológica mais freqüente no mundo (PISANI, BRAY e PARKIN, 2002). É atualmente a doença maligna mais comum entre as mulheres, sendo 500.000 novas pacientes diagnosticadas a cada ano, das quais metade morrem anualmente (WAGGONER, 2003; DUARTE-FRANCO e FRANCO, 2004). O câncer cervical é considerado ainda a quarta ou quinta causa de morte por câncer em mulheres com faixa etária entre 35-54 anos (HEISE, 2003). As áreas de maior risco para o câncer de colo uterino no mundo são as Américas Central e do Sul, bem como o nordeste e leste da África, onde a taxa de incidência média excede a 40/100.000 mulheres ao ano (PARKIN et al., 2001; INCA, 2004).

No Brasil, ao contrário do que ocorre nos países mais desenvolvidos, as taxas de mortalidade por câncer de colo uterino continuam moderadamente altas e aumentam anualmente. Enquanto, em 1979, a taxa de mortalidade era de 3,44/100.000 mulheres, em 2000 ocorreu sua elevação para 4,59/100.000 mulheres, correspondendo a uma variação percentual relativa de +33,1% (INCA, 2004). Em 2003, o número de óbitos e de novos casos esperados eram de 4.110 e 16.480 por 100.000 mulheres em todo país, correspondendo a taxas brutas de mortalidade e incidência de 4,58/100.000 e 18,32/100.000, respectivamente (INCA, 2004). Para o ano de 2006, as estimativas de neoplasias malignas em diversas localidades anatômicas eram 472.050 casos novos de câncer. Nessa previsão, com exceção do câncer de pele não-melanoma, e considerando a população feminina, o câncer de mama e de colo do útero foram as neoplasias malignas de maior incidência, acompanhando o mesmo perfil de magnitude observado no mundo. Ao considerar a população do sexo feminino, eram esperados 237.480 novos casos de câncer, com destaque para a estimativa de 19 mil novos

casos de câncer de colo do útero a cada 100 mil mulheres. O câncer de colo uterino é o segundo tipo de neoplasia maligna mais incidente nas regiões Sul (28.000/100.000 mulheres), Centro-Oeste (21.000/100.000 mulheres) e Nordeste (17.000/100.000 mulheres). Entretanto, na região Sudeste, o câncer de colo de útero representa o terceiro tipo de tumor maligno mais freqüente com 20.000/100.000 mulheres (INCA, 2005).

Em relação às taxas de sobrevida, os valores variam entre as regiões de maior e/ou menor desenvolvimento, apresentando bom prognóstico quando este câncer é diagnosticado e tratado oportunamente. Assim como no câncer de mama, no câncer de colo uterino, o diagnóstico em fase tardia da doença, resulta na menor sobrevida da paciente. Os dados disponíveis nos registros hospitalares brasileiros demonstram que, em média, a metade das pacientes com câncer de colo uterino tem um diagnóstico em estágio III ou IV (INCA, 2004).

Há mais de duas décadas, estudos epidemiológicos e moleculares têm demonstrado uma forte associação entre a infecção pelo HPV, especialmente os tipos denominados de alto risco, e a etiologia e progressão do câncer cervical (IARC 1995; KLETER et al., 1998; FRANCESCHI, HERREO e VECCHIA, 2000). Os cofatores associados ao elevado risco de desenvolvimento do câncer de colo uterino são: a idade prematura de início da vida sexual, multiplicidade de parceiros, número elevado de gestações, uso de contraceptivos orais, tabagismo. Ainda, doenças sexualmente transmitidas, como herpes, clamídia, HIV e HPV (papilomavírus humano) são também considerados cofatores na carcinogênese cervical (BOSCH e SANJOSE, 2003; CASTELLSAGUE e MUNOZ, 2003; INCA 2005).

Os tipos de HPV encontrados com maior freqüência no trato anogenital são classificados em dois grupos, segundo seu risco de malignidade: baixo risco, os tipos que apresentam baixo potencial oncogênico (HPV 6, 11), e os de alto risco, com elevado potencial oncogênico (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e outros). O HPV infecta tecidos de pele e mucosa e seu ciclo de vida está associado ao processo de diferenciação celular do epitélio

(STUBENRAUCH e LAIMINS, 1999; ZUR HAUSEN, 2000; STANLEY, 2002). Estudos prévios demonstram que a infecção por HPV de alto risco é necessária, mas não suficiente para progressão neoplásica; embora comum entre as mulheres jovens sexualmente ativas, apenas 30-40% das mulheres infectadas por esses tipos virais progridem de lesões precursoras para o câncer invasivo (STANLEY, 2002).

1.2- Papilomavirus Humano (HPV) e a Célula hospedeira

O genoma do HPV contém duas regiões principais compostas por ORFs (*open reading frames*) que codificam as proteínas virais. A região E (*early*) é constituída por 8 genes (E1-E8, sendo que E3 e E8 não têm função conhecida) e codifica as proteínas envolvidas na replicação viral, e, para os tipos de HPV de alto risco, no processo de imortalização. A região L (*late*) codifica as proteínas estruturais necessárias para a produção do capsídeo. Além dessas, ainda existe uma região regulatória que contém a origem para a replicação viral e controla a transcrição de alguns genes da região E (HEISE, 2003). Possivelmente, os tumores infectados com HPV apresentam um *background* molecular diferenciado dos não infectados, o que pode ser ilustrado pelo fato de que o prognóstico de pacientes com tumores infectados com HPV pode ser diferente dos não-infectados (RITCHIE et al., 2003) e estão relacionadas com características avançadas da doença (SMITH et al., 2004).

Os genes E1 e E2 codificam proteínas que são essenciais na replicação do DNA extracromossômico (epissomal) e completar o ciclo celular viral. A proteína E1 possui atividade helicase e ATPase, e interage com várias proteínas da maquinaria de replicação, como DNA pol α e RPA (replication protein A); também interage com chaperonas (HSP40 e 70), as quais parecem auxiliar a união de E1 ao DNA e a interação com histona H1 reflete a possível interferência de E1 nos processos de remodelamento da cromatina (WILSON et al., 2002). A

região E2 codifica duas proteínas, uma delas responsável por inibir e a outra por aumentar a transcrição dos genes E6 e E7 (MOTOYAMA et al., 2004).

O gene E4 codifica proteína que é expressa em estágios tardios da infecção, induzindo o colapso da rede de citoqueratina no citoesqueleto, em queratinócitos humanos, e esse evento é considerado importante para a maturação e replicação viral (MOTOYAMA et al., 2004; DOOBAR, 2005).

O gene E5 é considerado não essencial para a carcinogênese cervical humana e a transformação maligna da célula hospedeira, uma vez que esses processos ocorrem mesmo após sua deleção (MOTOYAMA et al., 2004). Quando presente, a proteína E5 interage com diversas proteínas da membrana plasmática, como por exemplo o receptor de fator de crescimento epidermal celular, EGFR (McMURRAY et al., 2001; TSAI e CHEN, 2003). A proteína E5 também influencia a ativação da via de sinalização das MAP quinases (MAPK, mitogen activated protein kinases), como ERK1/2 e p38MAPK e parece ativar oncogenes como c-jun, junB e c-fos (CRUSIUS, RODRIGUEZ e ALONSO et al., 2000; TSAI e CHEN, 2003). Ainda, essa proteína inibe a apoptose mediada por TRAIL e FasL, além de reprimir a expressão de CDKN1/p21, interferindo com o controle negativo do ciclo celular (TSAO et al., 1996; KABSCH e ALONSO, 2002; KABSCH et al., 2004; DOOBAR, 2005).

As proteínas virais E6 e E7 apresentam função de estimular a progressão do ciclo celular ao se associarem com proteínas reguladoras do ciclo celular do hospedeiro. E7 associa-se com pRb, um regulador negativo do ciclo celular que normalmente impede a progressão da fase G1 para a S por se associar ao fator de transcrição E2F. Ao se ligar a E7, pRb é degradada liberando E2F, a qual estimulará a transcrição de genes alvos associados a replicação do DNA, resultando na proliferação celular desordenada (ZUR HAUSEN, 2000; MOTOYAMA et al., 2004). Ainda, a dissociação do complexo E2F/pRb ocasionado por E7 estimula a expressão de ciclina-E, a qual é necessária para progressão do ciclo celular de G1

para fase S (NOYA et al., 2001). E7 pode-se associar com proteínas do complexo de desacetilação de histonas, como Mi2 β e HDAC-1, o que pode levar a aumento de expressão de proteínas como cdc25A, uma fosfatase envolvida na ativação de complexos CDK/ciclina (BREHM et al., 1999; NGUYEN, WESTBROOK e MCCANCE, 2002; LONGWORTH e LAIMINS, 2004). E7 pode também estar envolvido com outros fatores de proliferação celular, incluindo os componentes do complexo transcricional AP-1, e as proteínas p21 e p27, que são inibidores de quinase dependente de ciclina (DOORBAR, 2005).

A proteína viral E6 completa o papel de E7, prevenindo a apoptose celular em resposta a entrada não programada na fase S induzida por E7 (DOOBAR, 2005). A associação de E6, dos tipos de HPV de alto risco, com a proteína p53 da célula hospedeira, resulta na sua degradação, comprometendo a interrupção do crescimento celular e a ativação da apoptose induzida por danos no DNA genômico. A perda do controle do ciclo celular mediado por p53 favorece a instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações na célula infectada (ZUR HAUSEN, 1996; STANLEY, 2002; DOOBAR, 2005). Estudos prévios demonstram que a proteína E6 ativa a telomerase, possivelmente através da ativação do promotor de hTERT, contribuindo para a imortalização celular (CHAKRABARTI e KRISHNA, 2003; MCMURRAY e MCCANCE, 2003; VELDMAN et al., 2003). Existem evidências de que E6 inativa CBP (CREB binding protein), um regulador transcricional que controla várias respostas celulares, entre elas a ativação do TP53 (ZIMMERMANN et al., 1999). Por outro lado, E6 pode aumentar a expressão de VEGF (vascular endothelial growth factor), contribuindo assim para a angiogênese (LOPEZ OCEJO et al., 2000). Ainda, E6 interage com inúmeras outras proteínas celulares, envolvidas com processos de adesão celular (paxilina), contato celular (PDZ), sinalização (JAK-STAT), apoptose (bak e bax) entre outros processos (LI e DOU, 2000; CHAKRABARTI e KRISHNA, 2003; DOOBAR, 2005).

Por outro lado a forma de interação entre o HPV e o genoma da célula hospedeira parece dirigir os eventos intracelulares de transformação maligna. O HPV pode estar associado ao genoma da célula hospedeira de duas formas: epissomal ou integrada (STANLEY, 2002). Na forma integrada, os tipos de HPV de alto risco estão inseridos no genoma da célula hospedeira, resultando no rompimento da região E1/E2 do vírus. A perda funcional do gene E2, responsável pelo controle da transcrição dos genes virais E6 e E7, resulta na elevação dos níveis dessas oncoproteínas. Esse aumento é reconhecido como indutor da transformação maligna da célula hospedeira e no desenvolvimento dos tumores infectados por HPV (MOTOYAMA et al., 2004).

As regiões gênicas L1 e L2 codificam para proteínas do capsídeo viral em estágios tardios da infecção viral. O gene L1 é altamente conservado entre os diferentes tipos de papilomavírus, enquanto o gene L2 é menos conservado, apresentando mais seqüências variáveis (MOTOYAMA, 2004; DOOBAR, 2005).

Assim, as proteínas codificadas pelos vírus HPV oncogênicos induzem a transformação celular através da interação com inúmeras moléculas dentro da célula hospedeira, inclusive alterando a expressão de genes, interferindo com processos como controle do ciclo celular, sinalização celular, expressão gênica e resposta apoptótica (RITCHIE et al., 2003).

1.3- Morte Celular – Apoptose e Necrose

Múltiplos sinais modulam a proliferação, sobrevivência e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência. Entretanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores. De modo geral, estímulos tóxicos ou deletérios à célula podem desencadear a morte celular

por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares (BAYLY et al., 1997; COTRAN, et al., 2000).

A necrose é definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005). No processo de necrose (Figura 1), ocorre o intumescimento celular, rompimento de organelas, ruptura da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando resposta inflamatória (KERR et al., 1995). Não há evidência de remodelamento de cromatina durante a necrose, e a célula entra em citólise imediata, com digestão aleatória do DNA, cariólise e perda da integridade da membrana plasmática. A citólise é o estágio final da decadência celular evidente no processo de necrose (SARASTE e PULKKI, 2000; JEFFREY, 2000; MELLO, VIDAL e MARIA, 2001; HAIL et al., 2005).

Em contrapartida, a apoptose é uma forma altamente regulada de morte celular programada, observada em resposta a numerosos estímulos (BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005). A apoptose é caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (LAVIN, 1993; YASUHARA et al., 2003). A apoptose pode ser dividida em três fases: de iniciação, efetora e de degradação. A fase de iniciação é altamente dependente do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula (por exemplo, estresse oxidativo, danos no DNA, desequilíbrio iônico e presença de citocinas). Esta primeira fase pode influenciar a eficácia das fases seguintes (efetora e de degradação). A fase efetora é constituída da ativação de proteases, nucleases, e de outros intermediários que participam da fase de degradação.

As características ultraestruturais típicas da apoptose são resultantes dos eventos ocorridos nas fases efetora e de degradação (Figura 1): diminuição do volume celular, condensação da cromatina, cariorex, e eventuais brotamentos nas membranas formando corpos apoptóticos (HAIL et al., 2006).

Há duas vias principais de regulação da apoptose: 1) Apoptose mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e 2) Apoptose mediada pela mitocôndria e denominada via intrínseca (HAJRA e LIU, 2004; HAIL et al., 2006).

