

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E APOPTÓTICA DE NITENSIDINA A E B EM
CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL IMORTALIZADAS PELO PAPILOMA
VÍRUS HUMANO (HPV) E NÃO INFECTADAS**

Jamile Andrade Oliveira

Araraquara 2011

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Laboratório de Citologia e Biologia Celular

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E APOPTÓTICA DE NITENSIDINA A E B EM
CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL IMORTALIZADAS PELO PAPILOMA
VÍRUS HUMANO (HPV) E NÃO INFECTADAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientada: Jamile Andrade Oliveira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christiane Pienna Soares

Araraquara 2011

RESUMO

OLIVEIRA, J. A. **ATIVIDADE CITOTÓXICA E APOPTÓTICA DE NITENSIDINA A E B EM CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL IMORTALIZADAS PELO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) E NÃO INFECTADAS.** Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Campus de Araraquara, 2011.

Câncer cervical é o segundo tipo mais comum em mulheres no mundo. Estudos apontam que a presença de certos tipos do HPV desempenha um papel central na formação do câncer. Apesar do grande sucesso da prevenção do câncer uterino com vacinas, o uso de produtos naturais para o tratamento de doenças é crescente e de grande importância econômica. Alcalóides guanidínicos isolados de *Pterogyne nitens* representam uma potencial fonte de novos tratamentos. O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a atividade apoptótica induzida em células de carcinoma cervical infectadas (SiHa) e não infectadas pelo HPV (C33-A), tratadas com nitensidinas A e B, isoladas de folhas de *Pterogyne nitens* Tul. A citotoxicidade dos alcalóides foi avaliada utilizando o método de MTT. Para avaliar quantitativamente a apoptose e necrose celular, foi executado o ensaio de Anexina V por citometria de fluxo. Ambas as substâncias, nitensidinas A e B, apresentaram efeito citotóxico concentração-resposta em ambas as linhagens testadas (SiHa e C33A) e nos dois tempos de tratamento (24 horas e 48 horas). Não foi observada significância estatística quando comparados os perfis de ação citotóxica das duas substâncias em teste (nitensidinas A e B), em nenhuma das linhagens testadas (SiHa e C33A) e em nenhum dos dois tempos de tratamento (24 horas e 48 horas). Ambas as substâncias, nitensidina A e nitensidina B, apresentaram efeito indutor de apoptose precoce e, em menor número, de apoptose tardia/ necrose, em ambas as linhagens testadas (SiHa e C33A) e nos dois tempos de tratamento (24 horas e 48 horas).

Palavras-chave: HPV, citotoxicidade, apoptose, alcalóides guanidínicos.

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão a todos aqueles que de alguma forma deram algo de si, voluntária ou involuntariamente, como contribuição ao longo dessa jornada pessoal. Foram lições, conselhos, conversas, lembranças, presenças, ausências, olhares, vibrações, torcidas, mãos e ombros amigos, e tantas outras formas de suporte e auxílio, sem as quais a caminhada seria muito mais árdua, ou talvez nem mesmo tivesse existido.

Aos meus pais, Salvador e Irene, pelo amor incondicional, suporte infinito e esforços imensuráveis. Vocês são o porquê e a razão de tudo.

À minha irmã, Verissa, por me ensinar tanto desde sempre e para sempre.

À toda minha família, que mesmo distante nunca mediu torcidas e pensamentos positivos. Obrigada por desejarem com tanta força e fé o meu sucesso.

A todos os meus amigos, de todas as épocas e de todos os lugares, por serem tão bons companheiros e por nunca me negarem qualquer tipo de apoio. Tenho certeza que os melhores amigos do mundo são os meus.

À minha família araraquarense, Beatriz, Fabiana, Raisa e Thaisa, pela convivência e amizade durante todos esses anos, por serem meu lar e meu refúgio.

A todos os meus amigos de Araraquara, por terem me proporcionado momentos indescritíveis, por serem tão incríveis e por terem escrito comigo essas páginas inacreditáveis desse capítulo do meu livro chamado “Terra do Nunca”. Somos testemunhas uns dos outros de que tudo que vivemos não foi só um sonho.

Ao meu querido Igor, pelo carinho, cumplicidade e companheirismo de todos os dias.

A todos os integrantes do Laboratório de Citologia e Biologia Celular da FCFar-UNESP, pelas lições de trabalho e de vida, e pela imensa contribuição para o meu crescimento

intelectual, pessoal e profissional. Em especial, à Juliana Sorbo, pelo companheirismo, amizade, carinho e suporte sem igual; ao Mauro Cafundó, pela paciência e por compartilhar seu conhecimento; à Izabel Feliciano, pelo auxílio, companhia e afeto; e à minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a Christiane Pienna Soares por me acolher, me ajudar, me ensinar, pela paciência e pelo suporte, e por ser esse ser humano tão terno, adorável e, acima de tudo, admirável. Muito obrigada. Esse trabalho é de todos nós.

Aos laboratórios parceiros da FCFar-UNESP, em especial ao Laboratório de Micologia da Prof.^a Dr.^a Maria José Giannini, e ao Laboratório de Imunologia Clínica da Prof.^a Dr.^a Iracilda Carlos, pelo apoio nas dificuldades e imensa colaboração.

Ao laboratório de Citometria de Fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - RP, pela parceria e ajuda nas análises de citometria de fluxo. Meu muito obrigada à Fabiana de Moraes por disponibilizar seu tempo e sua paciência em prol do nosso trabalho.

À Deus, pelo dom da vida, pela saúde, pelas oportunidades, por aqueles que me cercam, e pela coragem para fazer tudo acontecer.

Infinitas vezes e eternamente, muito obrigada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula Estrutural de nitensidina A e B.....	16
Figura 2: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidina A e B (MTT). Comparação entre substâncias (nitensidina A e nitensidina B) - Linhagem SiHa.	21
Figura 3: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidina A e B (MTT). Comparação entre substâncias (nitensidina A e nitensidina B) - Linhagem C33A.....	22
Figura 4: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidina A e B (MTT). Comparação entre tempos de tratamento - Linhagem SiHa.	23
Figura 5: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidina A e B (MTT). Comparação entre tempos de tratamento - Linhagem C33A.....	24
Figura 6: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidina A e B (MTT). Comparação entre substâncias - 24 horas.....	25
Figura 7: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidina A e B (MTT). Comparação entre substâncias - 48 horas.....	26
Figura 8: Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem SiHa - nitensidina A	28
Figura 9: Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem SiHa - nitensidina B.....	29
Figura 10: Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem C33A - nitensidina A.....	30
Figura 11: Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem C33A - nitensidina B	31

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	9
1.1 – Câncer Cervical.....	9
1.2 – O Papilomavirus Humano (HPV).....	10
1.3 – Morte Celular – Apoptose e Necrose.....	12
1.4 – Apoptose e Anexina V.....	13
1.5 – Alcalóides e a Terapia do Câncer.....	13
2 – OBJETIVO GERAL.....	14
2.1 – Objetivos específicos.....	14
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 – Obtenção de nitensidina A e B das folhas de <i>Pterogyne nitens</i> Tulasne (Fabaceae-Caesalpinioideae).....	15
3.2 – Cultura de células.....	16
3.3 – Citotoxicidade (MTT).....	17
3.3.1 – Ensaio de MTT.....	17
3.3.2 – Tratamento das células.....	18
3.4 – Ensaio de Apoptose (Anexina V).....	18
3.5 – Controles.....	19
3.6 – Análise Estatística.....	19
4 – RESULTADOS.....	19
4.1 – Citotoxicidade.....	19
4.2 – Ensaio de Anexina V.....	26
5 – DISCUSSÃO.....	32
6 – CONCLUSÕES.....	37
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

*“Ame muitas coisas, porque em amar está a verdadeira força.
Quem ama muito conquistará muito, e o que for feito com amor estará bem feito.”*

Vincent Van Gogh

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Câncer Cervical

No mundo, cerca de 6 milhões de pessoas morrem anualmente por causa do câncer. Nos países em desenvolvimento, aproximadamente 25% dos casos de câncer são causados por infecções crônicas, como é o caso do papiloma vírus humano (HPV) (STEWART *et al*, 2003).

Câncer cervical é o segundo tipo mais comum em mulheres no mundo, com uma incidência de 500 mil novos casos diagnosticados todos os anos, e causa a morte de 230 mil mulheres anualmente. Além disso, é bastante comum nos países em desenvolvimento devido sua etiologia viral (INCA, 2010; STEWART *et al*, 2003). A estimativa para o Brasil é de 18.430 novos casos em 2010, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o mais incidente na Região Norte (23/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000), ocupa a segunda posição mais frequente e nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (16/100.000), a terceira posição (INCA, 2010).

Estudos apontam que a presença de certos tipos do HPV desempenham um papel central na formação do câncer. O DNA do vírus está presente em praticamente todos os cânceres cervicais, e a função de interação entre o vírus e a célula hospedeira vem sendo bem estudada (MOTOYAMA *et al*, 2004; ZUR HAUSEN, 2002). Além do tipo de vírus e a carga viral da infecção, outros fatores de risco estão envolvidos na formação do câncer; como tabagismo, múltiplos parceiros sexuais, grande quantidade de gravidez, uso prolongado de contraceptivos orais (estrogênios), imunossupressão, predisposição genética e infecções mutagênicas (DELVENNE *et al*, 2007).

O exame de Papanicolau representa a forma mais simples para a detecção do câncer de colo de útero e ainda é muito usado no controle da doença. Métodos moleculares de

rastreamento do DNA do HPV têm se demonstrado bastante eficazes no diagnóstico e controle da doença (INCA, 2010; ZUR HAUSEN, 2002). Além disso, novos marcadores moleculares vem sendo encontrados e também métodos para tornar o diagnóstico laboratorial mais preciso, eficaz e com menor custo (DOORBAR *et al*, 2005).

1.2 – O Papilomavirus Humano (HPV)

O HPV é um vírus de DNA, da família Papovaviridae. As partículas virais possuem capsídeo protéico de padrão icosaédrico, com 55 nm de diâmetro. Dentro do capsídeo, o DNA se apresenta circular dupla fita (ZUR HAUSEN, 2002). O genoma viral é dividido em três regiões gênicas, diferenciadas de acordo com os genes que são codificados em cada região. A região precoce (ou E, de *early*), com 7 a 8 genes funcionais, a região tardia (ou L, de *late*) que codifica as duas proteínas estruturais do capsídeo e uma região regulatória, não-codificadora, conhecida como LCR (*long control region*) ou URR (*upstream regulatory region*).

O tamanho relativamente pequeno do genoma do HPV, com cerca de 7.500 a 8.000 pares de bases (pb), permite uma análise de cada gene e a interação das proteínas virais com a célula hospedeira. Os genes precoces formam 60% do genoma viral, sendo responsáveis pela replicação do DNA (gene *E1*), controle de transcrição (gene *E2*), maturação do vírus e alteração matriz e citoesqueleto celular (gene *E4*), bem como no estímulo da proliferação e manutenção da transformação celular (genes *E5*, *E6* e *E7*). Os genes da região tardia, *L1* e *L2*, formam 40% do genoma viral e constituem de sequências altamente conservadas em todos os Papilomavírus. Esses genes codificam proteínas do capsídeo viral que são responsáveis por sua antigenicidade, a principal proteína L1, de 54 KiloDaltons (KDa) e a proteína secundária L2, com 52 KDa.