Ambas as vias são reguladas por caspases, que pertencem à família de diversas proteínas com função de cisteíno-proteases. As caspases estão presentes constitutivamente na maioria das células de mamíferos, se localizam no citosol como proenzimas e quando ativadas sofrem clivagem em cisteínas localizadas próximas aos resíduos de ácido aspártico (GARRIDO e KROEMER, 2004; LAUNA et al., 2005; HAIL et al., 2006). Já foram caracterizadas mais de doze isoformas de caspases e aproximadamente dois terços destas enzimas apresentam função no processo de apoptose. Dois tipos de caspases atuam nas vias de sinalização para apoptose, são denominadas de iniciadoras (caspases 8 - 9 e 10) e de efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca (Figura 2) possui um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras com finalidade de executar eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (HAJRA e LIU, 2004; ZHANG et al., 2004).

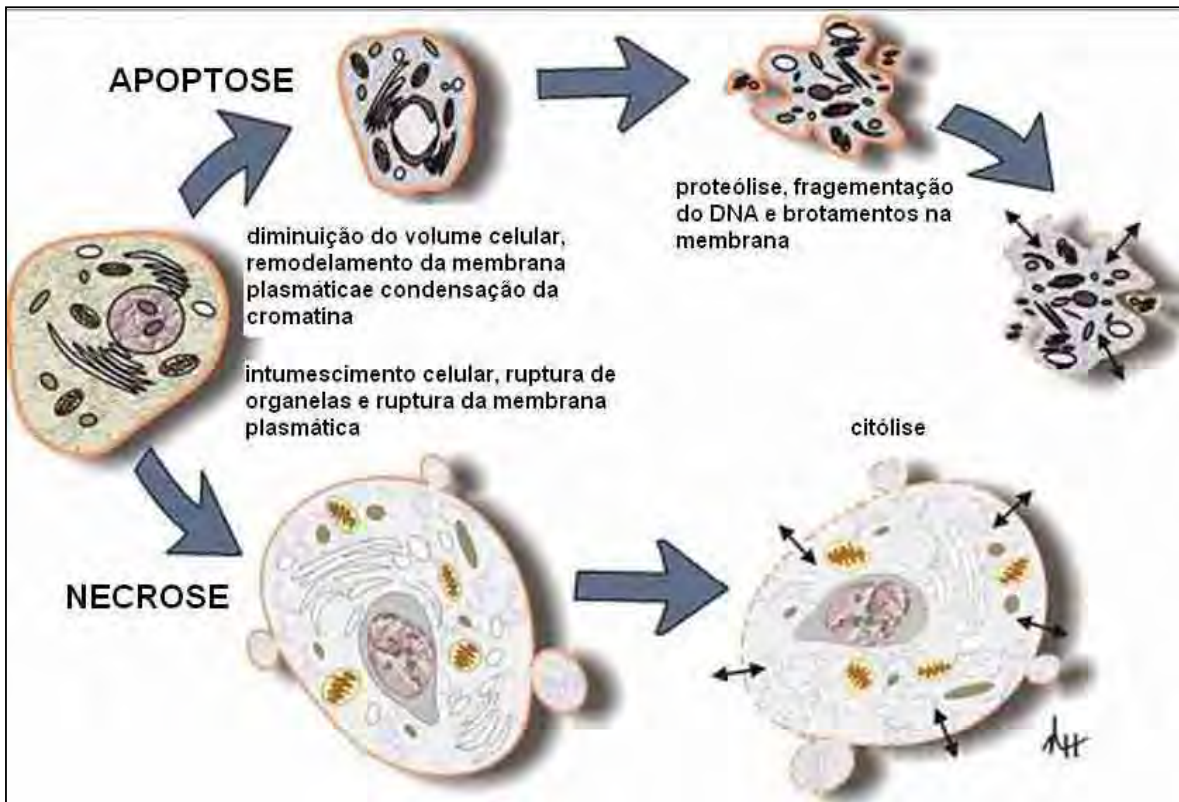


Figura 1: Características morfológicas de apoptose e necrose. Figura adaptada de HAIL et al., 2006.

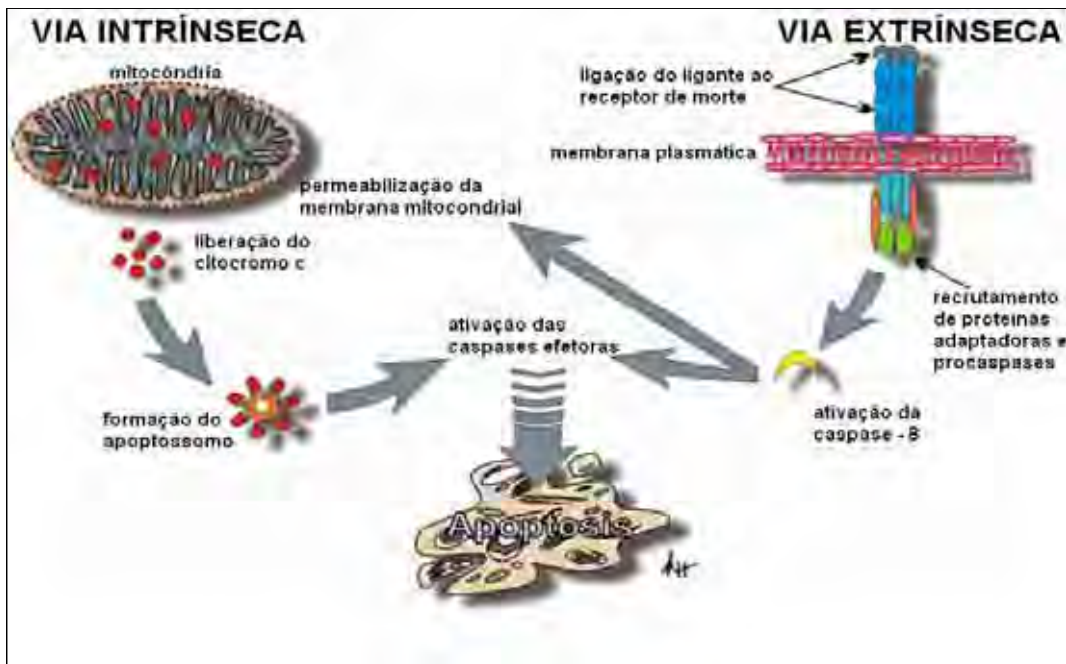


Figura 2: Regulação das vias intrínseca e extrínseca durante a apoptose. Figura modificada de HAIL et al., 2006.

A via extrínseca é iniciada por associação de monômeros de diferentes receptores de morte na membrana plasmática e, ao se agruparem, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras (COHEN, 1997; HAIL et al., 2006). Dentre os receptores na membrana plasmática (Figura 3), o receptor fas/CD95 recruta procaspase 8 e/ou procaspase 10, e a conseqüente elevação de seus níveis nas proximidades da membrana garantem interação dessas caspases inativas com proteínas adaptadoras associadas a fas/CD95. A interação desse complexo protéico promove a autocatálise das procaspases que se tornam nesse momento em caspases iniciadoras ativadas. A ativação proteolítica seqüencial de outras caspases, culmina na ativação de caspases efetoras 3, 6 e 7 que estão no citoplasma (HAJRA e LIU, 2004). Ainda, a ativação de outros receptores de morte na membrana plasmática (Figura 3), especialmente do receptor de estresse celular, bem como a ação das caspases iniciadoras 8 e 10, integram sinais de apoptose de via extrínseca àqueles de via intrínseca (HAJRA e LIU, 2004; HAIL et al., 2006).

Na via intrínseca de apoptose, diversos sinais atuam na mitocôndria, modulando a permeabilização da membrana mitocondrial externa que poderá ou não culminar na liberação de citocromo *c*. O citocromo *c* liberado no citosol, associa-se a uma proteína adaptadora (APAF-1), ativando caspase 9 e essa ativação resulta na formação do apoptossomo (GREEN e KROMER, 1998, THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998; HAIL et al., 2006). O complexo catalítico gerado pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases de via extrínseca são sinais convergentes responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7 (HAIL et al., 2006). A permeabilização de membrana mitocondrial e liberação de citocromo *c* são fundamentais para os sinais de via intrínseca, as quais dependem da modulação de proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 (TJALMA et al., 1998; HAIL et al., 2006).

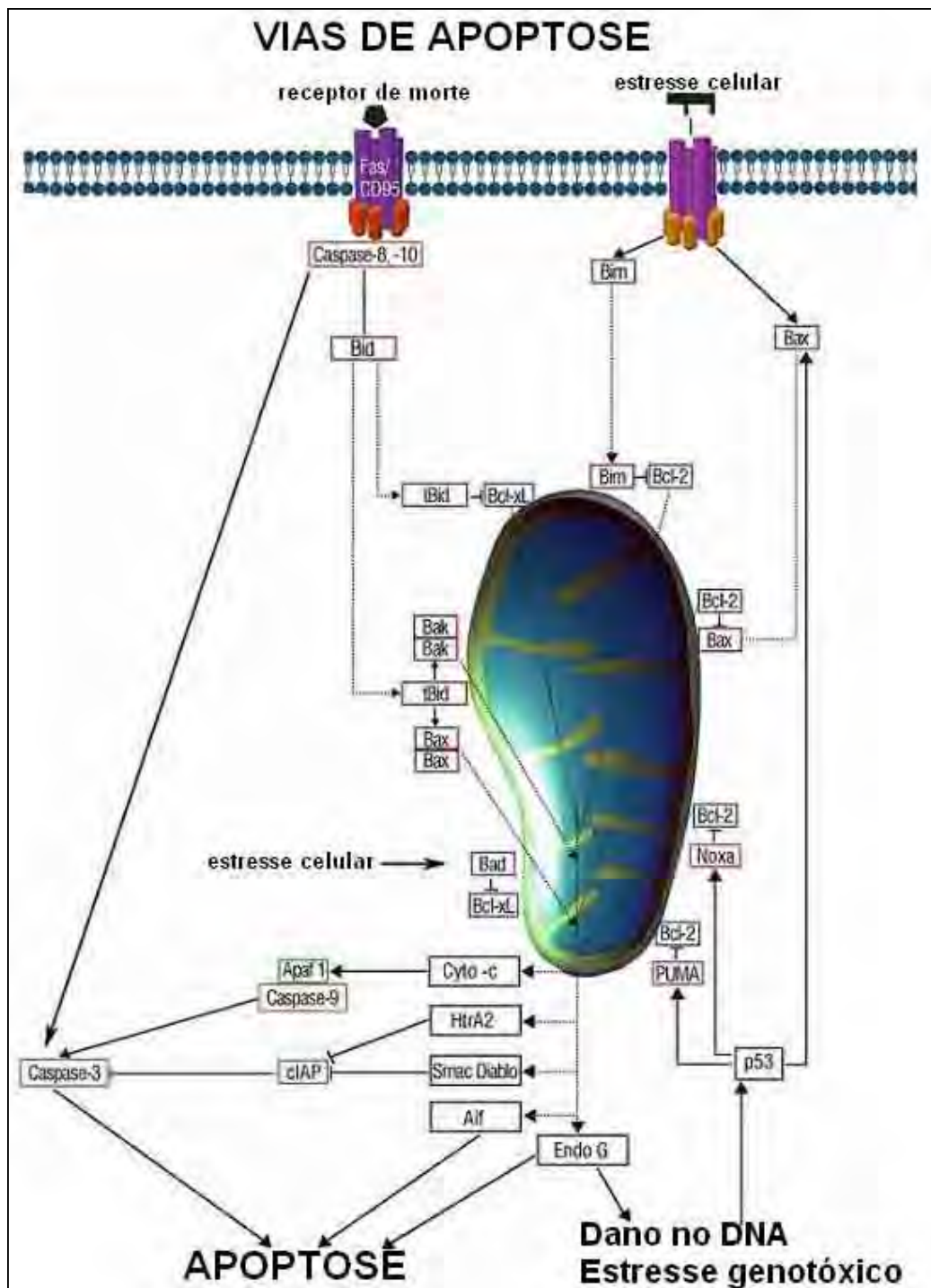


Figura 3: Sinais de apoptose de via extrínseca e intrínseca. Figura adaptada de KUTUK e BASAGA, 2006.

A família Bcl-2 possui cerca de vinte proteínas já identificadas, cada uma delas com duas ou mais isoformas. Dentre essas proteínas, bax, bak, bcl-Xs, bok, bad, bid exercem

função pró-apoptóticas, enquanto as proteínas bcl-2, bcl-XL, bcl-w, mcl-1 têm função anti-apoptótica (KORSMEYER, 1999). Na mitocôndria, durante a apoptose, algumas modificações dessas proteínas podem ocorrer (ZHANG et al., 2004). É conhecido que, durante a apoptose, membros da família Bcl-2 podem ser fosforilados (bcl-2 e bad), clivados (bid) e podem ter mudanças de conformação e oligomerização (bax e bak). Os sinais mitocondriais anti ou pró-apoptóticos estão em equilíbrio e a predominância de um desses sinais, conduz, respectivamente, a sobrevivência ou morte celular programada (CHAN e YU, 2004). A interação de proteínas anti e pró-apoptóticas, ocorre através dos domínios hidrofóbicos gerados por α hélices de BH1, BH2 e BH3 membros da família Bcl-2 que interage com domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas (BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005). Proteínas BH3 (Bid e Bim) interagem com proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 como bak e bax e essa interação induz a ativação/oligomerização (KUTUK e BASAGA, 2006). Assim, no equilíbrio de sinais anti e pró-apoptótico são modulados por vias que se complementam, nas quais ocorrem a associação das proteínas bcl-2/bax e bcl-xL/bak (Figura 4). Se o estímulo for anti-apoptótico, a ligação de bcl-2/bax e bcl-xL/bak é mantida, impedindo a formação do poro na membrana mitocondrial. Entretanto, por estímulo pró-apoptótico, a ativação de bax e bak ocorre pela forma clivada de bid (t-bid), seguida da oligomerização bax e bak na membrana mitocondrial, com subsequente liberação das proteínas apoptogênicas (citocromo *c*) e indução de morte celular (PETROS, OLEJNICZAK e FESIK, 2004; BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005; KUTUK e BASAGA, 2006).

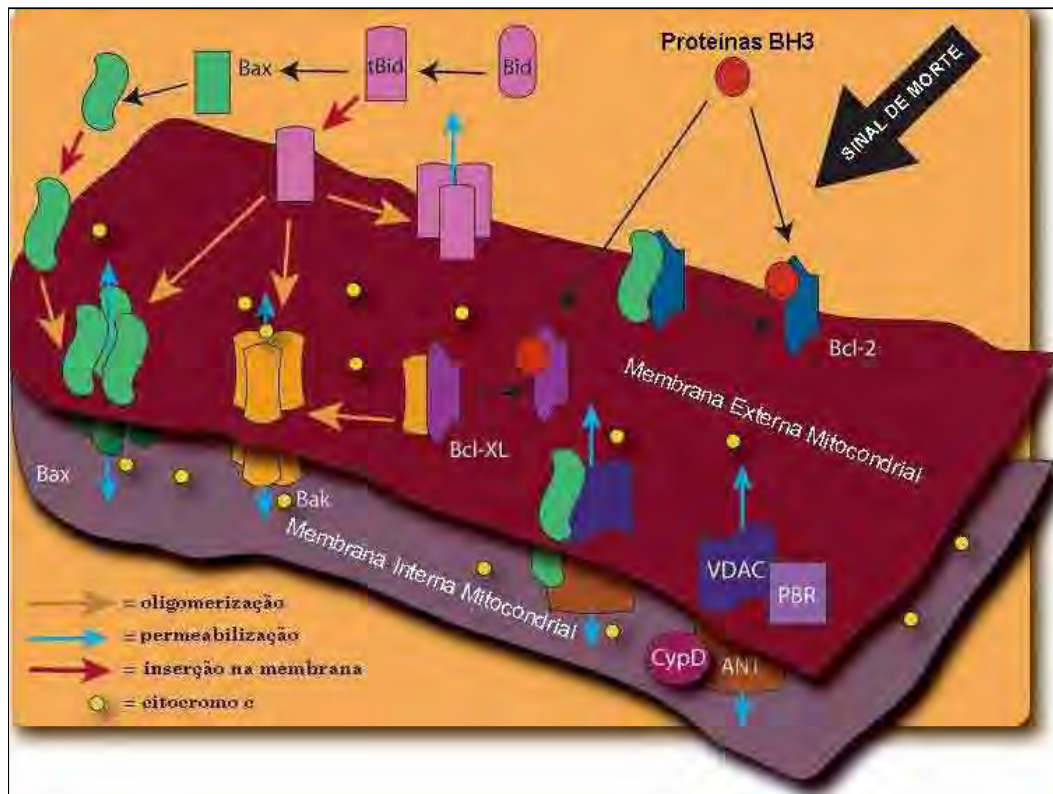


Figura 4: Mecanismo de permeabilização da membrana externa mitocondrial, mediada por proteínas da família Bcl-2. Figura modificada de BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005.

1.4- Apoptose e Anexina V

No final de 1970, a anexina V foi isolada de placenta humana, poucos anos depois esta proteína foi descoberta independentemente em vasos sanguíneos e nomeadas como proteína vascular anticoagulante- α (VAC- α). O mecanismo anticoagulante é baseado na alta afinidade de ligação a fosfolipídios de membrana, especialmente de fosfatidilserina (BOERSMA et al., 2005). As células em apoptose expõem na sua superfície fosfatidilserina (PS) enquanto células viáveis mantêm esses fosfolipídios na face interna da membrana plasmática (BOERSMA et al., 2005). Assim, a anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolipídios de membrana plasmática, através de suas cargas negativas, na presença de íons cálcio.

Todas anexinas apresentam uma domínio central com quatro repetições em α hélices que permite a ligação do cálcio (MOSS e MORGAN, 2004). Assim, na presença de íons cálcio, várias moléculas de anexina V se associam fortemente aos fosfolípídios de membrana, ligando-se preferencialmente às cargas negativas presentes especialmente nas fosfatidilserinas externalizadas. A associação entre si das anexinas leva à formação de ligação proteína-proteína estável, porém reversível quando os níveis de cálcio intracelular são depletados (VAN HEERDE et al., 2000). A taxa de associação e dissociação sugere que anexina V não penetra na membrana e comporta-se como uma proteína extracelular. Assim, externalização da fosfatidilserina, que normalmente é restrita à face interna da membrana lipídica e a ligação de anexina V é uma evidência da apoptose (MOCHIZUKI et al., 2004). Logo, a quantificação de anexina V é uma ferramenta útil na detecção de células em apoptose. Para que a exposição de fosfatidilserina ocorra, a ativação de caspase 3 e o fluxo de íons cálcio são necessários. Ainda, a exposição de fosfatidilserina, modula o controle mediado por proteínas da família Bcl-2, as quais estão associadas aos sinais mitocondriais de morte celular programada (VAN HEERDE et a., 2000).

1.5- HPV, Terapia e Apoptose

O desenvolvimento do câncer está associado ao rompimento de equilíbrio entre o crescimento e a morte celular e tem-se tornado evidente que as células neoplásicas escapam da morte celular por apoptose (STANLEY, 2003). As células tumorais geralmente possuem uma série de modificações genéticas que impedem o processo de apoptose, colaborando para o crescimento celular aberrante, o desenvolvimento da neoplasia maligna e, posteriormente, sua capacidade de invasão (HAJRA e LIU, 2004).

O HPV é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Nas células infectadas por HPV, aparentemente as oncoproteínas virais interferem no

equilíbrio dos sinais anti e pró-apoptóticos, colaborando para que a célula infectada escape da morte celular programada, podendo ser este um dos múltiplos mecanismos pelos quais o vírus promulga a carcinogênese celular (MIYASHITA et al., 1994; LIANG, MUNGAL e AYSCUE, 1995; DOORBAR, 2005).

Em função da complexidade de interações que o HPV estabelece com a célula hospedeira, a possibilidade de permanência do vírus, sua integração no genoma da célula hospedeira e indução de transformação maligna dos tipos de HPV de alto risco, a busca de novas terapias antivirais é cada vez mais intensa. Diversas terapias são utilizadas com o propósito de remover o vírus do epitélio, como por exemplo 5-fluoracila, laser, criocauterização e ativação da resposta imunológica com imunomoduladores e, mais recentemente, as vacinas (STANLEY, 2003). O tratamento, com medicamentos, de lesões intraepiteliais cervicais de alto grau (HGSIL – *high-grade squamous intraepithelial lesions*) infectadas com HPV, pode ser benéfico para algumas lesões. O mais importante é a evidência de que o tratamento medicamentoso possa restabelecer a capacidade da célula maligna infectada por HPV em restabelecer a apoptose. Na infecção pelo HPV de alto risco, a ação das oncoproteínas E6 e E7 é essencial para a manutenção do fenótipo celular maligno e a evasão da apoptose (HALL e ALEXANDER, 2003).

Prévios estudos demonstraram que a ação de compostos químicos e produtos naturais em linhagens celulares infectadas por HPV (HeLa, SiHa e Caski) apresentaram: redução nos níveis de RNAm de E6 e E7, inibição da função de E6/E7 em se ligar a p53, restabelecimento da expressão de p53, inibição da proliferação de células tratadas, indução de apoptose (NARAYANAN et al., 1998; UM et al., 2002; LEE et al., 2005). Retinóides têm papel como agente quimioterápico em neoplasias intra-epiteliais e em câncer cervical associado à presença do HPV. O tratamento com retinóides, em queratinócitos e linhagens celulares de carcinoma cervical imortalizados com HPV, diminui a transcrição de E6/E7, aumenta a

expressão de p53, desregula as vias de sinalização mediadas por EGF e IGF e induz a apoptose, modulando o aumento da ligação Fas com ligante de Fas. Indol c-3-carbinol (I3C) um constituinte natural de vegetais crucíferos, demonstrou efeitos pré-clínicos na quimioprevenção, atividade anti-estrogênica e indutora de apoptose. Dieta suplementada com I3C reduziu drasticamente a incidência de câncer de camundongos transgênicos para E6/E7 de HPV16 (STANLEY, 2003).

Estudos de substâncias naturais poderiam colaborar para o maior entendimento da capacidade dessas substâncias em permitir a terapia anticarcinogênica de células infectadas por HPV. Alcalóides e terpenos extraídos de *Uncaria genus*, uma planta da família das Rubiaceas e existente na África, Ásia e América do Sul, são potentes agentes antiproliferativos e até mesmo antivirais (HEITZMAN et al., 2005). O alcalóide denominado sanguinarina, isolado da planta *Sanguinaria canadensis*, demonstrou atividade antiproliferativa em células tumorais infectadas com HPV, induzindo à apoptose (DING et al., 2002). O restabelecimento da apoptose foi observado em linhagens tumorais de próstata, transformadas com HPV7 e HPV10, tratadas com os flavonóides apigenina e baicalina (CHAN et al., 2000; GUPTA et al., 2001).

Nesse sentido, o projeto Biota FAPESP tem permitido o estudo da biodiversidade brasileira com o objetivo de encontrar princípios ativos naturais que possam servir como modelo na síntese de novos fármacos, além do estudo das atividades biológicas dos compostos isolados. Alcalóides, terpenóides e flavonóides são compostos com atividade anticarcinogênica reconhecida. Substâncias purificadas de diversas plantas oriundas das florestas ciliares e do cerrado brasileiro têm apresentado quantidades variáveis de alcalóides, terpenos e flavonóides (NEHEME et al, 2002; URREA-BULLA, SUAREZ e MORENO-MURILLO, 2004). Estudos prévios com plantas dessa região do Brasil demonstraram que alcalóides e terpenóides possuem atividade biológica antifúngica, antiproliferativa e indutora

de genotoxicidade (DE CARVALHO et al., 1998; MAISTRO, CARVALHO e MANTOVANI, 2004). Em contrapartida, a presença de flavonóides nesses extratos vegetais pode funcionar como imunoestimuladores (GUPTA, AFAQ e MUKHTAR, 2001).

Cryptocarya é um gênero pantropical com cerca de 350 espécies, sendo que 9 ocorrem no Brasil e 8 endêmicas das florestas da Mata Atlântica. Entre as espécies do gênero, 38 foram estudadas sob o enfoque fitoquímico. No Brasil, a espécie *Cryptocarya mandioccana* ocorre de Alagoas ao Rio Grande do Sul. É uma árvore que pode atingir até 30m de altura e 130 cm de diâmetro, conhecida popularmente como canela-branca, canela-fogo, canela-batalha, canela-noz moscada, nhutinga-branca, anhuvinha-branca e noz moscada do Brasil (TELASCREIA, YOUNG e CAVALHEIRO, 2006). As substâncias comumente encontradas no gênero são alcalóides, monoterpenos, sequiterpenos, alilfenóis, neolignanas, diidrochalconas, flavonas, chalconas, flavonóides e pironas.

Estirilpironas isoladas de diferentes plantas demonstraram elevada atividade citotóxica e seu estudo foi considerado o mais importante depois da avaliação fitoquímica e oncofarmacológica do taxol (TIAN et al., 2007). De modo similar, às estirilpironas encontradas em algumas plantas brasileiras, essa classe de composto aparentemente demonstrou ação antitumoral, principalmente por apresentar atividade citotóxica em linhagens celulares de carcinoma de ovário e de células leucêmicas (FAIRLAMB et al., 2004; WANG et al., 2005). Alfa-pironas, denominadas de obolactonas, isoladas de *Cryptocarya obovata* possuem atividade citotóxica *in vitro* (LAN et al., 2003; DUMONTET et al., 2004). Ainda, em prévios estudos as estirilpironas apresentaram atividade citotóxica e indutoras de apoptose em diferentes linhagens de células tumorais (CHIEN e PIHIE, 2003; INAYAT-HUSSAIN et al.; 2003TIAN et al., 2007). Em linhagens celulares de câncer de mama e leucemia promielocítica, derivados de estirilpirona, isolados de *Goniothalamus umbrosus* e *Goniothalamus cheliensis*, apresentaram importante ação antiproliferativa, induzindo morte

celular e alterando a expressão de proteínas da via intrínseca de apoptose (CHIEN e PIHIE, 2003; INAYAT-HUSSAIN et al., 2003; ZHONG et al., 2005).

2.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade apoptótica induzida em células de carcinoma cervical tratadas com a estirilpirona criptomoscatoa D2, isolada de *Cryptocarya mandioccana*.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a citotoxicidade comparando os resultados entre as linhagens de carcinoma cervical infectadas (HeLa, SiHa) e não infectada (C33A), e linhagem não tumoral (MRC-5) tratadas em diferentes tempos e concentrações da estirilpirona criptomoscatoa D2.
2. Avaliar os níveis de proteínas associadas a apoptose celular de via intrínseca (bak e bcl-2), por citometria de fluxo, comparando os resultados entre todas as linhagens celulares (HeLa, SiHa, C33A e MRC-5) tratadas em diferentes tempos e concentrações da estirilpirona criptomoscatoa D2.
3. Avaliar a apoptose celular por citometria de fluxo (Anexina V), comparando os resultados entre todas as linhagens (HeLa, SiHa, C33A e MRC-5) tratadas em diferentes tempos e concentrações de estirilpirona criptomoscatoa D2.