As proteínas virais E6 e E7 apresentam função de estimular a progressão do ciclo celular ao se associarem com proteínas reguladoras do ciclo celular hospedeiro. A proteína E7

associa-se com pRb, um regulador negativo do ciclo celular que normalmente previne a progressão da fase G1 para a fase S por se associar ao fator de transcrição E2F. Ao se ligar à proteína E7, pRb é degradada liberando E2F, a qual estimulará a transcrição de genes alvos associados a replicação do DNA, resultando na proliferação celular desordenada (MOTOYAMA et al., 2004; ZUR HAUSEN, 2002).

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 (DOORBAR et al, 2005). A associação da proteína E6 dos tipos de HPV de alto risco, com a proteína p53 da célula hospedeira resulta na degradação da p53, comprometendo a interrupção do crescimento celular e a ativação da apoptose induzida por erros no DNA genômico. A perda do controle do ciclo celular mediado por p53 favorece a instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações na célula infectada (DOORBAR et al, 2005).

O HPV tem afinidade por células epiteliais da pele e mucosas, Dependendo do tipo de vírus, pode causar proliferação benigna ou maligna. Os diferentes tipos de HPV são definidos como tendo mais de 10% de diferença em regiões específicas do seu genoma. Portanto, determinados tipos virais com diferentes formas de interação determinam, em conjunto, o potencial oncogênico do vírus. A infecção de pele e mucosas pelo HPV ocorre por meio de microlesões existentes na camada basal do tecido (ZUR HAUSEN, 2002). Nos tumores de células escamosas, 68% dos tipos virais encontrados são HPV 16 e em células de adenocarcinoma e adenoescamosas, 71% dos tipos virais são HPV 18. Segundo estudos clínicos, epidemiológicos e imunológicos, os tipos de HPV são classificados, segundo seu potencial oncogênico, em baixo risco (HPV 6, 11) e alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e outros) (MOTOYAMA et al., 2004). Os novos estudos estão direcionados na compreensão da

interação entre o HPV e a célula hospedeira, mostrando como a pesquisa básica pode contribuir para prevenção do câncer (ZUR HAUSEN, 2002).

1.3 – Morte Celular – Apoptose e Necrose

A apoptose é uma forma de morte celular rigorosamente controlada, que complementa a mitose e o crescimento celular. É desencadeada por excesso ou falta de estímulos de crescimento celular, proliferação e até mesmo dano celular. Portanto, a apoptose é de fundamental importância para o controle do crescimento de órgãos e tecidos e na manutenção da vida (BRAS et al, 2004). A perda no controle dos mecanismos de apoptose na célula é uma das causas do aparecimento do câncer (BOERSMA et al, 2005).

Existem diversas classificações para o processo de morte celular programada. A maioria delas envolve observação da célula quanto ao fenótipo nuclear, organização do citoesqueleto, alteração de organelas e composição bioquímica celular.

A célula em apoptose caracteriza-se por uma diminuição no tamanho, fragmentação do DNA e condensação da cromatina, levando ao aparecimento de núcleo picnótico, formação de vacúolos autofágicos, dilatação de organelas citoplasmáticas como mitocôndria e complexo de Golgi. Isso demonstra que a mitocôndria está ligada em coordenar os sinais de morte celular. Por fim, ocorre uma desintegração controlada da membrana formando os corpos apoptóticos (BRAS et al, 2004).

Por outro lado, a necrose é o processo causado por um estímulo intenso que resulta na perda de controle por parte da célula, rápida interrupção dos processos de manutenção da integridade celular, rompimento da membrana plasmática, destruição do citoplasma e, como consequência final, a morte celular (BRAS et al, 2004).

1.4 – Apoptose e Anexina V

A apoptose também é acompanhada de perda de simetria da membrana e exposição de fosfatidilserina da face intracelular para a superfície celular. A expressão de fosfatidilserina na superfície da célula tem um papel fundamental no sistema imunológico responsável pelo reconhecimento e remoção das células apoptóticas pelos macrófagos e sua apresentação pela célula coincide com a condensação da cromatina durante a morte celular programada (MUNOZ *et al*, 2007).

As anexinas fazem parte de uma família de proteínas que possuem a habilidade de se ligarem a fosfolípidos de membrana na presença de Ca^{2+} . A anexina V é um ligante altamente específico a fosfatidilserina e de ocorrência natural (MUNOZ *et al*, 2007). Portanto, a expressão de fosfatidilserina em células apoptóticas pode ser medida *in vitro* com anexina V conjugada com fluorocromo (VAN GENDEREN *et al*, 2006). A medição da anexina V deve ser feita em conjunto com um corante de exclusão, usado para marcar a integridade da membrana e permitir a diferenciação entre células em apoptose ou necrose. O ensaio de anexina V apresenta a vantagem de ser um teste sensível, de fácil execução, boa correlação clínica e avaliação da eficácia do tratamento, além de oferecer a possibilidade de detectar as fases iniciais da apoptose (VAN GENDEREN *et al*, 2006).

1.5 – Alcalóides e a Terapia do Câncer

Apesar do grande sucesso da prevenção do câncer uterino com vacinas (VILLA, 2007), o uso de produtos naturais para o tratamento de doenças é crescente e de grande importância econômica. O mercado mundial de medicamentos derivados de produtos naturais movimentada cerca de US\$ 22 bilhões por ano. A balança comercial brasileira é altamente deficitária neste item. O país exporta cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais de alcaçuz, alóes, bardana, catuaba, ipeca e quina. Por outro lado, importa uma quantidade considerável

medicamentos e produtos diversos provenientes de fontes naturais, um verdadeiro contrasenso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta (FERNANDES; ANTUNES, 2000). A diversidade da flora brasileira apresenta uma importante fonte de princípios ativos. Os gastos do Brasil com a importação de matéria prima de medicamentos supera a marca dos 3 bilhões de dólares. Essa dependência externa pode ser superada com a pesquisa e busca de princípios ativos naturais na flora brasileira (VARANDA, 2006).

Alcalóides guanidínicos são encontrados nas famílias Euphorbiaceae e Fabaceae e por isso também apresentam importância taxonômica. Estudos realizados anteriormente revelaram que alcalóides guanidínicos apresentaram moderada citotoxicidade em células do ovário de hamster chineses (CHO-Aux-B1) (BOLZANI et al, 1995).

2 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade apoptótica induzida em células de carcinoma cervical infectadas e não infectadas pelo HPV, tratadas com nitensidina A e B, isoladas de *Pterogyne nitens* Tul.

2.1 – Objetivos específicos

1. Avaliar a citotoxicidade celular utilizando o método de MTT, em linhagens epiteliais de adenocarcinoma cervical transformadas pelo HPV-16 (SiHa) e não transformadas pelo HPV (C33-A), utilizando alcalóides extraídos da planta *Pterogyne nitens* (nitensidinas A e B) nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas.
2. Avaliar quantitativamente a apoptose e necrose celular, utilizando o ensaio de anexina V, por citometria de fluxo, em linhagens celulares epiteliais de adenocarcinoma cervical transformadas pelo HPV-16 (SiHa) e não transformadas pelo HPV (C33-A),

utilizando diferentes concentrações de alcalóides extraídos de *Pterogyne nitens* (nitensidinas A e B) nos tempos de tratamento de 24 e 48 horas.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Obtenção de nitensidina A e B das folhas de *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae-Caesalpinioideae)

O processo de obtenção dos alcalóides guanidínicos, nitensidina A e B, foi realizado nas dependências do NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) sob supervisão do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini.

As folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae) foram coletadas no Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil, entre os meses de abril e maio de 2003, pela Dra. Maria Cláudia Marx Young e identificado como sendo *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae) pela Dra. Inês Cordeiro do mesmo instituto. Uma exsicata (SP204319) encontra-se depositada no herbário “Maria Eneida P. Kaufmann” do Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil.

O material botânico foi seco à temperatura ambiente e então submetido à moagem empregando moinho de facas. O pó obtido foi levado à maceração empregando hexanos e com posterior maceração em etanol. O extrato etanólico foi dissolvido em mistura metanol:água (7:3) e seguido de partição líquido-líquido empregando-se acetato de etila e posteriormente *n*-butanol, obtendo-se três frações.

A fração *n*-butanólica foi acidificada com CH₃SO₃H aquoso (25 %) e levada à partição líquido-líquido em CHCl₃. A fração clorofórmica foi descartada e a fração aquosa foi tratada

com NH_4OH até pH 7 e novamente submetida à partição líquido-líquido em CHCl_3 . A presente fração clorofórmica foi evaporada, obtendo-se a fração alcaloídica.

A fração alcaloídica foi cromatografada por sucessivas colunas de gel de sílica, eluídas em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (100 a 75 %), obtendo-se os metanossulfonatos de nitensidina A e B, os quais tiveram sua estrutura molecular identificada por técnicas espectroscópica, tais como RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . (Figura 1).

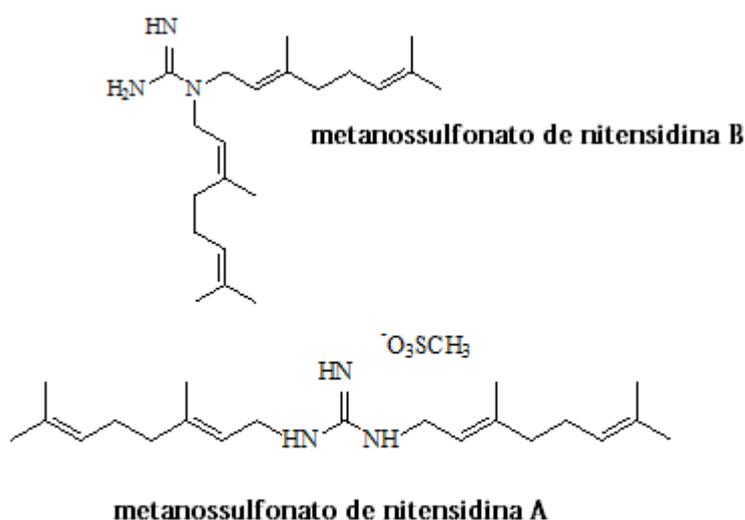


Figura 1: Fórmula Estrutural de nitensidina A e B

3.2 – Cultura de células

Nos ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens celulares epiteliais de adenocarcinoma cervical transformadas pelo HPV-16 (SiHa) e não transformadas pelo HPV (C33-A), cedidas pela Dra. Luiza Lina Villa, do Laboratório de Virologia, Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer. As células foram cultivadas em garrafas para cultura com mistura de meio DMEM e Ham's F10 1:1 (Sigma Co., St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas-SP, Brasil) e antibióticos penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B, 0,2mg/mL de ciprofloxacina, 0,1

mg/mL de kanamicina (Sigma), para se evitar contaminação microbiana. O crescimento celular aconteceu em garrafas na estufa com 5% de CO₂ a 37 °C até que a monocamada celular estivesse confluenta. Depois disso, as células foram lavadas com 2 mL 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. 1000 mL) e colhidas adicionando-se 1 mL de tripsina (Solução de tripsina (0,05%) em PBS – GBICO). Então, 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. O procedimento foi repetido até se obter quantidade de células suficientes para os experimentos.