3.1- Extração e preparação da substância pura

Os procedimentos de extração e purificação da substância isolada de folhas de *Cryptocarya mandioccana* foram realizados no Instituto de Química de Araraquara (UNESP), pelo doutorando Marcelo Telascrêa, no laboratório de Química Orgânica, sob a orientação do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro. O material vegetal seco e moído de *Cryptocarya mandioccana* foi submetido à extração com solventes orgânicos de diferentes polaridades (hexano e etanol). As soluções obtidas foram evaporadas sob pressão reduzida, fornecendo os extratos brutos hexânico e etanólico. Os extratos obtidos a partir do material vegetal foram dissolvidos em MeOH/H₂O (9:1, v:v) e submetidos a partição com solventes orgânicos (hexano, acetato de etila, butanol), fornecendo frações de diversas polaridades (TELASCREÂ, 2006).

O isolamento da substância presente foi realizado por técnicas cromatográficas usuais e diversos solventes. A substância pura foi submetida à análise espectrométrica (IV, UV, RMN de ¹H e ¹³C, e EM).

A substância pura testada foi uma estilipirona (criptomoscatona D2) isolada de folhas de *C. mandioccana* (Figura 5), C₁₇H₂₀O₄.

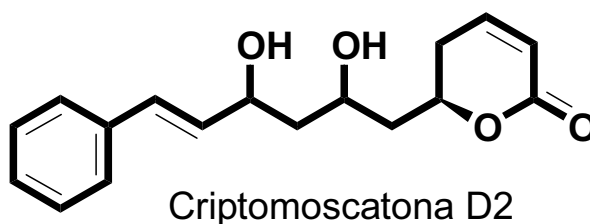


Figura 5: Fórmula estrutural da estilipirona (criptomoscatona D2) extraída de *Cryptocarya mandioccana*.

A criptomoscatoona D2 foi solubilizada em DMSO, esta solução estoque foi diluída em meio de cultura para obtenção das concentrações da substância pura que foram testadas.

3.2- Cultura de células

O potencial efeito antiproliferativo da criptomoscatoxona D2 foi avaliado comparativamente entre as diferentes linhagens carcinoma cervical imortalizadas pelo HPV (HeLa e SiHa), carcinoma cervical não imortalizadas por vírus (C33A) e não maligna transformada pelo vírus SV-40 (MRC-5). As linhagens *ATCC* (American Type Culture Collection) de carcinoma cervical transformada pelo HPV16 (SiHa), HPV18 (HeLa) e não transformada pelo vírus (C33A) foram gentilmente cedidas pela Dra. Luiza Lina Villa, do Laboratório de Virologia, do Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer. A linhagem não neoplásica (fibroblasto pulmonar humano) e transformada pelo vírus SV-40 (MRC-5) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, Laboratório de Genética, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

As células foram cultivadas em uma mistura 1:1 (massa : massa) DMEM e Ham's F10 (Sigma Co., St. Louis, USA) acrescido de 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 0,25µg/mL de anfotericina B, 0,2mg/mL de ciprofloxacina, 0,1 mg/mL de kanamicina (Sigma) e 10% de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas, mantidas a 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C até que a monocamada celular estivesse confluenta. Posteriormente, as células foram lavadas com 5mL de solução de Hanks (0,4g de KCl, 0,06g de KH₂PO₄, 0,04g de Na₂HPO₄, 0,35g de NaHCO₃, 1g de glicose, H₂O q.s.p. 1000mL) e tripsinizadas acrescentado-se 1mL de ATV (Associação de Tripsina (0,2%) e Versene (0,02%) – Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil). Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio acrescido de 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular obtida em uma garrafa foi transferida para outras garrafas, de modo a obter 10⁵ células por garrafa. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para os experimentos.

3.3- Determinação do IC50

A estirilpirona, criptomoscatoana D2, foi submetida a ensaios preliminares para estabelecimento de curvas dose e tempo resposta na indução de morte celular avaliada pelo teste de viabilidade celular utilizando o método de azul de trypan (GABLER et al., 2002). As células foram cultivadas na concentração de $5,0 \times 10^4$ células/well em placa de 12 wells. Após 24 horas de crescimento celular, as células foram tratadas com diferentes concentrações da criptomoscatoana D2 isolada de *C. mandioccana* e por diferentes tempos de tratamento. Em seguida, a viabilidade celular foi determinada após tripsinização do tapete celular, centrifugação (por 5 minutos a 169xg) e as células foram ressuspensas em solução corante de azul de trypan a 0,4% (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) em PBS. As células vivas e mortas foram quantificadas em câmara de Neubauer, em microscópio óptico comum (Nikkon) em aumento de 400 vezes, considerando células viáveis aquelas não coradas pelo azul de trypan (transparentes). As células coradas em azul foram consideradas não viáveis por apresentarem permeabilização do corante pela membrana plasmática.

Em função da ausência de estudos prévios com essa substância, ensaios preliminares foram conduzidos para determinação da atividade citotóxica capaz de ocasionar morte celular em 50% das células tratadas (IC50). Para isso, diferentes concentrações da criptomoscatoana D2 (2,5 a 180 μ M) e tempos de tratamento (2, 4, 6, 18, 24 e 48 horas) foram utilizados. Em seguida, as concentrações escolhidas para o estudo de viabilidade celular foram 15, 30, 60 e 90 μ M tratadas por 6, 24 e 48 horas, e tratadas por 6 horas e recuperadas por 24, 48 e 72 horas.

A determinação do IC50 foi acompanhada de um controle positivo (as células foram incubadas em Banho Maria a 60°C por 15 minutos), controle negativo (células não-tratadas) e controle de veículo (DMSO 3%).

3.4- Citotoxicidade (MTT)

3.4.1- Tratamento das Linhagens

Uma suspensão celular de $2,5 \times 10^3$ células/*well* foi cultivada em placas de 96-*wells*, e após 24 horas de cultivo, as células HeLa, SiHa, C33A e MRC-5 foram tratadas com a criptomoscatoxona D2 nas concentrações de 15, 30, 60 e 90 μM por 6, 24 e 48 horas. Ainda, para avaliar o efeito pós-tratamento, foram selecionados os tratamentos de 6 horas e período de recuperação pós-tratamento de 24, 48 e 72 horas. Para o período de recuperação, o meio de cultura, contendo o tratamento, foi removido e, em seguida, adicionado meio de cultura fresco acrescido de 10% de soro fetal bovino. Cada ensaio foi acompanhado de controle positivo (doxorubicina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), controle negativo (células não-tratadas) e controle de veículo (DMSO 1%). Todos os ensaios de tratamento e tratamento seguido de período de recuperação foram realizados em três experimentos independentes.

3.4.2- Ensaio de MTT

O método de MTT foi utilizado para a avaliação de citotoxicidade e têm como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma), formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Após o tratamento (descrito em 3.4.1), o meio de cultura foi removido e 10 μL de solução de 5 mg/mL de MTT em PBS foram adicionados em cada *well*. Em seguida, as células na microplaca foram incubadas a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana que ocorreu entre 2 e 4 horas. Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 μL de dimetilssulfóxido (DMSO) concentrado foi adicionado a cada *well* e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540nm, foi realizada em leitor de placas (Bio-Tek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc.,USA). A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao

controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG et al., 2004:

$$\text{células mortas (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Controle Negativo} - \text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Controle Negativo}} \times 100$$

3.5- Expressão bak e bcl-2

A avaliação dos níveis de proteínas associadas a apoptose celular de via intrínseca (bak e bcl-2) foi realizada por citometria de fluxo, estabelecida através da intensidade de fluorescência, utilizando o equipamento FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). As células (1×10^5 cell/well) foram cultivadas em placas de 24 wells por 24 horas e tratadas com a criptomoscatoína D2 de *C.mandiocanna* nas concentrações de 15, 30, 60 e 90 μ M, por 6 horas e seguidos de períodos de recuperação de 24, 48 e 72 horas pós-tratamento (como descrito no item 3.4.1). Em seguida, as células foram tripsinizadas, transferidas para eppendorfes estéreis e fixadas com paraformaldeído 4%. Para reação com os anticorpos, as células foram permeabilizadas com saponina 0,5% em PBS, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com solução de 0,5% de soro albumina bovina (Sigma) e 0,1% de saponina em PBS (solução BSA/saponina) e incubadas com anticorpo monoclonal anti-bcl-2 (diluído 1:200, DAKO, Glostrup, Denmark) ou anti-Bak (diluído 1:200 DAKO) a 4 °C, *overnight*. A seguir, as células foram lavadas com solução BSA/saponina e incubadas com anticorpo secundário conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, diluído para 1:60, volume : volume, Sigma) ou Ficoeritrina (PE, diluído para 1:40, Sigma). Após a incubação por 1 hora a 37°C, as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 1%. Os ensaios foram acompanhados de controle positivo (doxorubicina 15 μ g/mL), controle

negativo (células não-tratadas) e controle de veículo (DMSO 1%). Todos os ensaios foram realizados em três experimentos independentes.

3.6- Ensaio de Apoptose (Anexina V)

As células (1×10^5 cell/well) foram cultivadas em placas de 24 wells por 24 horas e tratadas com a estirilpirona, criptomoscatoona D2, isolada de *C.mandiocanna* nas concentrações de 15, 30, 60 e 90 μ M, por 6 horas e seguidos de períodos de recuperação de 24, 48 e 72 horas pós-tratamento (como descrito no item 4.1). Após o tratamento e período de recuperação as células foram tripsinizadas, e lavadas com meio DMEM F10 acrescido de 10% de soro fetal bovino. A seguir, as células foram ressuspensas com 500 μ L de tampão de ligação, 5 μ L de anexina conjugada com FITC e 5 μ L de iodeto de propídio (kit anexina-V, Aléxis, Lausen, Switzerland), a reação foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A intensidade de fluorescência (FITC e iodeto de propidio) foi avaliada utilizando o equipamento FACScalibur (Becton Dickinson, USA). As células em apoptose precoce foram marcadas somente por anexina-V, enquanto as células com dupla marcação resultante da permeabilidade de membrana, foram classificadas como apoptose tardia/necrose, devido à impossibilidade de se diferenciar células em apoptose tardia ou em necrose por esse método (PEC et al., 2003).

3.7- Análise Estatística

O teste Lilliefors foi aplicado para determinar a normalidade dos dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade (MTT) e avaliação da expressão de bak e bcl-2. Considerando que os resultados apresentaram distribuição normal, o teste *one way* ANOVA e pós-teste de Tukey foi aplicado em todos os ensaios para comparação do efeito dose-tempo-resposta dos tratamentos com a criptomoscatoxona D2, e entre as linhagens HeLa, SiHa, C33A e MRC-5. A análise estatística foi realizada através do software Biostat 4.0 (Belém do Pará, Brasil). O teste Z foi aplicado para os resultados do ensaio de AnexinaV / Iodeto de Propídio, comparando o efeito dose-resposta e tempo-resposta, entre as diferentes concentrações e tempo de tratamento nas linhagens HeLa, SiHa, C33A e MRC-5. O teste Z foi realizado através do software Sigma-Stat (USA). Em todas as análises estatísticas foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

4.1- Citotoxicidade (MTT)

Os tratamentos com a criptomoscatoona D2 por 6, 24 e 48 horas e por 6 horas com recuperação de 24, 48 e 72 horas foram primeiro avaliados para cada linhagem. Para células HeLa o aumento da citotoxicidade ocorreu proporcionalmente ao aumento da concentração e do tempo de tratamento em relação ao controle de veículo, o qual apresentou morte celular em menos que 10% das células. Nos tratamentos de 6 horas, seguidos de recuperação em 6, 24 e 48 horas, somente na concentração de 90 μ M e períodos de recuperação de 24 horas ($p < 0,05$) e 48 horas ($p < 0,01$) foi possível observar um aumento de citotoxicidade. Ainda, a melhor atividade citotóxica ocorreu no tratamento de 30 μ M, no tempo de recuperação de 72 horas ($p < 0,05$).

A maior atividade citotóxica do tratamento com a criptomoscatoona D2 em células SiHa foi em 60 μ M ($p < 0,05$) e 90 μ M ($p < 0,01$) por 24, bem como nos tratamentos de 30, 60 ($p < 0,05$) e 90 μ M ($p < 0,01$) por 48 horas. Nos tratamentos seguidos de recuperação, a citotoxicidade foi elevada no tratamento de 90 μ M com recuperação de 24 horas ($p < 0,05$) e 48 horas ($p < 0,01$).

Quando analisada a citotoxicidade da criptomoscatoona D2 em C33A, nos tempos de tratamento de 6, 24 e 48 horas, um aumento dose resposta e tempo resposta de morte celular foi observado. Maior citotoxicidade foi observada na concentração de 30 μ M por 48 horas ($p < 0,05$), 60 e 90 μ M por 6, 24 e 48 horas ($p < 0,01$). Após tratamento das células C33A por 6 horas, seguido de períodos de recuperação de 24, 48 e 72 horas, foi possível observar uma elevada citotoxicidade no tratamento com 60 μ M com recuperação de 24 horas ($p < 0,01$), 48 e 72 horas ($p < 0,05$), bem como no tratamento de 90 μ M seguido de recuperação por 24, 48 e 72 horas.

Elevada citotoxicidade em linhagem celular MRC-5 foi observada no tratamento com criptomoscatoona D2 na concentração de 90 μ M em 6 e 48 horas ($p < 0,05$). Após o tratamento

de 6 horas seguido de período de recuperação, um aumento de citotoxicidade foi observado nas concentrações de 60 μ M ($p < 0,05$) e 90 μ M ($p < 0,01$) com período de recuperação de 24 horas.

A avaliação comparativa de citotoxicidade do tratamento com a criptomoscatoína D2 entre as linhagens HeLa, SiHa, C33A e MRC-5 foi realizada para as diferentes concentrações (15, 30, 60 e 90 μ M) e tempos de tratamento (6, 24 e 48h), bem como no tempo de tratamento de 6 horas, seguido de período de recuperação de 6, 24 e 48 horas (Figuras 6 e 7). Não foi encontrada diferença significativa entre as diferentes linhagens celulares em todos os tempos de tratamento (Figura 6) e no tratamento de 6 horas seguido de recuperação (Figura 7). Embora não haja diferença na citotoxicidade entre as linhagens, é possível observar que HeLa e C33A, respectivamente, apresentam maior frequência de morte celular, nos tratamentos de 24 e 48 horas (Figura 6 B e C) . Em contrapartida, menor frequência de morte celular foi observada nas linhagens MRC-5 e SiHa nas mesmas condições de tratamento.