3.3 – Citotoxicidade (MTT)

3.3.1 – Ensaio de MTT

Por meio do ensaio de metil-tiazol-tetrazolio (MTT) podemos determinar a atividade metabólica da mitocôndria e correlacionar com as células viáveis após tratamento com o agente quimioterápico. Trata-se de um ensaio colorimétrico baseado na capacidade das células viáveis reduzir o sal de MTT, por ação da succinato desidrogenase mitocondrial, e formar cristais de azul de formazana (MOSMANN, 1983). Este método apresenta a vantagem de ser um teste rápido, de fácil execução e boa correlação clínica, pois permite a determinação da CI₅₀ e citotoxicidade de substâncias em fase de avaliação (LÉON et al, 2006; ZHANG et al, 2004; KAWADA et al, 2002). Após o período de tratamento (descrito a seguir), descarta-se o meio de cultura da placa e coloca-se 10 µL de MTT a 5 mg/mL em cada poço. Incuba-se a placa por mais 3 horas nas mesmas condições de cultivo para ocorrer redução do sal. Depois é feita a leitura com comprimento de onda a 540 nm em leitor de placas ELISA. Foram feitos três ensaios independentes para cada linhagem celular, cada tempo de tratamento (24 e 48 horas), e para cada substância (nitensidinas A e B) a fim de se obter valores estatísticos significantes. Estimou-se a porcentagem de células vivas através da fórmula:

$$\text{Cels. Vivas (\%)} = [A_{540} (\text{Nitensidina})] / [A_{540} (\text{Cont. Negativo})] \times 100$$

Onde A_{540} (*Cont. Negativo*) é a média da absorvância dos poços com controle negativo e A_{540} (*nitensidina*) é a média da absorvância dos poços com o composto testado. Assim, com o gráfico obtido da relação da concentração testada e da porcentagem de células vivas fez-se a estimativa da concentração inibitória 50% (CI_{50}).

3.3.2 – Tratamento das células

Foi cultivada uma suspensão de células contendo cerca de 1×10^4 células/mL em cada pocinho da placa com 96 poços. Após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com as nitensidinas A e B.

Foram feitas diluições dos compostos em meio de cultura de células para que fossem obtidas concentrações de 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g/mL}$ usadas no tratamento por 24 e 48 horas. Como controle positivo, utilizou-se doxorrubicina 50 $\mu\text{g/mL}$, controle de veículo com meio de cultura contendo 1 de DMSO e o controle negativo é meio de cultura sem tratamento.

3.4 – Ensaio de Apoptose (Anexina V)

Cerca de 1×10^5 células/poço foram cultivadas em placas de 12 poços por 24 horas para a formação da monocamada confluenta. Depois do crescimento, as células foram tratadas com as nitensidinas A e B em pontos próximos obtidos na concentração inibitória 50% (CI_{50}), dois pontos acima e dois pontos abaixo, resultando em tratamento com as mesmas concentrações do ensaio de citotoxicidade (0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e lavadas com meio de cultura. Em seguida, foram centrifugadas três vezes e lavadas com PBS. Após a lavagem, foram ressuspensas em 500 μL tampão de ligação, 5 μL de anexina conjugada com FITC e 5 μL de iodeto de propídio (kit anexina V, Aléxis, Lausen, Switzerland), e a reação foi

incubada por 5 minutos em temperatura ambiente sob o abrigo da luz. A intensidade de fluorescência (FITC e iodeto de propídio) foi avaliada em equipamento de citometria de fluxo FACScalibur (Becton Dickson, USA). As células em apoptose precoce foram marcadas somente por anexina V. Como nas células em apoptose tardia também ocorre o rompimento da membrana e a marcação com anexina V (PEC et al, 2003), assim como na necrose, as células com dupla marcação resultante da permeabilidade da membrana foram classificadas como apoptose tardia / necrose.

3.5 – Controles

Para cada ensaio (MTT e anexina V) foram incluídos um controle positivo (linhagem tratada com doxorrubicina diluída em meio DMEM na concentração de 50 µg/mL), um controle negativo (linhagem celular não tratada) e um controle de veículo (DMSO 1%)

3.6 – Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade (MTT) e anexina V, foi aplicado o teste paramétrico *one way* ANOVA com pós-teste de Tukey através do software Graph Pad Prisma versão 5.01, 2007. Em todas as análises estatísticas foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Citotoxicidade

O ensaio foi realizado através da técnica de MTT com cinco diferentes concentrações (0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 µg/mL) de cada uma das duas substâncias (nitensidina A e nitensidina B), nas duas linhagens propostas (SiHa e C33A) e em dois tempos de tratamento (24 e 48 horas). Para determinação do CI_{50} foram feitas linhas de tendência lineares e, através das equações das retas obtidas, os valores foram definidos.

Foi possível observar um aumento da citotoxicidade proporcionalmente ao aumento da concentração (efeito concentração-resposta) de ambas as substâncias testadas na linhagem SiHa (Figura 2 e Figura 3), onde na maior concentração houve menor porcentagem de células vivas, ou seja, maior taxa de morte celular, em ambos os tempos. Já nas menores concentrações as porcentagens de morte celular são baixas e com pouca variação entre elas, evidenciando um baixo poder citotóxico das substâncias nessas concentrações.

Houve um aumento da citotoxicidade com o aumento do tempo de tratamento na maior concentração (20 µg/mL) para ambas as substâncias. Na análise estatística não foi observada significância quando se comparou a nitensidina A com a nitensidina B.

Os resultados obtidos para a linhagem C33A são bastante semelhantes aos obtidos com a linhagem SiHa, e assim a análise estatística não evidenciou significância quando comparadas as duas linhagens.

Com a C33A foi possível observar o efeito concentração-resposta de ambas as substâncias (Figura 5 e Figura 6), assim como um efeito tempo-resposta. Na maior concentração (20 µg/mL) houve a maior taxa de morte celular e nas menores concentrações as taxas de morte foram baixas e variaram pouco. Tampouco foi observada significância quando comparada nitensidina A com nitensidina B.

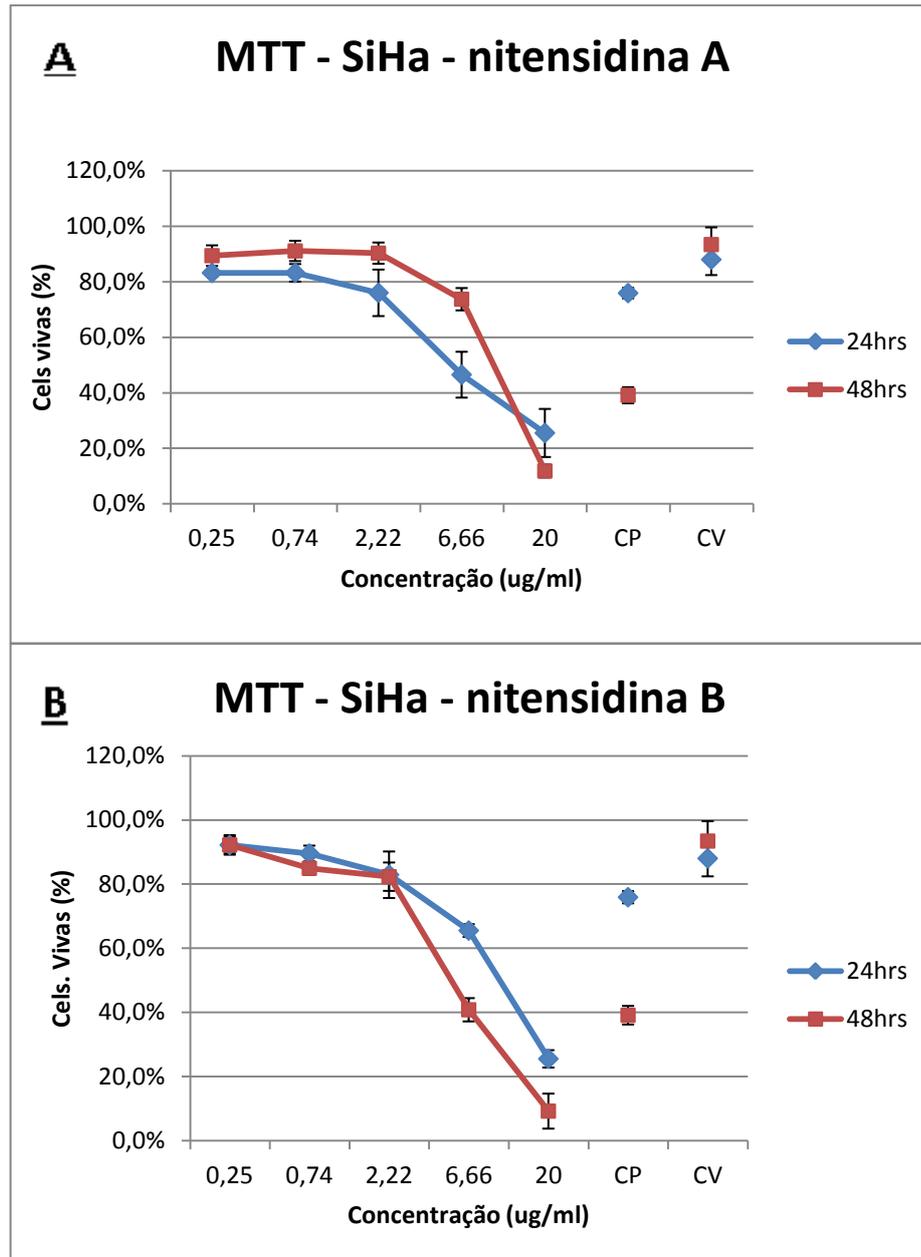


Figura 2: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidinas A e B (MTT). Comparação entre substâncias. Porcentagem de células mortas na linhagem SiHa tratadas com nitensidina A (A) e nitensidina B (B) nas concentrações de 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g/mL}$ em dois tempos de tratamento (24 e 48 horas). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). A) CI_{50} nitensidina A - 24 horas: 10,31 $\mu\text{g/mL}$ ($y = -0,0297x + 0,8065$); CI_{50} nitensidina A - 48 horas: 11,17 $\mu\text{g/mL}$ ($y = -0,0409x + 0,9572$). B) CI_{50} nitensidina B - 24 horas: 12,32 $\mu\text{g/mL}$ ($y = -0,0333x + 0,9103$); CI_{50} nitensidina B - 48 horas: 8,84 $\mu\text{g/mL}$ ($y = -0,0414x + 0,8662$). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