No tratamento de 6 horas e recuperação de 24, 48 e 72 horas (Figura 7) é possível observar que a linhagem C33A foi mais suscetível a ação citotóxica da criptomoscatoína D2 em todos os tempos de recuperação. Menor frequência de morte celular foi observada, consecutivamente, nas linhagens HeLa (HPV18), MRC-5 (SV-40) e SiHa (HPV16).

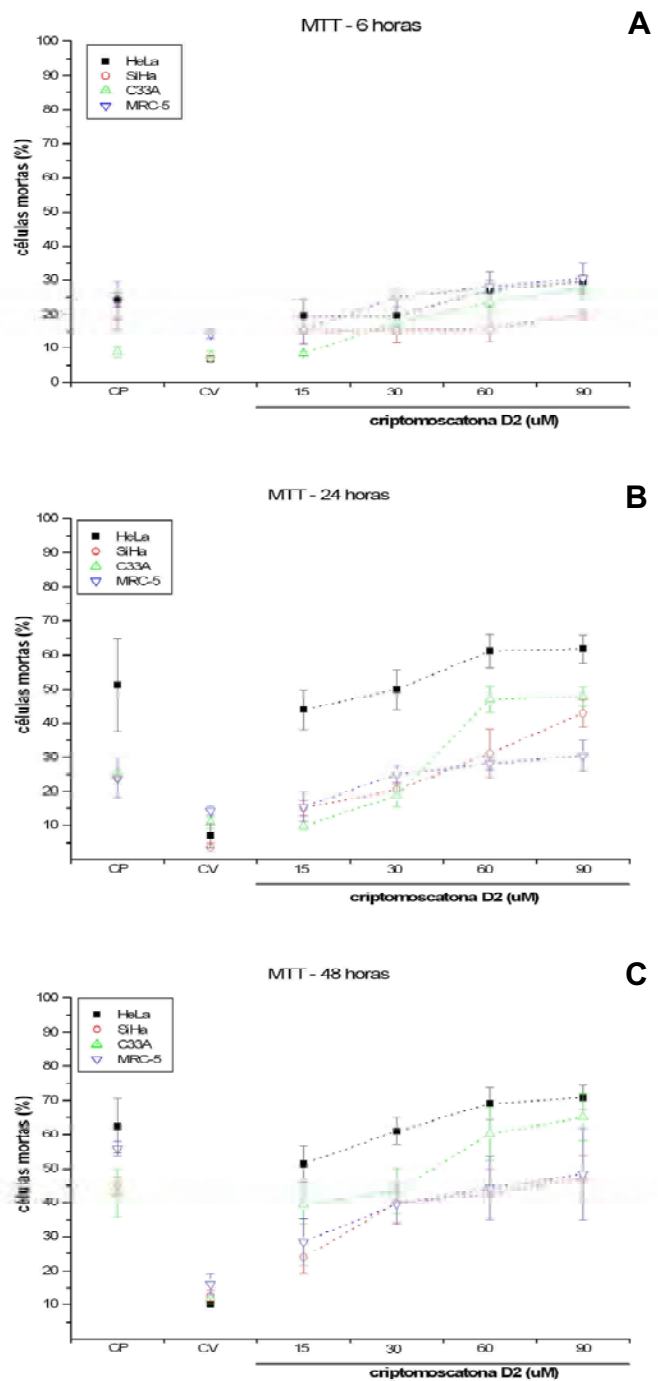


Figura 6: Ensaio de citotoxicidade (MTT). Porcentagem de células mortas nas linhagens HeLa (HPV18), SiHa (HPV16), C33A (não infectada) e MRC-5 (SV-40) tratadas com criptomoscatoína D2 de *C. mandioccona* nas concentrações de 15 μM, 30 μM, 60 μM e 90 μM. A) Tratamento por 6 horas; B) Tratamento por 24 horas e C) Tratamento por 48 horas. Os dados referem-se às médias (M) de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%).

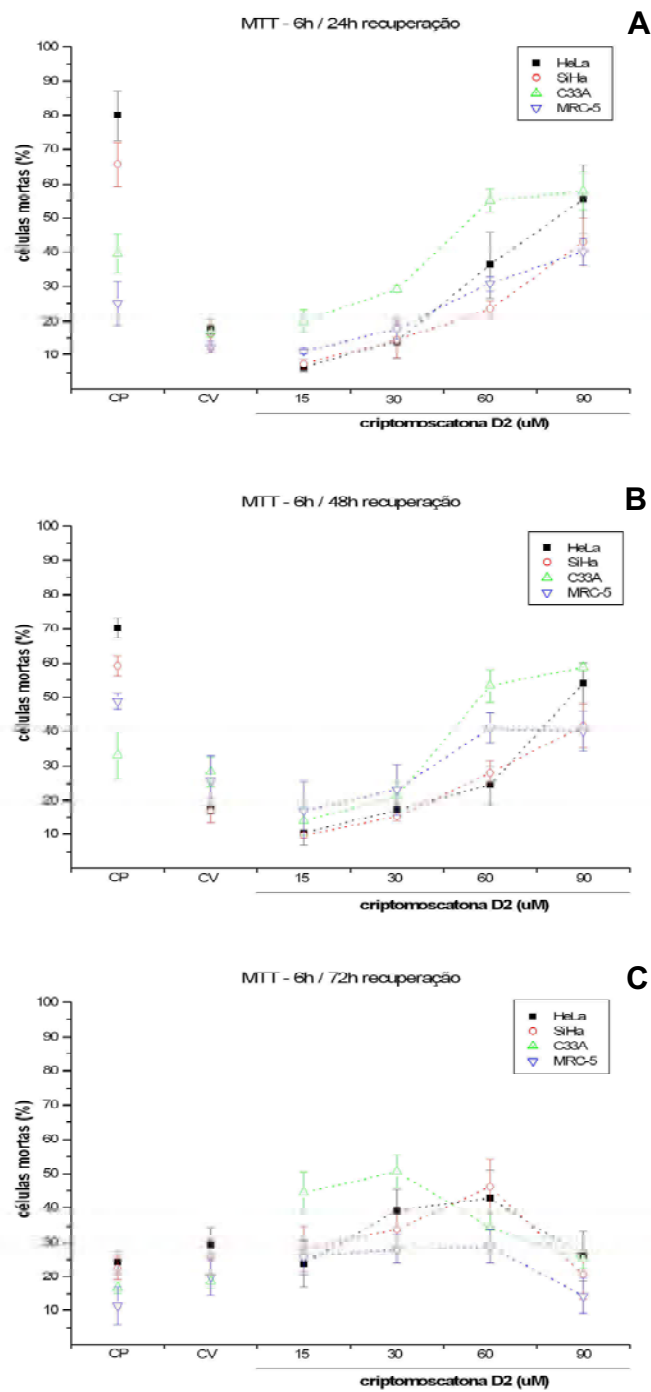


Figura 7: Ensaio de citotoxicidade (MTT). Porcentagem de células mortas nas linhagens HeLa (HPV18), SiHa (HPV16), C33A (não infectada) e MRC-5 (SV-40) tratadas com criptoscatona D2 nas concentrações de 15μM, 30μM, 60μM e 90μM. A) Tratamento por 6 horas e recuperação de 24 horas; B) Tratamento por 6 horas e recuperação de 48 horas e C) Tratamento por 6 horas e recuperação de 72 horas. Os dados referem-se às médias (M) de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%).

4.2- Expressão bak e bcl-2

Quando os tratamentos em diferentes concentrações da criptomoscatoína D2 de *C.mandiocanna*, por 6 horas seguido dos períodos de recuperação de 24, 48 e 72 horas foram avaliados em cada linhagem, não foi observada diferença estatística significativa para a expressão de bak e bcl-2. É possível observar uma pequena expressão das proteínas bak e bcl-2 (< 10%) nas células HeLa, SiHa, C33A e MRC-5 (Figura 8).

Na avaliação comparativa entre os tratamentos e períodos de recuperação nas diferentes linhagens, foi possível observar maior expressão de Bcl-2 (Figuras 8 A e B) em células SiHa nos períodos de tratamento por 6 horas e período de recuperação de 24 horas (SiHa *versus* HeLa $p < 0,01$; SiHa *versus* C33A e MRC-5, $p < 0,05$) e 48 horas (para todas as linhagens $p < 0,01$). A expressão de bak foi maior no tratamento de 6 horas seguido de recuperação por 24 horas (SiHa *versus* HeLa $p < 0,01$), 48 horas (SiHa *versus* HeLa e C33A, $p < 0,01$) e 72 horas (SiHa *versus* HeLa $p < 0,05$).

É possível observar que SiHa apresenta maior expressão de bcl-2 e bak no controle negativo, em todos os tempos de recuperação, quando comparadas com as demais linhagens e em todos os tempos de recuperação, exceto para o tempo de recuperação de 72 horas, cuja expressão de bak é maior em MRC-5 (controle negativo). De modo interessante, no período de recuperação de 24 horas, SiHa apresenta diminuição de expressão de bcl-2 e aumento de bak com efeito dose-resposta, o que corresponde a uma maior morte celular avaliada pelo MTT (Figura 7 A). No período de recuperação de 48 horas (Figura 8 B e E) bcl-2 encontra-se diminuído até 30 μ M e a expressão de bak diminuiu em 15 μ M. Quando a concentração do tratamento é maior (60 e 90 μ M), ambas as proteínas encontram-se com expressão elevada, sugerindo que a maior expressão de bak favoreceria os estímulos de morte celular, suplantando os estímulos anti-apoptóticos promovidos por bcl-2 e correspondendo a maior morte celular no MTT (Figura 7 B). Finalmente, no tempo de recuperação de 72 horas, não há

modulação da expressão de bcl-2, quando comparado com o controle negativo, e uma maior expressão de bak nas concentrações 30, 60 e 90 μ M (Figura 8 C e F). Curiosamente, nas mesmas condições, ao avaliar a citotoxicidade em 72 horas de recuperação (Figura 7 C), as células SiHa apresentam maior frequência de morte em 60 μ M e diminuição na maior concentração (90 μ M), sugerindo que as células recebam estímulos anti-apoptóticos por estas proteínas relacionadas com o controle de apoptose.

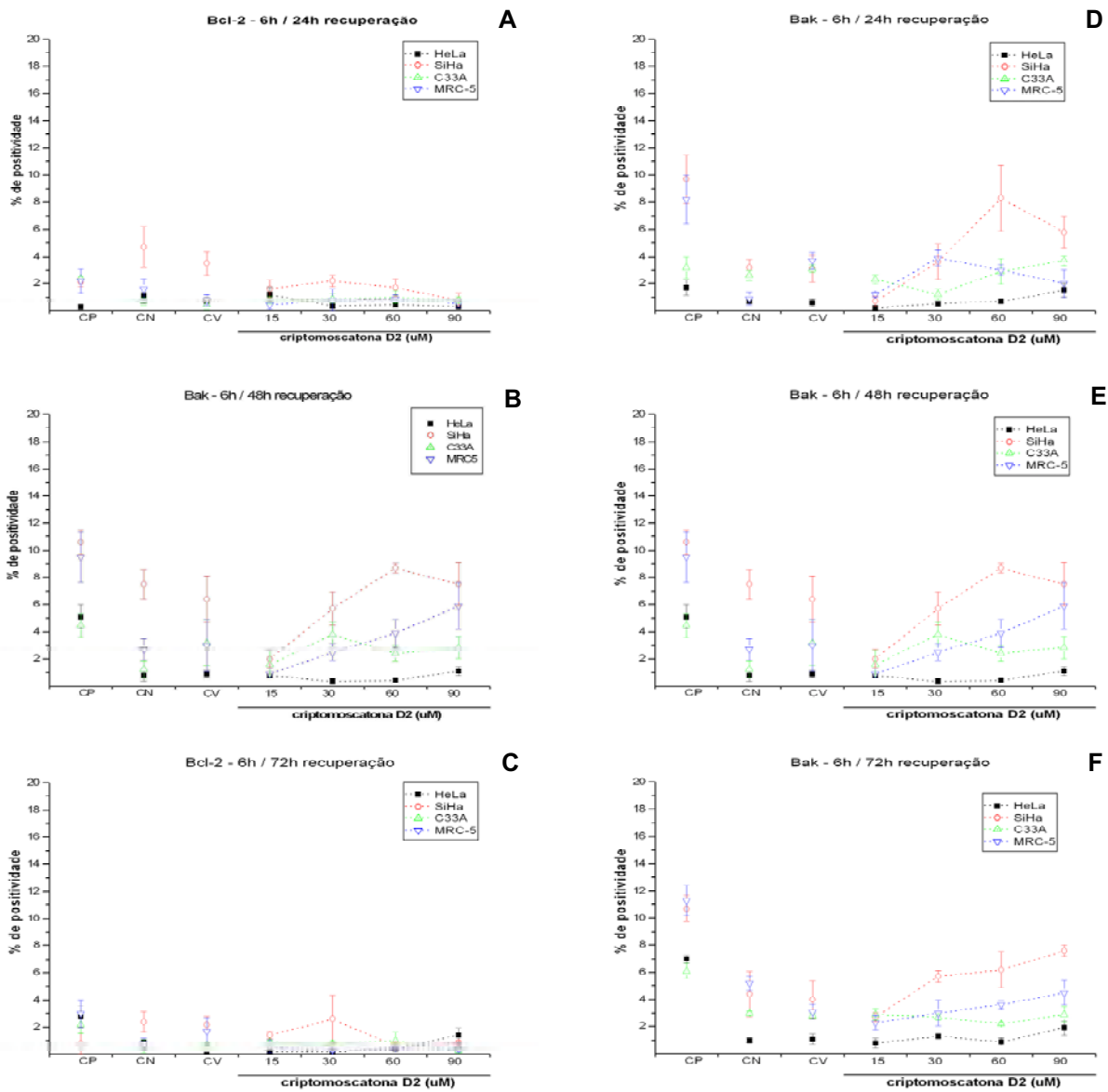


Figura 8: Expressão quantitativa de bak e bcl-2 (citometria de fluxo), nas linhagens HeLa (HPV18), SiHa (HPV16), C33A (não infectada) e MRC-5 (SV-40) tratadas com criptoscatona D2 nas concentrações de 15μM, 30μM, 60μM e 90μM. A) a C) Expressão de bcl-2 no tratamento por 6 horas e, respectivamente, recuperação de 24, 48 e 72 horas; D) a F) Expressão de bak no tratamento por 6 horas e, respectivamente, recuperação de 24, 48 e 72 horas. Os dados referem-se às médias (M) de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo), CN (controle negativo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%).