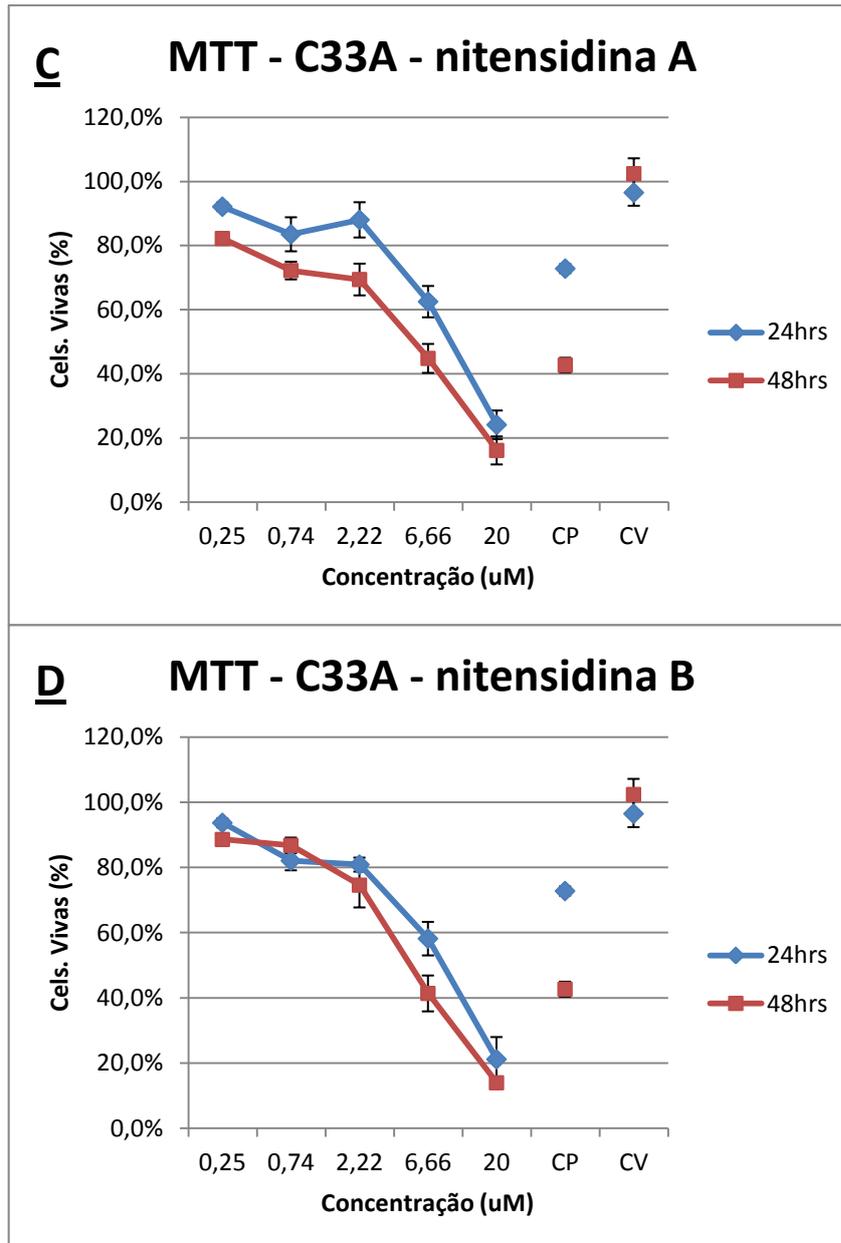


Figura 3: Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidinas A e B (MTT). Comparação entre substâncias. Porcentagem de células mortas na linhagem C33A tratadas com nitensidina A (C) e nitensidina B (D) nas concentrações de 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em dois tempos de tratamento (24 e 48 horas). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). A) CI_{50} nitensidina A - 24 horas: 11,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = -0,0337x + 0,9015$); CI_{50} nitensidina A - 48 horas: 8,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = -0,0314x + 0,757$). B) CI_{50} nitensidina B - 24 horas: 10,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = -0,0344x + 0,8774$); CI_{50} nitensidina B - 48 horas: 8,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = -0,0375x + 0,8346$). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

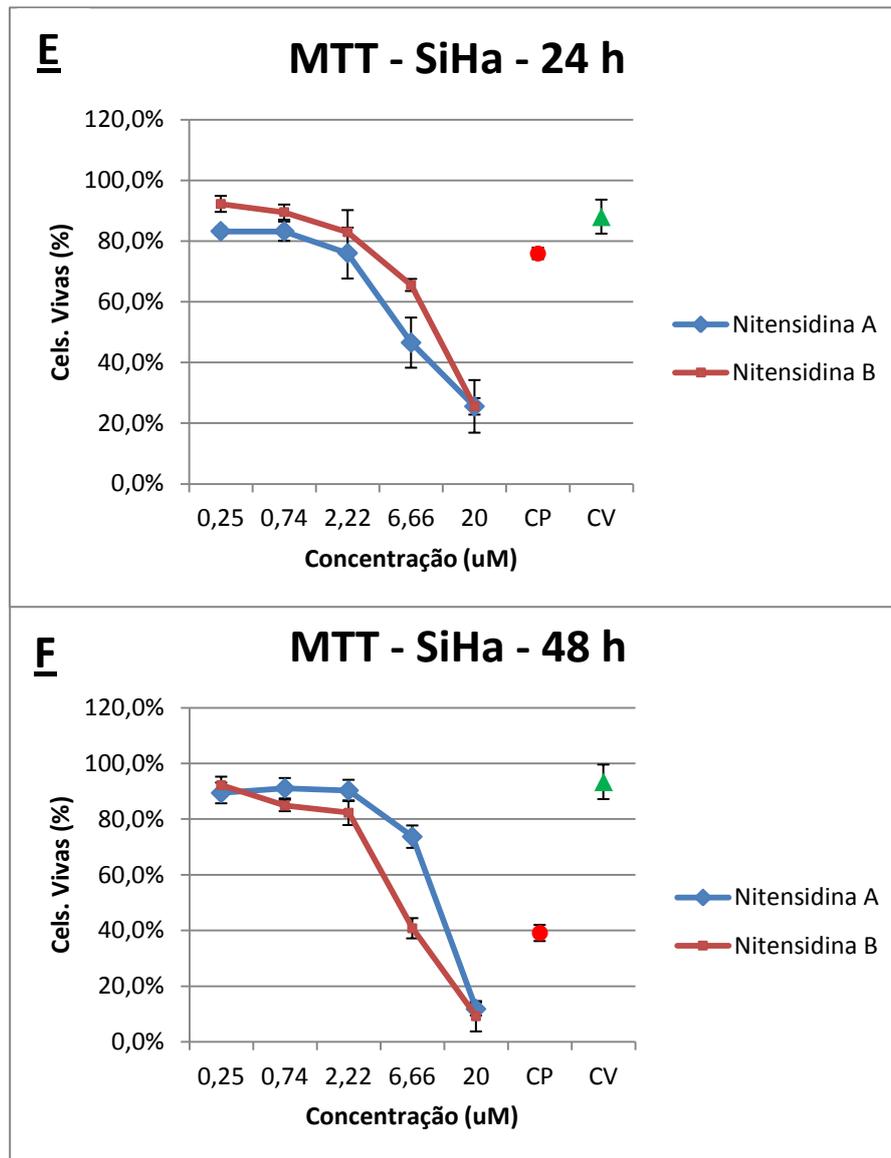


Figura 4 - Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidinas A e B (MTT). Comparação entre tempos de tratamento. Porcentagem de células mortas na linhagem SiHa tratadas com nitensidina A e nitensidina B nas concentrações de 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g/mL}$ nos tempos de tratamento de 24 horas (E) e 48 horas (F). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey

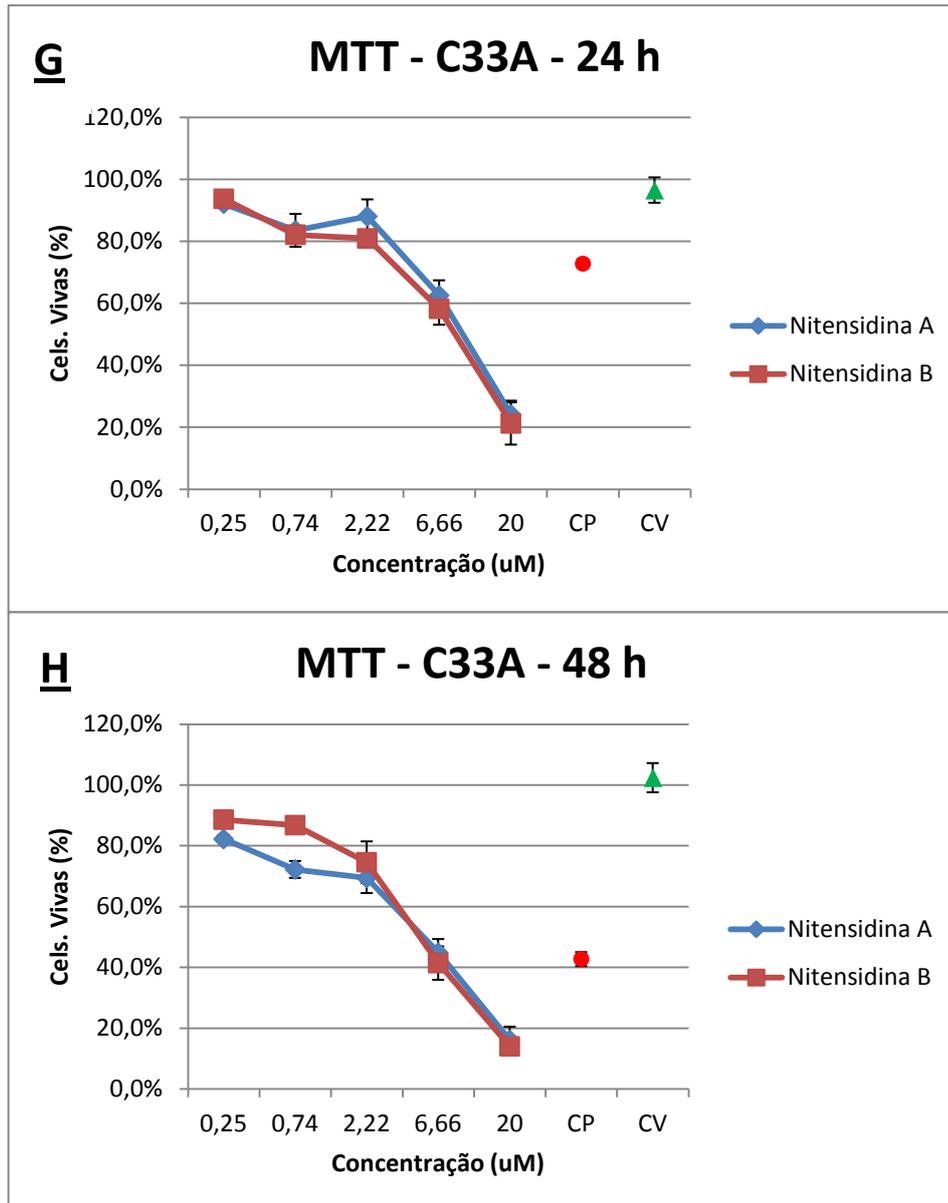


Figura 5 - Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidinas A e B (MTT). Comparação entre tempos de tratamento. Porcentagem de células mortas na linhagem C33A tratadas com nitensidina A e nitensidina B nas concentrações de 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nos tempos de tratamento de 24 horas (G) e 48 horas (H). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

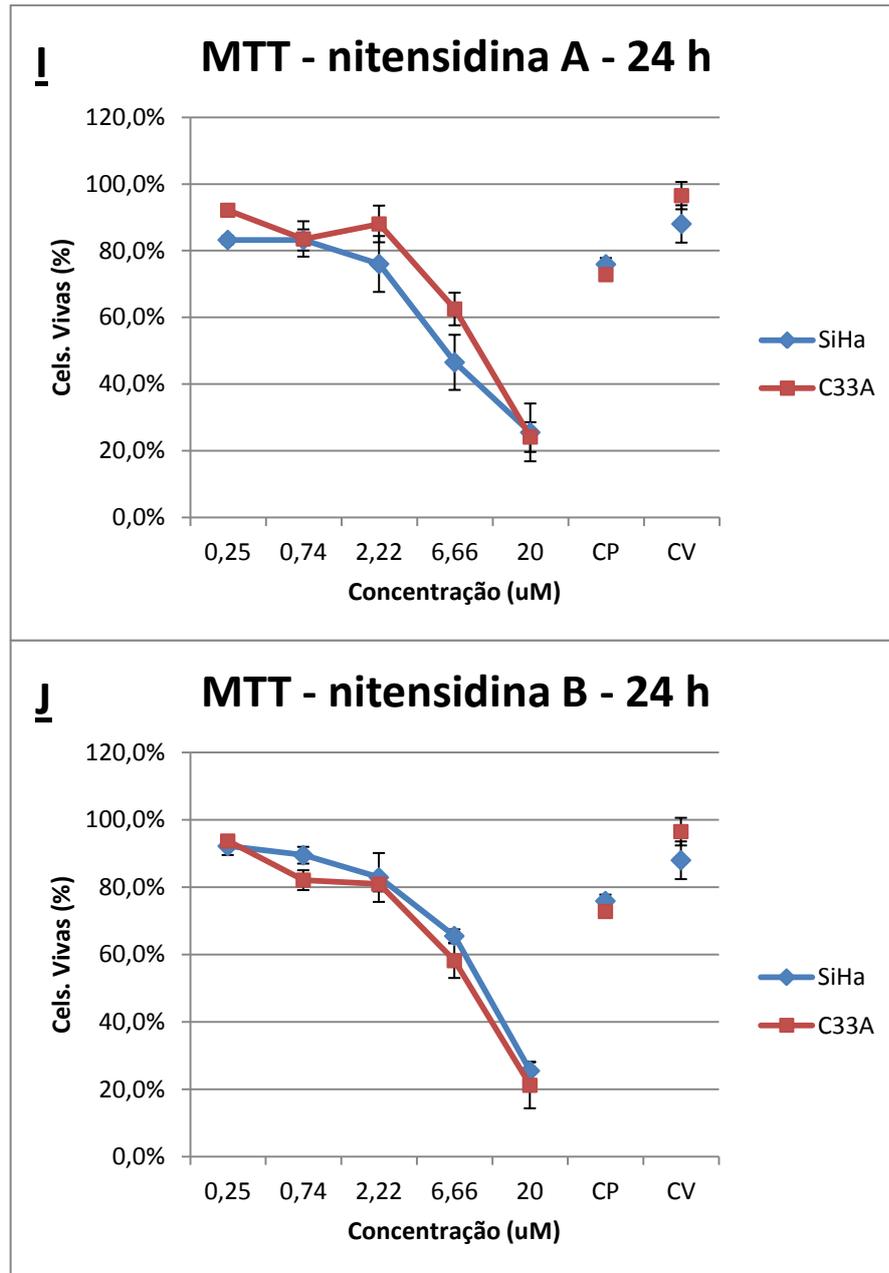


Figura 6 - Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidinas A e B (MTT). Comparação entre substâncias. Porcentagem de células mortas nas linhagens SiHa e C33A tratadas com nitensidina A (I) e nitensidina B (J) nas concentrações de 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

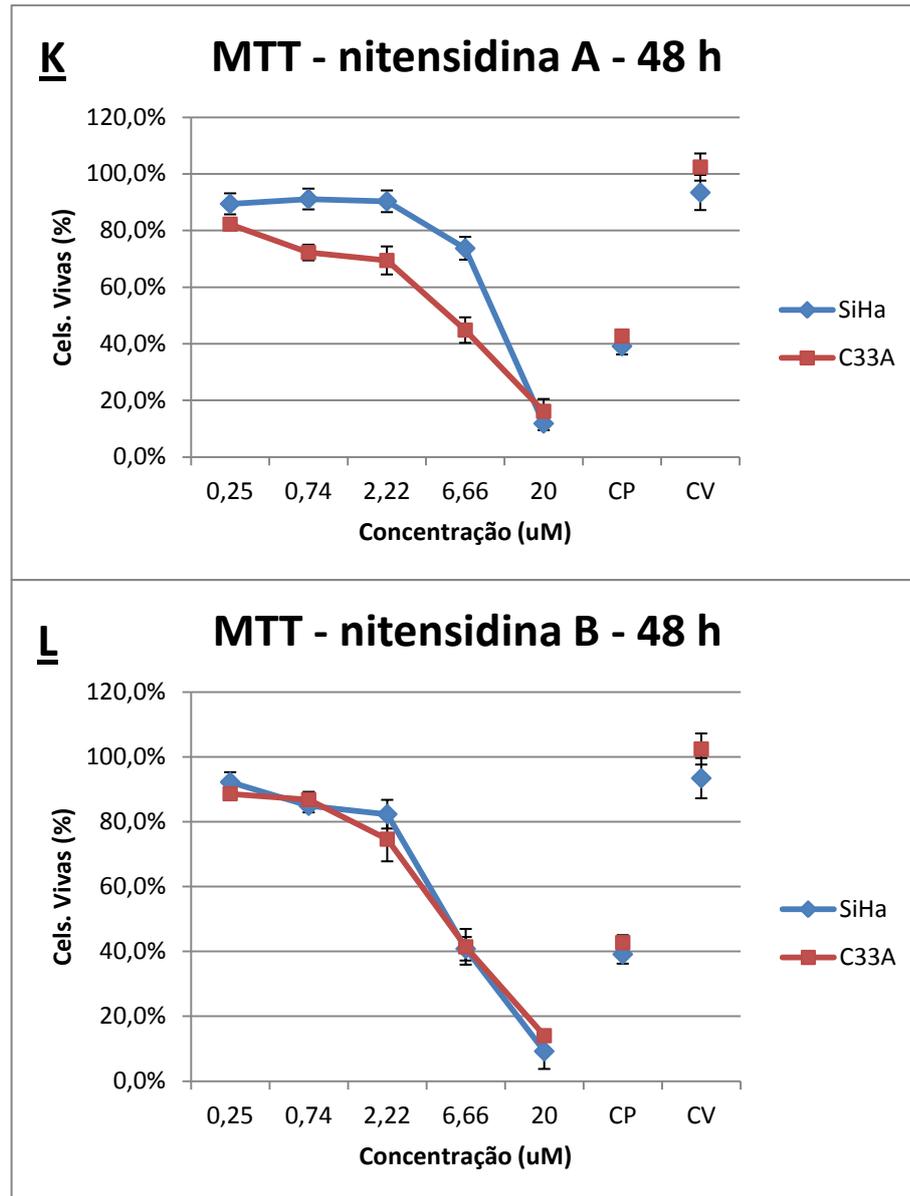


Figura 7 - Ensaio de citotoxicidade utilizando nitensidinas A e B (MTT). Comparação entre substâncias. Porcentagem de células mortas nas linhagens SiHa e C33A tratadas com nitensidina A (K) e nitensidina B (L) nas concentrações de 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ($M \pm EP$). CP (controle positivo) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

4.2 – Ensaio de anexina V

Com o intuito de avaliar o potencial efeito indutor de apoptose das nitensidinas A e B, foi realizado o ensaio de anexina V por citometria de fluxo nas duas linhagens (SiHa e C33A)

tratadas com 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de ambas as nitensidinas (A e B). Para a realização do experimento, as células foram tratadas por 24 horas e 48 horas.

Na linhagem SiHa (Figura 9 e Figura 10) foi possível observar uma elevada indução de mortes por apoptose precoce, uma morte menos devastadora, nos tratamentos com 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 $\mu\text{g/mL}$ de ambas as nitensidinas, e em ambos os tempos. Na maior concentração do tratamento, 20 $\mu\text{g/mL}$, é possível observar uma menor taxa de morte – mas ainda assim elevada – por apoptose precoce, e um maior número de mortes ocorridas via apoptose tardia/necrose. Não houve significância estatística quando comparadas as duas substâncias e os dois tempos de tratamento.

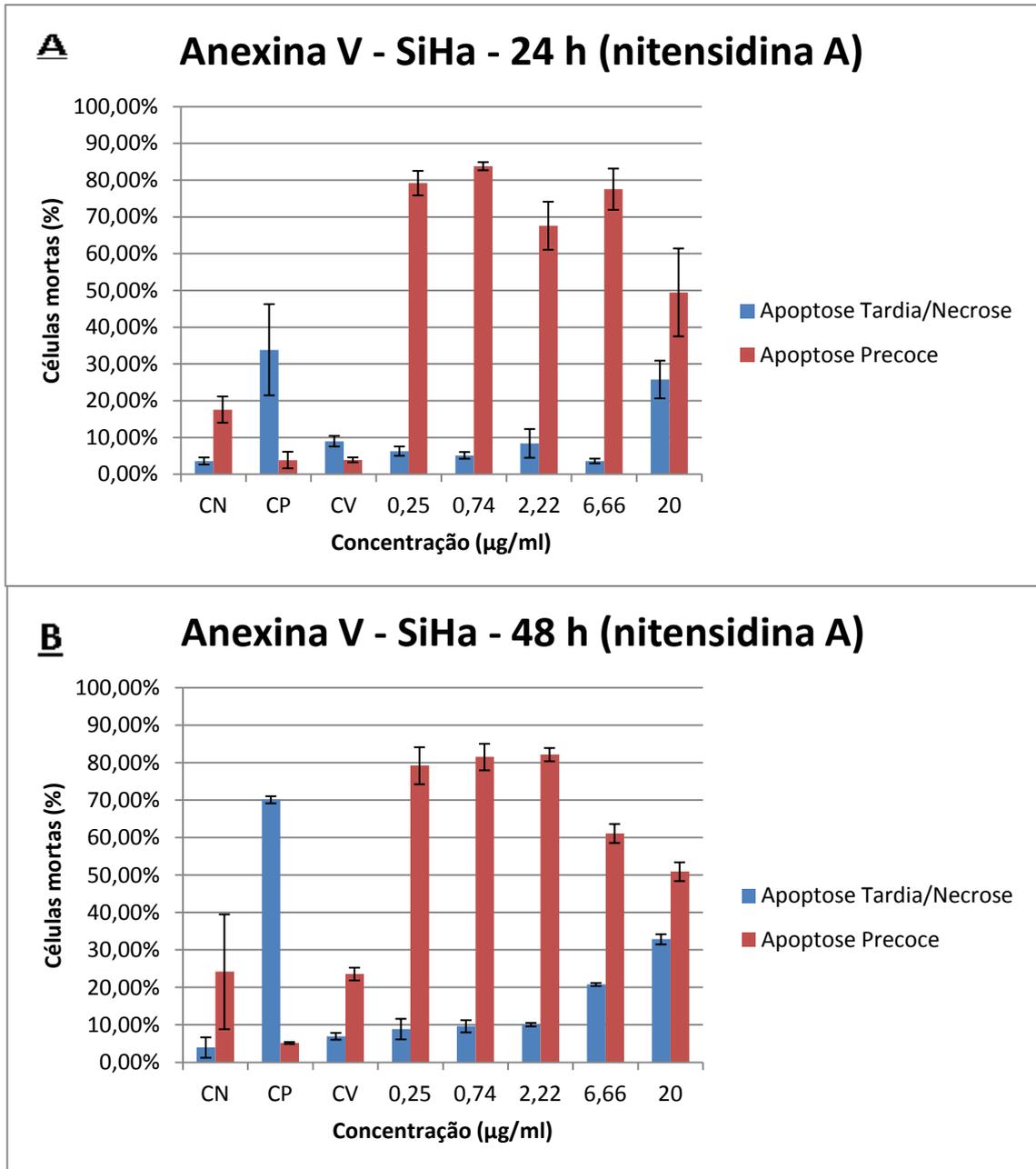


Figura 8 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem SiHa tratada com 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 µg/mL de nitensidina A nos tempos de 24 horas (A) e 48 horas (B). Os dados referem-se às médias de dois experimentos independentes (Média ± Erro Padrão). CN (controle negativo), CP (controle positivo), CV (controle de veículo). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