3- Ensaio de Apoptose (Anexina V)

Os resultados dos ensaios com anexina V, avaliados por citometria de fluxo, nas linhagens HeLa, SiHa, C33A e MRC-5 tratadas com a criptomoscatoxona D2 isolada de *C. mandioccana* estão apresentados Figura 9 A a F. É possível observar que a indução de apoptose precoce e apoptose tardia/necrose, foi muito baixa com frequência variando de 1 a 7% (apoptose precoce) e de 5 a 40% (apoptose tardia/necrose). Quando os tratamentos são avaliados em todas as linhagens (Figura 9 A a B), foi observada diferença estatisticamente significativa de apoptose precoce no tempo de recuperação de 24 horas (C33A *versus* HeLa e MRC-5, $p < 0,05$) e de 48 horas (C33A *versus* MRC-5, $p < 0,05$). Para os demais tratamentos, não foi observada diferença significativa para a presença de apoptose precoce e/ou apoptose tardia/necrose. Esses resultados poderiam sugerir que o tratamento de 6 horas seria insuficiente para a indução de apoptose ou que o mecanismo de morte celular observado no ensaio do MTT seria possivelmente atribuído a outros mecanismos não avaliados no presente estudo.

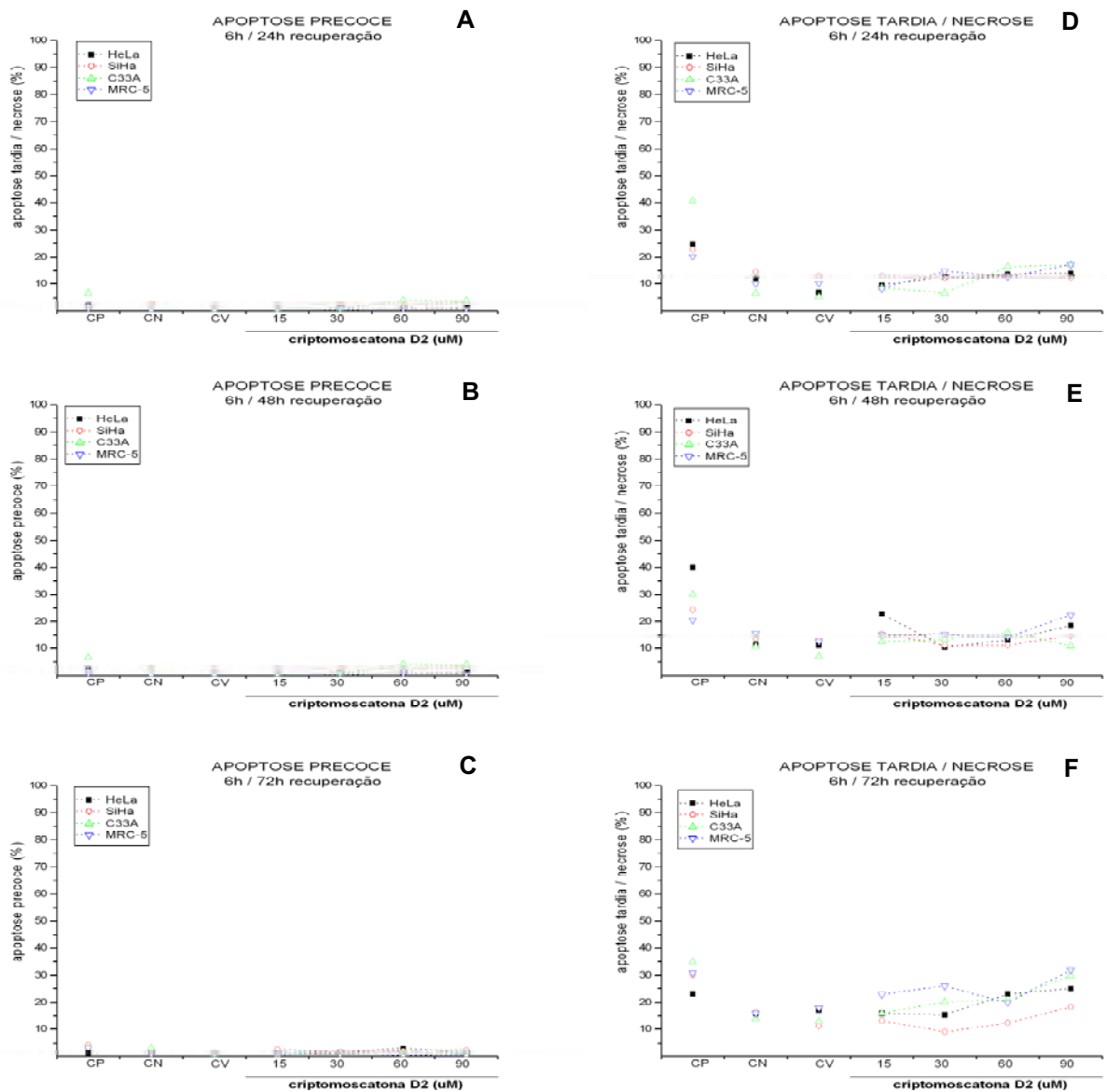


Figura 9: Ensaio de apoptose (Anexina V), avaliado por citometria de fluxo, nas linhagens HeLa (HPV18), SiHa (HPV16), C33A (não infectada) e MRC-5 (SV-40) tratadas com criptoscatona D2 nas concentrações de 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M e 90 μ M. A) a C) Quantificação de anexina V resultante da externalização de fosfatidilserina (apoptose precoce) no tratamento por 6 horas e, respectivamente, recuperação de 24, 48 e 72 horas; D) a F) Quantificação de anexina V e Iodeto de propídio (apoptose tardia/necrose) no tratamento por 6 horas e, respectivamente, recuperação de 24, 48 e 72 horas. CP (controle positivo), CN (controle negativo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%).

O desequilíbrio entre o crescimento e a morte celular ocasiona o desenvolvimento do câncer, e tem-se tornado evidente que as células neoplásicas escapam da morte celular por falha nos mecanismos de apoptose (STANLEY, 2003). As células tumorais geralmente possuem uma série de modificações genéticas que impedem o processo de apoptose, colaborando para o crescimento celular aberrante, o desenvolvimento da neoplasia maligna e, posteriormente, sua capacidade de invasão (HAJRA e LIU, 2004). Apoptose é a habilidade de as células em se autodestruírem através da ativação do suicídio celular intrínseco na presença de danos severos (LOWE e LIN, 2000). Ainda, tem-se tornado claro que certos vírus possuem estratégias para driblar a apoptose, e tendem a estar associados com a tumorigênese. Estudos demonstram que a E6 do HPV 18 pode interferir na apoptose induzida por Bak independentemente de p53. A oncoproteína E6 de HPV de alto risco induz a degradação de bak em células Saos-2 e 293 (THOMAS e BANKS, 1998). A resistência a apoptose das células cancerosas faz necessário o desenvolvimento de novas drogas para combinação quimioterápica (LOWE e LIN, 2000). Contudo, a seletividade da ação quimioterápica é o maior desafio, pois esses fármacos destroem tanto células cancerosas como células não cancerosas. Dessa forma, há uma urgente necessidade de encontrar novos agentes químicos que possam diferenciar entre células normais e células cancerosas, matando seletivamente células cancerosas (TIAN et al, 2007), por mecanismo de apoptose.

As estilipironas têm sido estudadas por apresentarem atividade antiproliferativa em diferentes linhagens, principalmente a substância denominada goniotalamina, apresentando atividade apoptogênica (LEE, AZIMAHTOL e TAN, 2003). Recente estudo demonstrou que embora z-criptofoliona e criptomoscatoína D2 sejam eficientes inibidores de checkpoint na fase G2, impedindo a proliferação celular por interromper o ciclo celular nessa fase, são ao mesmo tempo muito tóxicos (STURGEON et al., 2007). O tratamento com compostos extraídos de plantas é capaz de induzir morte celular em HeLa, SiHa, CaSki e C33A (ZHANG

et al.,2005; YIM et al., 2006). No presente estudo a estirilpirona criptomoscatoana D2 isolada de *Cryptocarya mandioccana*, demonstrou um aumento de citotoxicidade dose-resposta e tempo-resposta em células HeLa, SiHa, C33A e MRC-5. No nosso estudo, embora não haja diferença significativa de citotoxicidade entre as linhagens, é possível observar que HeLa e C33A responderam com maior sensibilidade ao tratamento em 24 e 48 horas (maior morte celular) enquanto MRC-5 e SiHa foram menos sensíveis (menor morte celular) nas mesmas condições de tratamento. O tratamento das linhagens HeLa, SiHa e C33A com ácido ursólico demonstrou maior atividade de inibição de proliferação celular nas linhagens infectadas por HPV, quando comparadas a não infectada, C33A (YIM et al., 2006). O número de cópias virais e a oncogenicidade do vírus poderiam explicar o comportamento diferente para a morte celular induzida no tratamento com a criptomoscatoana D2. As linhagens possuem número de cópias virais diferentes: SiHa (HPV-16) possui 1 a 10 cópias /célula enquanto HeLa (HPV18) possui 10 a 50 cópias/célula (OH et al., 2004).

Nossos resultados demonstram que a citotoxicidade do tratamento com criptomoscatoana D2 nas linhagens HeLa e C33A apresentou atividade diferente quando o tratamento é realizado com e sem período de recuperação. HeLa e SiHa aparentemente retomam sua capacidade proliferativa, que é diretamente proporcional ao tempo de recuperação, enquanto o mesmo comportamento não é observado em C33A. A maior capacidade das células em restabelecer a proliferação parece estar associada à presença do HPV, indicando que esta estirilpirona pode não possuir ação seletiva sob as oncoproteínas E6 e E7 de HPV. Embora, no presente estudo não tenha sido avaliada a expressão de RNAm de E6 e E7, uma boa terapia anti-HPV deveria inibir a expressão dessas oncoproteínas. Em células HeLa, o bloqueio da função das proteínas virais E6, E7 ou ambas, utilizando RNA de interferência (RNAi) induz a senescência dessas células demonstrando a importância da atividade viral para a sobrevivência celular (HALL e ALEXANDER, 2003). Ainda, a ausência de

vírus na linhagem C33A poderia explicar a menor recuperação pós-tratamento com a criptomoscatoana D2 isolada de *C. mandioccana*. A superexpressão de E6 é capaz de degradar p53 inibindo o controle do ciclo celular de fase G1/S (DOORBAR, 2005). O tratamento genotóxico de células de câncer com tipos de HPV de alto risco e que expressam o gene E6 de cópias virais integradas ao genoma, resultam no aumento da expressão de p53 e o restabelecimento dos mecanismos de apoptose (BUTZ et al., 1996). Estudos recentes conduzidos por nosso laboratório verificaram que o extrato etanólico de *C. mandioccana* nas concentrações de 0,5 a 2,0 mg/mL apresentaram efeito mutagênico (OLIVEIRA et al, submetido em 2007). O tratamento com agentes indutores de danos no DNA eventualmente resulta na morte de células tumorais HPV-positivas por apoptose, induzindo genes alvos de p53, como por exemplo bax. Células infectadas por HPV podem exibir resposta celular intacta ao estresse genotóxico, o qual pode envolver vias bioquímicas dependentes ou independentes de p53 (BUTZ et al., 1996).

Entretanto, a elevada citotoxicidade de um composto não pode ser considerada necessariamente evidência de eficácia na terapia anticarcinogênica. No presente estudo, procuramos identificar o potencial mecanismo de ação da criptomoscatoana D2 na apoptose de via intrínseca. Estudos prévios, em linhagens celulares de câncer de mama e leucemia promielocítica, verificaram que derivados da estirilpirona goniootalamina, isolados de *Goniothalamus umbrosus* e *Goniothalamus cheliensis*, apresentaram importante ação antiproliferativa, induzindo morte celular e alterando a expressão de proteínas da via intrínseca de apoptose (CHIEN e PIHIE, 2003; INAYAT-HUSSAIN et al., 2003; ZHONG et al., 2005). A ativação de caspase 7 e acúmulo de citocromo *c* após o tratamento de células MCF-7 com estirilpirona isolada de *Goniothalamus umbrosus*, evidenciou a atividade apoptótica desse composto (LEE, AZIMAHTOL e TAN, 2003). Em outro estudo, a evidência de indução de apoptose em células MCF-7 (adenocarcinoma de mama), tratadas com a

goniotalamina, foi observada pela manutenção da baixa expressão de bcl-2 e aumento de bax, uma proteína pró-apoptótica, em todas as concentrações estudadas (CHIEN e PIHIE, 2003).