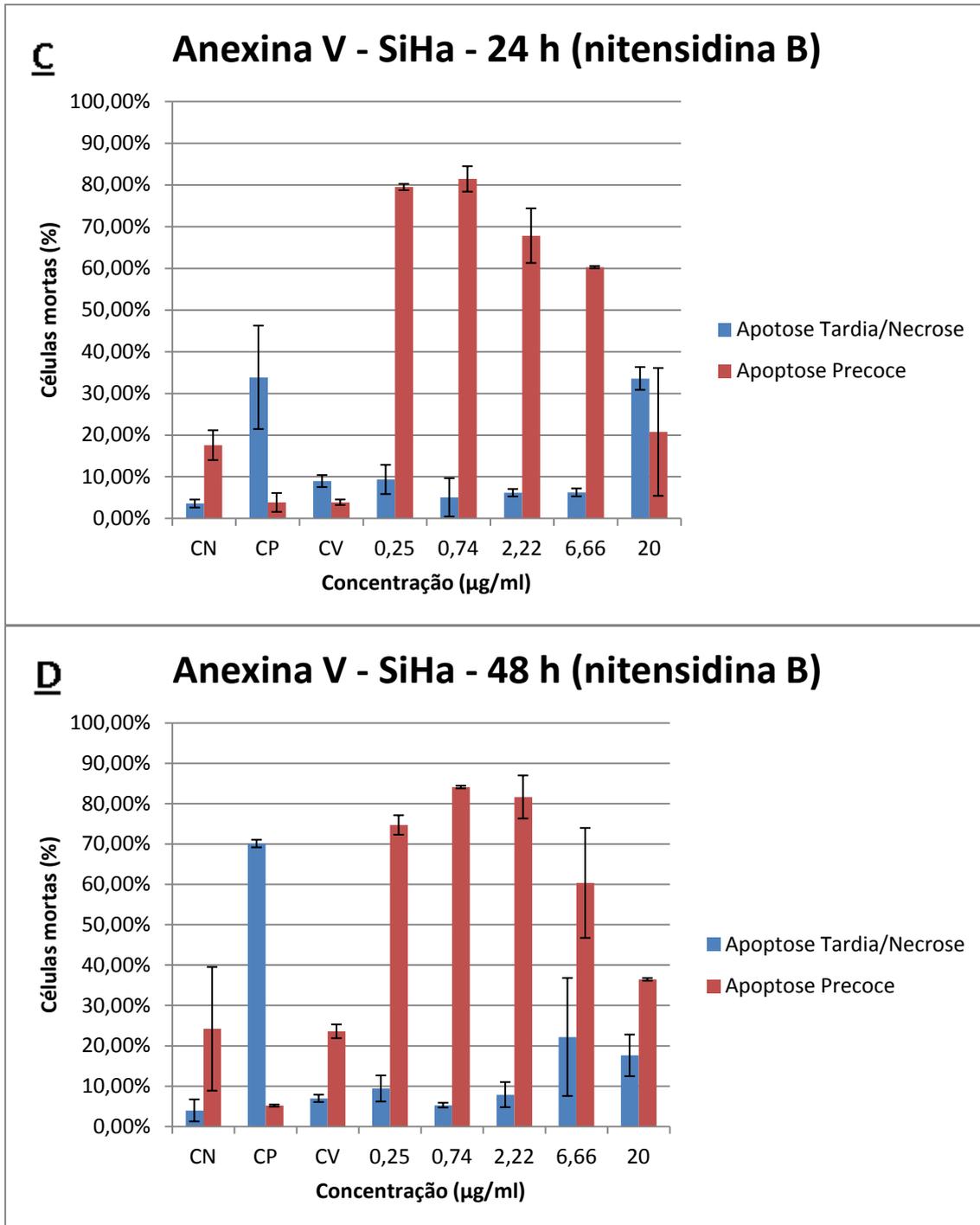


Figura 9 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem SiHa tratada com 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 µg/mL de nitensidina B nos tempos de 24 horas (C) e 48 horas (D). Os dados referem-se às médias de dois experimentos independentes (Média ± Erro Padrão). CN (controle negativo), CP (controle positivo), CV (controle de veículo). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Na linhagem C33A (Figura 11 e Figura 12) foi observado um perfil semelhante ao da linhagem SiHa, em ambos os tempos tratamento com as nitensidinas A e B, não existindo significância estatística nessa comparação. As taxas de morte por apoptose precoce foram elevadas, sendo possível observar também um discreto aumento das mortes por apoptose tardia/necrose e uma diminuição das mortes por apoptose precoce nas maiores concentrações.

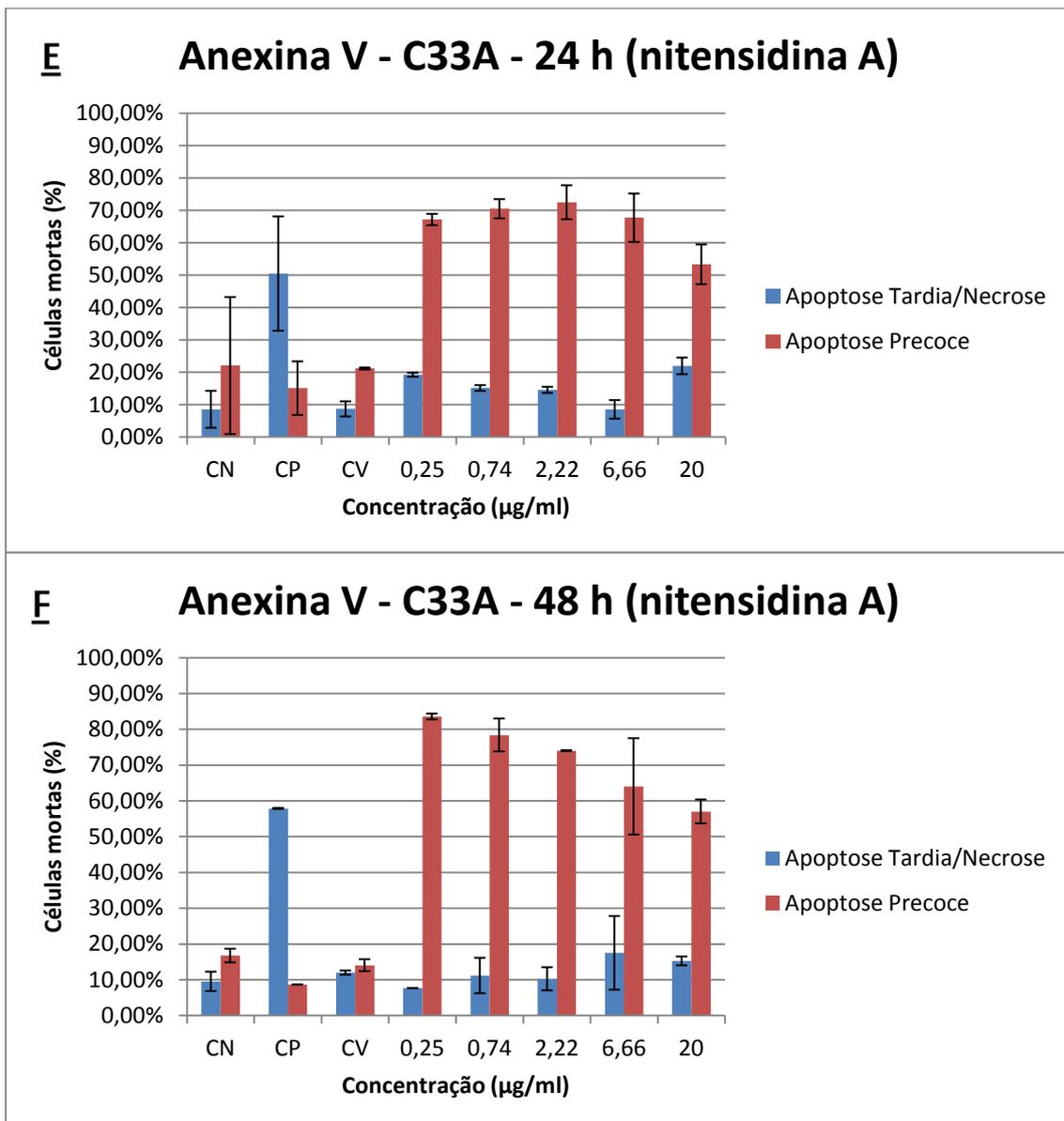


Figura 10 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem C33A tratada com 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 µg/mL de nitensidina A nos tempos de 24 horas (E) e 48 horas (F). Os dados referem-se às médias de dois experimentos independentes (Média ± Erro Padrão). CN (controle negativo), CP (controle positivo), CV (controle de veículo). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

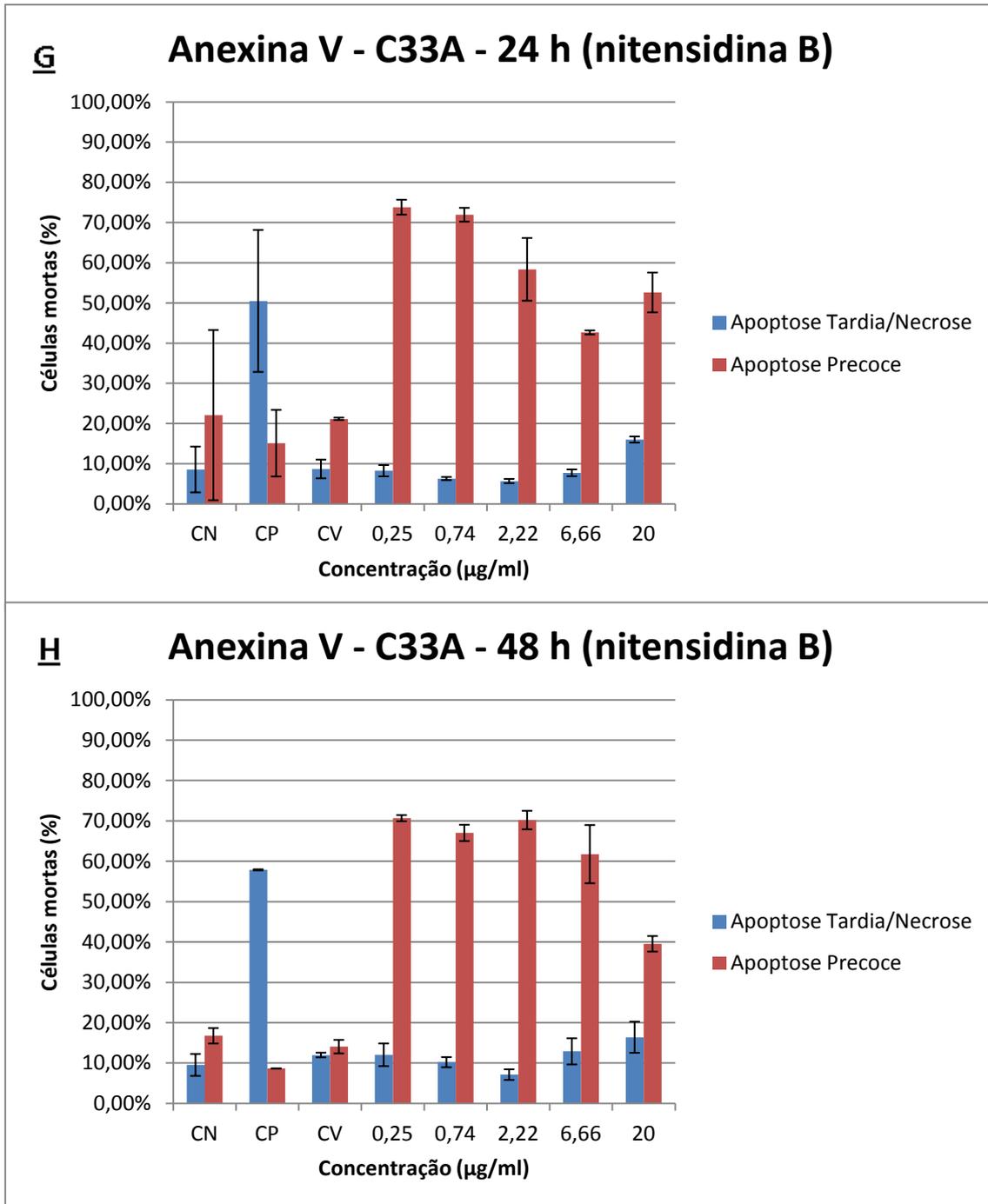


Figura 11 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. Linhagem C33A tratada com 0,25, 0,74, 2,22, 6,66 e 20 µg/mL de nitensidina B nos tempos de 24 horas (G) e 48 horas (H). Os dados referem-se às médias de dois experimentos independentes (Média ± Erro Padrão). CN (controle negativo), CP (controle positivo), CV (controle de veículo). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

5 – DISCUSSÃO

O papilomavírus humano é amplamente reconhecido como fator etiológico para lesões neoplásicas cervicais precursoras e/ou invasoras (FOCCHI et. al, 2000). Estima-se que até 80% das mulheres adquiram uma infecção pelo HPV durante sua vida e até 50% destas infecções será por um tipo de HPV oncogênico (BASEMAN et. al, 2005). Dos mais de 100 tipos de HPV existentes, aproximadamente 40 afetam o trato genital humano, e destes, 10 a 15 estão associados à carcinogênese cervical. Os HPVs de baixo risco (6, 11, 30, 42, 43 e 44) são encontrados em lesões intra-epiteliais de baixo grau (LIE-BG). Os HPVs de médio risco (31, 33, 35, 39, 51, 52, 58 e 61) são mais encontrados em lesões intra-epiteliais de alto grau (LIE-AG) e, com menor frequência, em cânceres. Os HPVs de alto risco (16, 18, 45 e 56) são encontrados em LIE-AG e em cânceres cervicais (BAGARELLI et. al, 2004). O tipo de HPV 16, de alto risco oncológico, foi considerado pela IARC (*Internacional Agency for Research on Cancer*) como definitivamente carcinogênico para a raça humana.

Diferentemente dos outros cânceres humanos, o câncer cervical é, em princípio, uma doença evitável, já que apresenta evolução lenta, com longo período desde o desenvolvimento das lesões precursoras ao aparecimento do câncer (SARAIYA et. al, 2002). O diagnóstico precoce e o acompanhamento da paciente consistem nas principais armas contra a progressão para a lesão maligna. Os métodos diagnósticos das lesões induzidas por HPV são morfológicos e incluem o exame clínico, a colposcopia, a citologia oncológica e a histologia. Já a identificação da infecção por HPV propriamente dita inclui os métodos biológicos via biomarcadores, como as hibridizações moleculares de ácidos nucléicos, tipo Southern Blot, captura de híbridos, hibridização *in situ* e reação em cadeia de polimerase (PCR) (CARVALHO et. al, 1999). O mecanismo pelo qual o HPV de alto risco influi no ciclo celular, levando a sua desregulação e progressão da lesão, inclui fatores inerentes ao vírus e à sua inter-relação com a célula hospedeira. Tais interferências no metabolismo celular poderão

causar modificações, promovendo o aparecimento de biomarcadores que, uma vez identificados, serviriam para orientar o prognóstico de evolução da doença (ELEUTERIO JUNIOR et. al, 2007).

O carcinoma de colo uterino ainda apresenta elevada morbiletalidade em nosso meio, pela ineficácia das rotinas de prevenção e de diagnóstico precoce (DE PALO et. al, 2002). O declínio na incidência do câncer invasor do colo uterino em países desenvolvidos pode ser atribuído principalmente a um aumento na detecção e tratamento das lesões precursoras. Isto está sendo alcançado mediante exames preventivos de colpocitologia oncológica (CO) seguido de colposcopia com biópsia dirigida nas pacientes com exames alterados (RINAS AC, 1999). É estimado que uma redução de até 80% da mortalidade por esse câncer pode ser alcançada através do rastreamento de mulheres na faixa etária de 25 a 65 anos com o teste de Papanicolaou e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ* (INCA, 2010). Além do rastreamento e acompanhamento das pacientes, uma nova arma de combate ao câncer de colo de útero tem sido a comercialização de vacinas contra a infecção pelo HPV.

Atualmente existem duas vacinas disponíveis contra o HPV: a recombinante quadrivalente, desenvolvida por Merck Sharp & Dohme, e a recombinante bivalente, da GlaxoSmithKline, ambas comercializadas no Brasil. São constituídas de "pseudopartículas virais", ou virus-like particles (VLPs), obtidas através de engenharia genética. As VLPs são geradas por clonagem do gene tardio L1 (proteína antigênica maior e principal, que se estrutura em pentâmeros) da cápside do HPV. Portanto, são vacinas de subunidade (de uma só proteína do vírus) (STANLEY, 2007). A quadrivalente contém VLPs purificadas de HPV 16 e 18 (alto risco) e HPV 6 e 11 (baixo risco). Já a bivalente contém somente VLPs purificadas de HPV 16 e 18. Ensaios clínicos demonstraram bons resultados de imunogenicidade,

segurança e eficácia na prevenção do câncer cervical e das verrugas genitais de ambas as vacinas (SIMÕES, 2010).

Apesar do potencial sucesso de prevenção do câncer de colo uterino utilizando a imunização, novas armas para o tratamento são ainda um importante foco de pesquisa e investimento. A busca por substâncias que induzam o processo de apoptose seletivamente em células malignas é um desafio atual e os produtos naturais constituem uma fonte promissora nesse segmento. As plantas são utilizadas como alternativa terapêutica para o câncer quando fornecem compostos ativos, e também quando utilizadas como fator preventivo ao aparecimento/desenvolvimento do câncer quando consumidas regularmente, caso das frutas e vegetais (ELIAS, 2009). Além da atividade anti-neoplásica, os potenciais antiinflamatório, antibacteriano e antioxidante são bem reconhecidos em extratos de diversas fontes naturais.

Estudos prévios demonstraram uma potente atividade antiproliferativa de alcalóides guanidínicos extraídos de *Pterogyne nitens* em células cancerosas (BOLZANI et al, 1995), o que evidencia o potencial anti-neoplásico dessas substâncias, indício que, uma vez bem estudado, pode ser utilizado no desenvolvimento de novos fármacos. Há ainda o potencial efeito mutagênico de frações de *P. nitens* já evidenciado em estudos anteriores (OLIVEIRA et al., 2007), o que alerta para o potencial anticarcinogênico dos compostos bioativos existentes na planta (FERREIRA et al., 2009). Mutações que gerem modificações na expressão de genes que regulam o ciclo celular, a exemplo do pRb, podem aumentar a suscetibilidade de células malignas a agentes quimioterápicos (HOCHHAUSER, 1997) e gerar avanços na terapia contra o câncer.

A flora brasileira representa uma fonte rica e diversificada de princípios ativos, que devem estar sob constante prospecção e avaliação de seus potenciais medicinais, uma vez que o correto manejo de nossas fontes de medicamentos de origem vegetal é de extrema

importância econômica (VARANDA, 2006). Apesar dos grandes esforços e dos robustos investimentos em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, as descobertas vem sendo cada vez mais escassas. Diante desse cenário, a busca por moléculas inspiradas em produtos naturais tem sido cada vez mais explorada e traz novas perspectivas. Os avanços nas técnicas de separação, purificação e identificação de misturas complexas de extratos e a diversidade estrutural presente na natureza são os fatores responsáveis por este renovado interesse. Entre 1981 e 2006, dos 847 fármacos de baixo peso molecular lançados no mercado, 43 eram produtos naturais e 232 produzidos por hemi-síntese a partir de produtos naturais. Dos 572 obtidos por síntese total, 262 substâncias possuíam um grupo farmacofórico inspirado em produtos naturais ou poderiam ser considerados análogos de produtos naturais (SCHMIDT et al., 2008). Isso demonstra a grande capacidade dessas estruturas em servirem como fonte de inspiração na síntese de novas moléculas. Cada extrato é constituído de uma verdadeira biblioteca de moléculas que, uma vez identificadas, analisadas e devidamente estudadas, podem fornecer uma imensa gama de armas terapêuticas.

No presente estudo, dois alcalóides guanidínicos isolados de *P. nitens* (nitensidinas A e B) foram avaliados segundo seus potenciais citotóxicos e apoptóticos, onde foram obtidos resultados altamente satisfatórios. Em relação à citotoxicidade, a curva concentração-resposta confirmou-se de acordo com o que era esperado da observação de estudos prévios realizados com alcalóides guanidínicos extraídos de *P. nitens* (pteroginina e pteroginidina). Nas maiores concentrações das substâncias (nitensidinas A e B) a morte celular foi acentuada e significativa, enquanto nas menores concentrações a taxa de morte foi bastante reduzida. O potencial citotóxico das substâncias em células malignas de câncer de colo de útero pôde ser então evidenciado.

A respeito do potencial apoptótico, a apoptose precoce apresentou-se como o mecanismo de morte celular predominante. Apoptose se trata de uma morte celular programada que é a única forma exatamente regulada responsável por remover células disfuncionais, velhas ou danificadas (YANG et. al, 2006). Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA et. al, 2004). Na prática clínica, a apoptose é alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia (NICHOLSON DW, 2000). Pode ser iniciada através das vias intrínseca e extrínseca, de acordo com a natureza do estímulo de morte. A via intrínseca é desencadeada em resposta a um estímulo de morte próprio da célula, como a ativação de oncogenes ou danos ao DNA. A inativação dessa via é marcante no desenvolvimento e progressão do câncer. Já a via extrínseca é desencadeada pela ação de um ligante de "morte" ao receptor específico na superfície celular (RIEDL, 2004), via esta ativada, por exemplo, por alguns agentes anti-neoplásicos. As proteases que clivam proteínas celulares e desencadeiam eventos bioquímicos que culminam na morte celular são membros da família das caspases (RIEDL, 2007).