Como a estilipirona criptomoscatoana D2 de *C. mandioccana* possui estrutura química similar a da goniotalamina, com apenas a inserção de um grupamento 1,3 butanodiol, decidimos avaliar diferentes proteínas da via intrínseca, esperando encontrar o mesmo efeito apoptótico. A expressão anormal da proteína bcl-2 tem sido amplamente demonstrada em uma variedade de tumores, incluindo malignidades hematológicas (HANADA et al., 1993), carcinoma de próstata (COLOMBEL et al., 1993) e carcinoma de pequenas células do pulmão (BEN-EZRA et al., 1994). Substâncias químicas que bloqueiam proliferação celular podem apresentar potencial anticarcinogênico por indução da apoptose. Ácido ursólico, uma substância isolada de plantas (*Rosemarinus officinalis*, *Eriobotrya japonica*, *Calluna vulgaris* e *Eugenia jumbolana*), representa uma potencial droga anticarcinogênica para neoplasias associadas ao HPV (YIM et al., 2006). Experimentos *in vitro*, utilizando células CaSki infectadas por HPV16, verificaram a inativação e/ou um baixo nível de p53 estão associados com o aumento da expressão de bcl-2, o que pode contribuir para a transformação maligna (LIANG et al., 1995; MIYASHITA et al., 1994). Prévios estudos demonstram que a ação de compostos químicos e produtos naturais em linhagens celulares infectadas por HPV (HeLa, SiHa e Caski) apresentaram: redução nos níveis de RNAm de E6 e E7, inibição da função de E6/E7 em se ligar a p53, restabelecimento da expressão de p53, inibição da proliferação de células tratadas, indução de apoptose (NARAYANAN et al., 1998; UM et al., 2002; LEE et al., 2005).

Ao avaliar a expressão de proteínas sinalizadoras da apoptose de via intrínseca, bcl-2 (antiapoptótica) e bak (pró-apoptótica) foi observado que a expressão destas proteínas não se alterou com o aumento das concentrações e tempos de tratamento em nenhuma das quatro linhagens celulares estudadas (HeLa, SiHa, C33A e MRC-5). Baixa expressão de bak e bcl-2

foi observada, sugerindo que talvez esse não seja o mecanismo de morte celular promovido pela criptomoscatoona D2. Alguns compostos podem induzir morte celular por despolimerização do citoesqueleto de actina, miosina ou tubulina (MOSS et al., 2006; PRAGER-KHOUTORSK et al., 2007) por senescência (FENG et al., 2007) ou por inibição de topoisomerase (POLYCARPOU-SCHWARZ et al., 2007; KOGAN et al., 2007). Assim na continuidade do estudo seria desejável a avaliação de outros mecanismos de morte celular que pudessem justificar a citotoxicidade observada no ensaio do MTT. Em contrapartida, a ausência de ativação de proteínas responsáveis pelo controle de apoptose de via intrínseca não exclui a possível atividade do tratamento por via extrínseca ou outro tipo de morte celular como a autofagia ou necrose. (HAJRA e LIU, 2004).

A diferença de atividade citotóxica e de apoptose poderia ser explicada pela estrutura química da estirilpirona criptomoscatoona D2 utilizada no tratamento das diferentes linhagens. Algumas estirilpironas isoladas de *Goniothalamus* (goniotalaminas) apresentam alta citotoxicidade se tornando um novo tópico na fitoquímica e oncofarmacologia desde o descobrimento da atividade anticarcinogênica do taxol (TIAN et al, 2007). Segundo PILLI et al., 2006, as estirilpironas possuem, pelo menos, três grupos farmacofóricos que estão envolvidos nas atividades antiproliferativa (Figura 10 A). O fato de o carbono C6 das estirilpironas estar em *R* ou *S* também influencia a atividade antiproliferativa. Em estudos recentes com derivados de estirilpironas, através de sínteses assimétricas de algumas moléculas, a goniotalamina com a estereoquímica *S* do C6 demonstrou-se mais ativa que seu enantiômero.

O aumento do número de hidroxilas na cadeia lateral das estirilpironas pode aumentar ou diminuir a atividade antiproliferativa na dependência da linhagem celular (TELASCREÂ, 2006). A estirilpirona criptomoscatoona D2 estudada apresenta adição do grupamento 1,3-butanodiol em sua estrutura em relação a goniotalamina (Figura 10 B), substância com

atividade antiproliferativa e apoptogênica. Este grupamento adicional poderia aparentemente alterar a atividade da molécula mantendo a atividade antiproliferativa (citotóxica), porém perdendo a atividade apoptogênica.

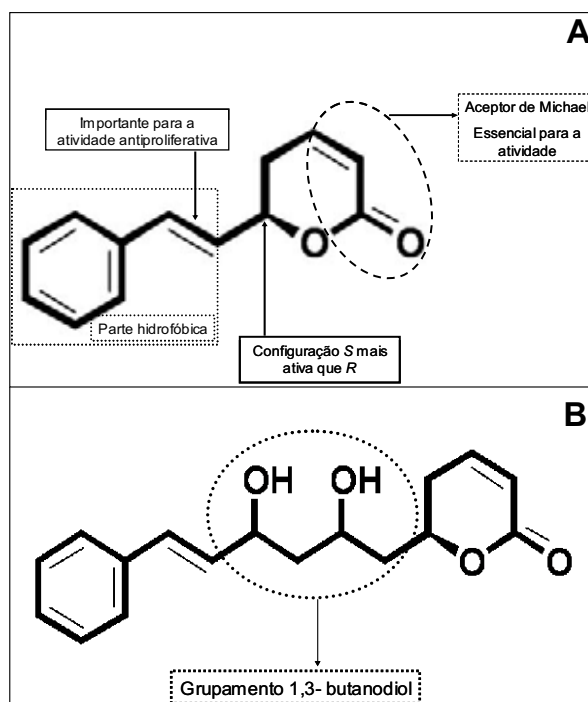


Figura 10: Em A) grupos farmacofóricos da goniotalamina, segundo PILLI et al., 2006. Em B) Criptomoscatoína D2, adição do grupamento 1,3-butanodiol em relação a goniotalamina.

Ainda, a presença de aceptor Michael, presente na estilpirona criptomoscatoína D2 utilizada no presente estudo, poderia ser responsável pela atividade antiproliferativa encontrada. A ligação do aceptor de Michael com proteínas alvos, como por exemplo aquelas responsáveis pela exportação nuclear (STURGEON et al., 2007) ou por induzir ubiquitinação de Erb2 (JUNG et al., 2007), aparentemente contribuem para essa atividade antiproliferativa. A curcumina (Diferuloil metano), que também possui esse aceptor, parece possuir atividade para câncer de colo uterino infectado por HPV (DIVYA e PILLAI, 2006; PRUSTY e DAS, 2005; SINGH e BHAT, 2004). Esse composto induz apoptose e inibe a expressão do RNAm de E6 e E7 (DIVYA e PILLAI, 2006), desregula a transcrição de genes de HPV18 (PRUSTY e DAS, 2005) e diminui a expressão de bcl-2 (SINGH e BHAT, 2004).

- 1) A estirilpirona criptomoscatoana D2 isolada de *C. mandiocanna* ocasiona morte celular devido a sua alta citotoxicidade, em linhagens HeLa, SiHa, C33A e MRC-5, na dependência da concentração, do tempo de tratamento e do tempo de recuperação pós tratamento.

- 2) A estirilpirona criptomoscatoana D2 isolada de *C.mandiocanna* aparentemente não induz apoptose de via intrínseca nas concentrações e tempos estudados, sugerindo que outras e vias apoptóticas ou diferentes mecanismos de morte celular deveriam ser investigados.

- 3) A estirilpirona criptomoscatoana D2 isolada de *C.mandiocanna* aparentemente não induz apoptose por via extrínseca, avaliada parcialmente pela externalização de fosfatidilserina, sugerindo diferentes mecanismos de apoptose e outras estruturas subcelulares, potencialmente alvos terapêuticos, deveriam ser investigados.

,

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYLY, A. C.; ROBERTS, R. A.; DIVE, C. Mechanisms of apoptosis. In: BITTAR, E. E. **Advances in molecular and cell biology**. London, 1997, p.183-229.

BEN-EZRA, J. M.; KORNSTEIN, M. J.; GRIMES, M. M.; KRYSTAL, G. Small cell carcinomas of the lung express the bcl-2 protein. **Am J Pathol**, v.145, p.1036-1040, 1994.

BOERSMA, H. H.; KIETSELAER, B. L.; STOLK, L. M.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J Nucl Med**, v.46, n.12, p.2035-2050, 2005.

BOSCH, F. X.; SANJOSE, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n.31, p.3-13. 2003.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)**, v.70, n.2, p.231-239. 2005.

BREHM, A.; MISKA, E.; REID, J.; BANNISTER, A.; KOUZARIDES, T. The cell cycle-regulating transcription factors E2F-RB. **Br J Cancer**, v.80, p.38-41, 1999.

BUTZ, K.; GEISEN, C.; ULLMANN, A.; SPITKOVSKY, D.; HOPPE-SEYLER, F. Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis. **Int J Cancer**, v.68, p.506-513, 1996.

CASTELLSAGUE, X.; MUNOZ, N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n.31, p.20-28. 2003.

CHAKRABARTI, O.; KRISHNA, S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. **J Biosci**, v.28, p.337-348, 2003.

CHAN F. L.; CHOI H. L.; CHEN Z. Y.; CHAN P. S. F.; HUANG Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin **Cancer Lett**. v.160, p.219-228, 2000.

CHAN, S. L.; YU, V. C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities **Clin. Exp. Pharmacol**. v.31, p.119-128, 2004.

CHIEN, A. L.; PIHIE, A. H. Styrylpyrone derivative induces apoptosis through the up-regulation of Bax in the human breast cancer cell line MCF-7. **J Biochem Mol Biol**, v.36, p.269-274, 2003.

COHEN, G. M. Caspases: The executioners of apoptosis. **Biochem J**, v.326, p.1–16, 1997.

COLOMBEL, M.; SYMMANS, F.; GIL, S.; O'TOOLE, K. M.; CHOPIN, D.; BENSON, M.; OLSSON, C. A.; KORSMEYER, S.; BUTTYAN, R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. **Am J Pathol**, v.143, p.390-400, 1993.

COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patología celular I: lesão e morte da célula. In: COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patologia estrutural da célula e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.1-26.

CRUSIUS, K.; RODRIGUEZ, I.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. **Virus Genes**, v.20, p.65-69, 2000.

DE CARVALHO P. R. F.; FURLAN M.; YOUNG M. C. M.; KINGSTON D.G. I.; BOLZANI V. S. Acetylated DNA-damaging Clerodane diterpenes from *Casearia Sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n.6, p.1659-1662, 1998.

DING, Z.; TANG S.C.; WEERASINGHE, P.; YANG, X.; PATER, A.; LIEPINS, A. The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death. **Biochem Pharmacol**, v.63, n.8, p.1415-1421, 2002.

DIVYA, C. S.; PILLAI, M. R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocations, and modulation of apoptosis. **Mol Carcinog**, v.45, p.320-332, 2006.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, v.32 Suppl 1, Mar, p.S7-15, 2005.

DUARTE-FRANCO, E. e FRANCO E. L.. Cancer of the Uterine Cervix. **BMC Womens Health**, v.4, p.S13, 2004.

DUMONTET, V.; VAN HUNG, N.; ADELIN, M. T.; RICHE, C.; CHIARONI, A.; SEVENET, T.; GUERITTE, F. Cytotoxic flavonoids and alpha-pyrone from *Cryptocarya obovata*. **J Nat Prod**, v.67, p.858-62, 2004.

FAIRLAMB, I. J.; KAPDI, A. R.; LEE, A. F.; SANCHEZ, G.; LOPEZ, G.; SERRANO, J. L.; GARCIA L.; PEREZ, J.; PEREZ, E. Mono- and binuclear cyclometallated palladium(II) complexes containing bridging (N,O-) and terminal (N-) imidate ligands: air stable, thermally robust and recyclable catalysts for cross-coupling processes. **Dalton Trans**, v.23, p.3970-3981, 2004.

FENG, R.; NI, H. M.; WANG, S. Y.; TOURKOVA, I. L.; SHURIN, M. R.; HARADA, H.; YIN, X. M. Cyanidin-3-rutinoside, a Natural Polyphenol Antioxidant, Selectively Kills Leukemic Cells by Induction of Oxidative Stress. **J Biol Chem**, v.282, n.18, p.13468-13476, 2007.

FRANCESCHI, L.A.; HERRERO, R.; VECCHIA S. C. Cervical cancer screening in Europe: what next? **Eu J Cancer**, v.36, p.2272-2275, 2000.

GABLER, B.; MOHRENFELS, C. W.; DREISS, A. K.; MARSHALL, J.; LOHMANN, C. Vitality of epithelial cells after alcohol exposure during laser-assisted subepithelial keratectomy flap preparation. **J Cataract Refr Surg**, v.28, p.1841-1846, 2002.

GARRIDO, C.; KROEMER, G. Life's smile, death's grin: Vital functions of apoptosis-executing proteins. **Curr Opin Cell Biol**, v.16, p.639-646, 2004.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends Cell Biol**; v.8, p.267-271, 1998.

GUPTA S.; AFAQ F.; MUKHTAR H. Selective Growth-Inhibitory, Cell-Cycle Deregulatory and Apoptotic Response of Apigenin in Normal versus Human Prostate Carcinoma Cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.287, p.914-920, 2001.

HAIL, J. N. Mitochondria: A novel for the chemoprevention of cancer. **Apoptosis**, v.10, p. 687-705, 2005.

HAIL JR, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v.11, p.889-904, 2006.

HAJRA, K. M. ; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**. v.9, p.691-704, 2004

HALL, A. H.; ALEXANDER K.A. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. **J Virol**, v.77, n.10, p.6066-6069, 2003.

HANADA, M.; DELIA, D.; AIELLO, A.; STADTMAUER, E.; REED, C. J. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.82, p.1820-1828, 1993.

HEISE, A. The clinical significance of HPV. **Nurse Pract**, v.28, n.10, p.8-19, 2003.