Não foram observadas significâncias estatísticas quando comparadas as substâncias (nitensidinas A e B), os tempos de tratamento (24 e 48 horas), e as linhagens (SiHa e C33A) estudadas. Para estudos posteriores, sugere-se que os ensaios sejam repetidos em linhagens não cancerosas, a exemplo de HaCaT (human keratinocyte cell line), para observar se essa insignificância estatística persiste, e assim verificar se a citotoxicidade dos alcalóides é seletiva ou não para células malignas. Há uma urgente necessidade de encontrar novos agentes químicos que possam diferenciar células normais e cancerosas, matando seletivamente células cancerosas (TIAN et al, 2007), por mecanismo de apoptose. É necessária ainda a realização do ensaio adicional de Hoestch-Iodeto para diferenciar os

mecanismos de apoptose tardia e necrose, o que não foi possível por meio do ensaio da anexina V, e assim quantificar o percentual de necrose total (precoce e tardia) induzida pelos alcalóides em teste.

Nossos resultados até o presente momento sugerem que os alcalóides guanidínicos extraídos de *P. nitens* testados apresentam atividade citotóxica em células de câncer de colo de útero infectadas e não infectadas pelo HPV, além de possivelmente induzirem a apoptose nessas linhagens celulares. A citotoxicidade seletiva para células malignas e a indução de morte celular programada são duas condições importantes para o avanço da terapia contra o câncer e novos estudos nesse campo podem representar um maior sucesso dos tratamentos no futuro.

6 – CONCLUSÕES

1. Ambas as substâncias, nitensidina A e nitensidina B, apresentaram efeito citotóxico concentração-resposta em ambas as linhagens testadas (SiHa e C33A) e nos dois tempos de tratamento (24 horas e 48 horas).
2. Não foi observada significância estatística quando comparados os perfis de ação citotóxica das duas substâncias em teste (nitensidinas A e B), em nenhuma das linhagens testadas (SiHa e C33A) e em nenhum dos dois tempos de tratamento (24 horas e 48 horas).
3. Ambas as substâncias, nitensidina A e nitensidina B, apresentaram efeito indutor de apoptose precoce e, em menor número, de apoptose tardia/ necrose, em ambas as

linhagens testadas (SiHa e C33A) e nos dois tempos de tratamento (24 horas e 48 horas).

4. Para complementar os resultados obtidos de indução de apoptose é necessária a realização de um ensaio adicional, o ensaio de Hoestch-Iodeto (projeto em andamento no Laboratório de Citologia e Biologia Celular da FCFAR - UNESP), onde será possível diferenciar via microscopia de fluorescência o mecanismo da necrose do mecanismo da apoptose tardia.
5. Sugere-se que os ensaios sejam repetidos em linhagens celulares não cancerosas para verificar se o potencial citotóxico dos alcalóides testados é seletivo ou não para células malignas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKI, C; Avaliação da atividade apoptótica de alcalóides isolados de *Pterogyne nitens* em linhagem celular de carcinoma ductal invasivo de mama. Iniciação Científica - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Relatório Final - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2008.

BAGARELLI, Lúcia Buchalla; OLIANI, Antonio Hélio. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, fev. 2004.

BASEMAN JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. J Clin Virol. 2005;32 Suppl 1:S16-24.

BOERSMA H. H.; KIETSELAER, B. L. J. H.; STOLK, L. M. L.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A. K.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Past, Present and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications. *J. Nucl Med.*, v.46, n.12, p.2035-2050, 2005.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive Guanidine Alkaloids From *Pterogyne nitens*. *J. Nat. Prod.*, v.58, n.11, p.1683-1688, 1995.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed Cell Death Via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochemistry (Moscow)*, v.70, n.2, p.231-239, 2004.

CARVALHO JJM, Oyakawa N. Papilomavírus humano. I Consenso Brasileiro de HPV. São Roque; 1999.

COELHO, Raquel Autran et al . Relação entre diagnóstico citopatológico de neoplasia intra-epitelial cervical e índices de células CD4+ e de carga viral em pacientes HIV-soropositivas. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, mar. 2004 .

COSTA, Paulo R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. *Rev. Virtual Quim.*, 2009, 1 (1), 58-66.

DELVENNE, P.; HERMAN, L.; KHOLOD, N.; CABERG, J. H.; HERFS, M.; BONIVER, J.; JACOBS, N.; HUBERT, P. Role of Hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.264, p.1-5, 2007.

DOORBAR, J.; CUBIE, H. Molecular Basis for Advances in Cervical Screening. *Mol. Diagn.*, v.9, n.3, p.129-142, 2005.

ELEUTERIO JUNIOR, Jose et al. Associação entre a carga viral de HPV de alto risco, expressão de p16INK4a e lesões intra-epiteliais escamosas do colo uterino. Rev. Assoc. Med. Bras. [online]. 2007, vol.53, n.6, pp. 530-5.

ELIAS, Silvia Taveira. Efeito apoptótico do extrato bruto de tabaco em linhagem de carcinoma oral humano. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

FERNANDES, L. R.; ANTUNES, A. S.; Informações Estratégicas sobre Plantas Medicinais Obtidas a partir de Bases de Dados em Linha Mimeo, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2000.

FERREIRA, Fernanda G. et al. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. Rev. Bras. Farmacogn. 2009, vol.19, n.1a, pp. 61-67.

FOCCHI J, Ribalta JCL, Silva LDCG. Câncer de colo uterino: importância, epidemiologia e fatores de risco. In: Halbe H, editor. Tratado de Ginecologia. 3ª ed. São Paulo: Roca; 2000. p.2120-7.

GIOCONDO, Maísa Pasquotto. Avaliação da atividade apoptótica de substância pura isolada de *Cryptocarya mandioccana* em células de carcinoma cervical imortalizadas pelo Papiloma Vírus Humano (HPV). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Araraquara, 2007.

HOCHHAUSER D. Modulation of chemical chemosensitivity through altered expression of cell cycle regulatory genes in cancer. Anticancer Drug. 8: 903-910, 1997.

IARC. Internacional Agency for Research on Cancer monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human. Human papillomaviruses, vol.64 Lyon: 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

KAWADA, K.; YONEI, T.; UEOKA, H.; KIURA, K.; TABATA, M.; TAKIGAWA, N.; HARADA, M.; TANIMOTO, M. Comparison os Chemosensitivity Testes: Clonogenic Assay versus MTT Assay. Acta Med. Okayama, v.56, n.3, p.129-134, 2002.

KOROSTOFF, J.; WANG, J. F.; KIEBA, I.; MILLER, M.; SHENKER, B. J.; LALLY, E. T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. Infection and Immunity, v. 66 (9), p: 4474-4483, 1998.

LEÓN, C.J.; GÓMEZ, S.M.; MORANTES, S.J.; CORDERO, C.P.; ANCÍZAR, F. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. Biomédica, v.26, p.161-168, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, v.65, p.55-63, 1983.

MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; VILLANUEVA, S. L.; MARUO, T. The Role of Human Papilloma Virus in Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. Kobe J. Med. Sci., v.50, n.1, p.9-19, 2004.

MUNOZ, L.E.; FREY, B.; PAUSCH, F.; BAUM, W.; MUELLER, R. B.; BRACHVOGEL, B.; POSCHL, E.; RÖDEL, F.; VON DER MARK, K.; HERRMANN, M.; GAIPL, U. S. The

role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells. *Curr. Med. Chem.*, v.14, n.3, p.271-277, 2007.

NICHOLSON DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. 2000;407:810-16.

OKADA H, Mak TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:592-603.

OLIVEIRA AM, Caliri CM, Regasini LO, Talascra M, Peron MCC, Silva DHS, Santos AG, Bolzani VS, Cabalheiro AJ, Soares CP. Evaluation of micronuclei frequency in *Tradescantia pallida* pollen mother cells treated with ethanolic extracts isolated from *Cryptocarya mandioccana*, *Cryptocarya moschata* and *Pterogyne nitens*. *Rev Bras Toxicol* 20: 73-78, 2007.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, 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 de hydrothyriferol. *Biochem. Pharmacol.*, v.65, p.1451-1461, 2003.

RIEDL SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews* 2004;5:897-06.

RIEDL DJ, Salvesen GS. The apoptosome signalling platform of cell death. *Nature Reviews* 2007;8:405-432.

RINAS, AC. The gynecological Pap test. *Clin Lab Sci* 1999; 12:239-45

RUCINSKA, A.; ROSZCZYK, M.; GABRYELAL, T. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biol. Int.*, v.32(8), p: 1019-23, 2008.

SARAIYA M, Lee NC, Blackman D, Smith MJ, Morrow B, McKenna MT. Observations from the CDC. An assessment of Pap smears and hysterectomies among women in the United States. *J Womens Health Gen Based Med.* 2002;11(2):103-9.

SCHMIDT, B.; Ribnick, D. M.; Poulev, A.; Logendra, S.; Cefalu, W.T.; Raskin, I. *Metabolism, Clinical and Experimental* 2008, 57, S3.

SILVA, Isabel Cristiane da. Avaliação de apoptose induzida por extrato orgânico de material particulado atmosférico, rico em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, na região urbana de Araraquara durante a safra e entressafra de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Araraquara, 2009.

SIMÕES, Cleomenes Barros. Vacinas contra o HPV: Uma visão crítica. *Diagn Tratamento.* 2010 ;15(2):92-5.

STANLEY, M. Prophylactic HPV vaccines. *J Clin Pathol.* 2007;60(9):961-5.

STEWART B. W.; KLEIHUES, P. *World Cancer Report.* IARC Press: Lyon, France, 2003.

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.

VAN GENDEREN, H.; KENIS, H.; LUX, P.; UNGETH, L.; MAASSEN, C.; DECKERS, N.; NARULA, J.; HOFSTRA, L.; REUTELINGSPERGER, C. *In vitro* measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nature Protocols*, v.1, p.363-367, 2006.

VALADARES, Marize Campos; CASTRO, Núbia Cristiana de; CUNHA, Luiz Carlos da. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 43, n. 4, pp. 631-638, 2007.

VARANDA, E. A. Atividade Mutagênica de Plantas Medicinais. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.24. n.1, p.1-7, 2006.

VILLA, L. L. Overview of the clinical development and Results of a quadrivalent HPV (types 6, 11, 16 and 18) vaccine. *Int. J. Infec. Dis.*, v.11, sup.2, p.17-25, 2007.

YANG, H.; CHEN, C.; CHANG, W.; LU, F.; LAI, Y.; CHEN, C.; HSEU, T.; KUO, C.; HSEU, Y. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorate*. *Cancer Letters*, v. 231, p: 215-227, 2006.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evodiamine Induces Cell Death Through Different Pathways: Apoptosis and Necrosis. *Acta Pharmacol. Sin.*, v.25, n.1, p.83-89, 2004.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and Cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, v.5, p.342-350, 2002.