HEITZMAN M. E.; NETO C. C.; WINIARZ E.; VAISBERG A. J.; HAMMOND G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochem**, v.66, p.5–29, 2005.

IARC. Human papillomaviruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Int Agency Res Cancer**. Lyon: IARC, 1995.

INAYAT-HUSSAIN, S. H.; ANNUAR, B. O.; DIN, L. B.; ALI, A. M.; ROSS, D. Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniothalamin in HL-60 leukemia cells. **Toxicol In Vitro**. v.17, n.4, p.433-439, 2003.

INCA, Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa 2005: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

INCA, Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

JEFFREY, B. K. A célula. In: JEFFREY, B. K. **Atlas de histologia funcional**. São Paulo: Artes Médicas, p.1-25, 2000.

JUNG, Y.; XU, W.; KIM, H.; HA, N.; NECKERS, L. Curcumin-induced degradation of ErbB2: A role for the E3 ubiquitin ligase CHIP and the Michael reaction acceptor activity of curcumin. **Biochim Biophys Acta**, v.1773, p.383-390, 2007.

KABSCH, K.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. **J Virol**, v.76, p.12162-72, 2002.

KABSCH, K.; MOSSADEGH, N.; KOHL, A.; KOMPOSCH, G.; SCHENKEL, J.; ALONSO, A.; TOMAKIDI, P. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. **Intervirology**, v.47, n.1, p.48-56, 2004.

KERR, J. F. R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M. HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biol**, v.46, p.1–27, 1995.

KLETER B.; VAN DOORN L. J.; TER SCHEGGET J.; SCHRAUWEN L.; VAN KRIMPEN K.; BURGER M.; TER HARMSEL B.; QUINT W. A novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. **Am J Pathol**, v.153, n.6, p.1731-1739, 1998.

KOGAN, N. M.; SCHLESINGER, M.; PRIEL, E.; RABINOWITZ, R.; BERENSHTEIN, E.; CHEVION, M.; MECHOULAM, R. HU-331, a novel cannabinoid-based anticancer topoisomerase II inhibitor. **Mol Cancer Ther**, v.6, n.1, p.173-183, 2007.

KORSMEYER, S. J. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. **Cancer Res**, v.59, n.7 Suppl, Apr 1, p.1693s-1700s. 1999.

KUTUK, O.; BASAGA, H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. **Apoptosis**, v.11, p.1661–1675, 2006.

LAN, Y. H.; CHANG, F. R.; YU, J. H.; YANG, Y. L.; CHANG, Y. L.; LEE, S. J.; WU, Y. C. Cytotoxic styrylpyrones from *Goniiothalamus amuyon*. **J Nat Prod**. v.66, p.487-90, 2003.

LAUNA, Y. S.; HERMINE, O.; FONTENAY, M.; KROEMER, G.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. Vital functions for lethal caspases. **Oncogene**, v.24, p.5137–5148, 2005.

LAVIN, M. R. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. **Am J Psychiat**, v.150, p.1752-3, 1993

LEE H. G.; YU, K. A.; OH, W. K.; BAEG T. W.; OH, H. C.; AHN, J. S.; JANG, W. C.; KIM, J. W.; LIM, J. S.; CHOE, Y. K.; YOON, D. Y. Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. **J Ethnopharmacol**, v.98, n.3, Apr 26, p.339-343. 2005.

LEE, A. T. C.; AZIMAHTOL, H. L. P.; TAN, A. N. Styrylpyrone Derivative (SPD) induces apoptosis in a caspase-7-dependent manner in the human breast cancer cell line MCF-7. **Cancer Cell Int**, v.3, p.16, 2003.

LI, B.; DOU, Q. P. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. **Proc Natl Acad Sci**, v.97, p.3850–3855, 2000.

LIANG, X. H.; MUNGAL, S.; AYSCUE, A. Bcl-2 proto oncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. **J Cell Biochem**, v.57, p.509-52, 1995.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. **J Virol**, v.78, p.3533–41, 2004.

LOPEZ-OCEJO, O.; VILORIA-PETIT, A.; BEQUET-ROMERO, M.; MUKHOPADHYAY, D.; RAK, J.; KERBEL, R. S. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. **Oncogene**, v.19, p.4611-4620, 2000.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p.485-495, 2000.

MAISTRO E. L.; CARVALHO J. C. T.; MANTOVANI M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicol in Vitro**, v.18, p.337–342, 2004.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, v.82, p.15-33, 2001.

MCMURRAY, H. R.; MCCANCE, D. J. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. **J Virol**, v. 77, n.18, p.9852-61, 2003.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; MARIA, S. S. Morte celular. IN: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001**. São Paulo: Manole. cap.23, p.275- 281, 2001.

MIYASHITA, T.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; WANG, H. G.; LIN, H. K.; LIEBERMANN, D. A.; HOFFMAN, B.; REED, J. C. Tumour suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and base gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, v.9, p.1799-1805, 1994.

MOCHIZUKI, T.; KUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J. F.; TAMAKI, N. Detection of Apoptotic Tumor Response In Vivo After a Single Dose of Chemotherapy with 99mTc-Annexin V. **J Nucl Med**, v.45, n.3, p.526, 2004.

MOSS, D. K.; BETIN, V. M.; MALESINSKI, S. D.; LANE, J. D. A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. **J Cell Sci**, v.1119, p.2362-2374, 2006.

MOSS, S. E.; MORGAN, R. O. The annexins. **Genome Biol.**v. 5, n. 4, p. 219, 2004.

MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; VILLANUEVA, S. L.; MARUO, T. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. **J Med Sci**, v.50, p.9-19, 2004.

NARAYANAN, B. A.; HOLLADAY, E. B.; NIXON, D. W.; MAURO, C. T. The effect of all-trans and 9-cis retinoic acid on the steady statelevel of HPV16 E6/E7 mRNA and cell cycle in cervical carcinoma cells. **Life Sci**, v.63, n.7, p.565-573, 1998.

NEHME, C. J.; PEDRO, L. R.; MORAES, B.; CAVALHEIRO, A. J. Intrapopulational variability of styrylpyrones in leaves of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) from Carlos Botelho State Park. **Biochem System Ecol**, v.30, p.613–616, 2002.

NGUYEN, D. X.; WESTBROOK, T. F.; MCCANCE, D. J. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. **J Virol**, v.76, p.619-32, 2002.

NOYA, F.; CHIEN, W. M.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T. p21cip1 degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. **J Virol**, v.75, p.6121–34, 2001.

OH, T.; KIM, C.; WOO, S.; KIM, T.; JEONG, D.; KIM, M.; LEE, S.; AN, S. Development and clinical evaluation of a highly sensitive DNA microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses. **J Clin Microbiol**, v.42, n.7, p.3272-3280, 2004.

OLIVEIRA A. M., CALIRI C. M., REGASINI L. O., TELASCREA M., PERON M. C. C., SILVA D. H. S., BOLZANI V. S., CAVALHEIRO A. J., SOARES C. P. Screening for

mutagenic effect of extracts from Brazilian cerrado and atlantic forest. **Int J Toxicol**, submetido em Abril de 2007.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **Int J Cancer**, v.94, n.2, p.153-156, 2001.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THIER, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochem Pharmacol**, v.65, n.9, p.1451-1461, 2003.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W.; Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v.1644, p.83– 94, 2004.

PILLI, R. A.; ROBELLO, L. G.; CAMILO, N. S.; DUPONT, J.; LAPIS, A. A. M.; SILVEIRA-NETO, B. A. Addition of activated olefins to cyclic N-acyliminium ions in ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v.47, p.1669–1672, 2006.

PISANI P.; BRAY F.; PARKIN D. M. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int J Cancer**, v.97, p.72-81, 2002.

POLYCARPOU-SCHWARZ, M.; MULLER, K.; DENGGER, S.; RIDDELL, A.; LEWIS, J.; GANNON, F.; REID, G. Thanatop: A Novel 5-Nitrofuran that Is a Highly Active, Cell-Permeable Inhibitor of Topoisomerase II. **Cancer Res**, v.67, n.9, p.4451-4458, 2007.

PRAGER-KHOUTORSKY, Y. M.; GONCHAROV, I.; RABINKOV, A.; MIRELMAN, D.; GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. D. Allicin inhibits cell polarization, migration and division via its direct effect on microtubules. **Cell Motil Cytoskeleton**, v.64, n.5, p.321-337, 2007.

PRUSTY, B. K.; DAS, B. C. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cell by curcumin. **Int J Cancer**, v.113, p.951-960, 2005.

RITCHIE J. M.; SMITH E. M.; SUMMERSGILL K. F.; HOFFMAN H. T.; WANG D.; KLUSMANN J. P.; TUREK L. P.; HAUGEN T. H. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**, v.104, n.3, p.336-44, 2003.

SARASTE, A.; PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v.45, n.3, p.528-537, 2000.

SINGH, S.; BHAT, M. K. Carboplatin induces apoptotic cell death through downregulation of constitutively nuclear factor-kappaB in human HPV-18 E6-positive HEP-2 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.318, p.346-353, 2004.

SMITH E. M.; RITCHIE J. M.; SUMMERSGILL K. F.; KLUSMANN J. P.; LEE J. H.; WANG D.; HAUGEN T. H.; TUREK L. P. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. **Int J Cancer**, v.108, n.5, p.766-772, 2004.

STANLEY, M. Chapter 17: Genital human papillomavirus infections--current and prospective therapies. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n.31, p.117-124, 2003.

STANLEY, M. A. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. **Virus Res**, v.89, p.241-248, 2002.

STUBENRAUCH, F. e LAIMINS L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Semin Cancer Biol**, v.9, n.6, p.379-386, 1999.

STURGEON, C.M.; CINEL, B.; DIAZ-MARRERO, A. R.; MCHARDY, L. M.; NGO, M.; ANDERSEN, R. J.; ROBERGE, M. Abrogation of ionizing-induced G(2) checkpoint and inhibition of nuclear export by *Cryptocarya pyrenes*. **Cancer Chemother Pharmacol**, in press, 2007.

TELASCREÂ, M., YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J. Isolamento de duas estirilpironas inéditas de extratos de folhas de *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 29^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, de 19 a 22 de maio de 2006.

TELASCREA, M. **Busca de substâncias antitumorais e antifúngicas através do estudo fitoquímico biomonitorado em *Cryptocarya mandioccana* e *Cryptocarya moschata* (Lauraceae)**. Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2006.

TIAN, H.; IP, L.; LUO, H.; CHANG, D. C.; LUO, K. Q. A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. **Br J Pharmacol**, v.150, n.3, p.321-34, 2007.

TJALMA, W.; DE CUYPER, E.; WEYLER, J.; VAN MARCK, E.; DE POOTER, C.; ALBERTYN, G.; VAN DAM, P. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. **Am J Obstet Gynecol**, v.178, n.1, p.113-117, 1998.

THOMAS, M.; BANKS, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-16 E6. **Oncogene**, v.17, p.2943-2954, 1998.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. **Science**, v.281, p.1312-1316, 1998.

TSAI, T. C.; CHEN, S. L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Arch Virol**, v.148, p.1445-1453, 2003.

TSAO, Y. P.; LI, L.Y.; TSAI, T. C.; CHEN, S. L. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. **J Virol**, v.70, n.11, p.7535-7539, 1996.

UM, S. J.; LEE, S. Y.; KIM, E. J.; MYOUNG, J.; NAMKOONG, S. E.; PARK, J. S. Down-regulation of human papillomavirus E6/E7 oncogene by arsenic trioxide in cervical carcinoma cells. **Cancer Lett**, v.181, n.1, p.11-22; 2002.

URREA-BULLA A.; SUAREZ M. M.; MORENO-MURILLO B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, v.75, p.392–394, 2004.

VALDESPINO GOMEZ, V. M.; VALDESPINO CASTILLO V. E. Current perspectives in cervical cancer. **Ginecol Obstet Mex**, v.72, n.1, p.29-38, 2004.

VAN HEERDE, W. L.; ROBERT-OFFERMAN, S.; DUMONT, E.; HOFSTRA, L.; DOEVENDANS, P. A.; SMITS, J. F.; DAEMEN, M. J.; REUTELINGSPERGER, C. P. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. **Cardiovasc Res**, v.45, n.3, p.549-559, 2000.

VELDMAN, T.; LIU, X.; YUAN, H.; SCHLEGEL, R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. **Proc Natl Acad Sci**, v.100, p.8211-8216, 2003.

WAGGONER, S. E. Cervical cancer. **Lancet**, v.361, n.9376, p.2217-2225, 2003.

WANG, Y.; MO, S.Y.; WANG, S. J.; LI, S.; YANG, Y. C.; SHI, J. G. A unique highly oxygenated pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione derivative with antioxidant and cytotoxic actives from the fungus *Phellinus igniarius*. **Org Lett**, v.7, p.1675-8, 2005.

WILSON, V.G.; WEST M.; WOYTEK, K.; RANGASAMY, D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes**, v.24, p.275-290, 2002.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **J Histochem Cytochem**, v.51, p.873–885, 2003.

YIM, E. K.; LEE, M. J.; LEE, K. H.; UM, S. J.; PARK, J. S. Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in cervical carcinoma cell line. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, p.2023-2031, 2006.

ZIMMERMANN, H.; DEGENKOLBE, R.; BERNARD, H. U.; O'CONNOR, M. J. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. **J Virol**, v.73, p.6209-6219, 1999.

ZHANG, S.; ONG. C. N.; SHEN, H. M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Lett**, v.211, n.2, p.175-188, 2004.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharm**, v.25, p.83-89, 2004.

ZHONG, L.; LI, C.; HAO, X.; LOU, L. Induction of leukemia cell apoptosis by cheliensisin A involves downregulation of Bcl-2 expression. **Acta Pharmacol Sin**, v.26, p.623-628, 2005.

ZUR HAUSEN, H. - Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.122, p.3-13, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.9, p.690-698, 2000.