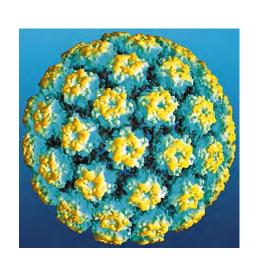


# UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CÂMPUS DE ARARAQUARA

## JULIANA MARIA SORBO BOZETO

Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos *nude* BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa)

> ARARAQUARA-SP 2011



# UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CÂMPUS DE ARARAQUARA

## JULIANA MARIA SORBO BOZETO

Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos *nude* BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista — UNESP, como requisito para obtenção do titilo de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Citologia Clínica e Biologia Celular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Pienna Soares

ARARAQUARA-SP 2011

## Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP – Campus de Araraquara

Bozeto, Juliana Maria Sorbo

B793e

Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos *nude* BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa) / Juliana Maria Sorbo Bozeto. — Araraquara, 2011

94 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia Orientador: Christiane Pienna Soares

1. Câncer cervical. 2. HPV. 3. Nitensidina A. 4. Apoptose. 5. Nude BALB/c. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

## TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DA AUTORA: Juliana Maria Sorbo Bozeto

TÍTULO DO TRABALHO: "Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos *nude* BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa)

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

PRESIDENTE E ORIENTADORA: Dra. Christiane Pienna Soares

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

SEGUNDO EXAMINADOR: Dr. Luis Octavio Regasini

INSTITUIÇÃO: Instituto de Química, UNESP - Campus de Araraquara.

TERCEIRO EXAMINADOR: Denise Crispim Tavares

INSTITUIÇÃO: Univerrsidade de Franca

QUARTO EXAMINADOR: Dra. Iracilda Zappone Carlos

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

QUINTO EXAMINADOR: Dra. Carmem Lucia Bassi

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Mato Grosso

Araraquara, 25 de Novembro de 2011





## Agradeço de coração:

Em primeiro lugar a **Deus** e a **Nossa Senhora do Carmo**, pela vida, bênção e proteção.

Aos meus **Pais** pela educação e pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e respeito, sempre me tratando com muito carinho, dedicação e atenção, nunca medindo esforços para me ajudar na realização de todos os meus sonhos. Obrigada por tudo! **Amo Muito Vocês!** 

À minha querida avó **Margarida** pela paciência, exemplo de vida e amor.

Ao meu amado irmão, **Júnior** pelo carinho, dedicação e força, sempre me incentivando a seguir em frente; à minha cunhada **Patrícia** por me apoiar e ajudar em vários momentos e à minha querida sobrinha **Bruna**, simplesmente por existir e fazer parte da minha vida.

À minha irmãzinha **Ana** que eu tanto amo, por estar presente em todos os momentos da minha vida, mesmo estando longe nossos corações estão sempre unidos, obrigada pela força, pelo carinho e pela atenção; ao meu cunhado **Jackson** por me ajudar desde o início dos meus estudos e ao **Pequeno Ser**, **Murilo**, por existir e tornar minha vida cada vez mais feliz.

Ao **Danilo**, por me apoiar em todas as situações, sempre me dando forças para continuar nessa caminhada, pelo seu carinho e por fazer parte da minha vida. **Amo Você!** 

À Nancy e ao Jú por sempre acreditar e torcer por mim.

À minha querida orientadora **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Christiane Pienna Soares**, por quem tenho muita admiração e respeito, por me aceitar em seu laboratório e por acreditar em meu potencial, me ensinando e auxiliando em todos os momentos que precisei. Tenho a honra de dizer que fui sua orientada e que hoje sou sua amiga. Conte sempre comigo!

À minha grande amiga **Bel**, pela sua amizade, companheirismo, carinho, dedicação e exemplo de mulher. Pela sua competência em sempre nos ajudar da melhor maneira possível. Aprendi muito com você e tenho certeza que nossa amizade será eterna. Estarei sempre ao seu lado!

Aos meus companheiros e amigos do laboratório de Citologia e Biologia Celular, por compartilhar de momentos tristes e felizes de minha vida durante todos esses anos. Ao Felipe, por sempre estar ao meu lado, me apoiando e ajudando em tudo, saiba que você tem um lugar especial reservado em meu coração; ao Flavinho pelos momentos que passamos juntos e pela força que sempre me deu, me contagiando com sua alegria de viver; a Thais pela sua

amizade, força, pelos conselhos e companheirismo; a **Dani** pela atenção e confiança; à **Gabi** pela sua amizade, disposição e pelos momentos de alegria; a minha querida amiga **Jamile** por estar sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças; a **Jú Brandi e Heloísa** pela disposição em me ajudar sempre que precisei, pelo carinho e atenção; a **Roberta** pela amizade, ajuda e companheirismo, ao **Mauro** pelos ensinamentos e por toda colaboração nesse trabalho; a **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup> **Valéria** pelo apoio e pelos conselhos, a **Aline** pelo auxílio e aprendizado, a **Tarsia**, **Elaine**, **Letícia**, **Claudete**, **Bruna**, **Bárbara**, **Rodolfo**, **Leda** e **Luis**, muito obrigada!

A todas as pessoas do Departamento de Análises Clínicas pela disposição em ajudar sempre que preciso, em especial à **Eliana** (secretaria), **Rô** (Mico), **Rosemira**, **Márcia** (portaria) e **Max**, obrigado pelos momentos de alegria.

Aos professores integrantes do Projeto Temático Biota/Bioprospecta-Fapesp  $Dr^a$ . Vanderlan Bolzani e  $Dr^a$ . Dulce Silva pelo auxílio e incentivo durante a realização desta pesquisa, e em especial ao Dr. Luis Octávio Regasini, pela sua disponibilidade, competência e boa vontade em nos ajudar sempre, pela sua humildade e pela sua essencial e indispensável contribuição no desenvolvimento desse projeto.

Aos professores membros titulares da banca de qualificação e defesa  $Dr^a$ . Raquel Alves dos Santos, Dr. Luis Carlos Spolidorio, Dr. Luis O. Regasini e  $Dr^a$ . Denise Crispim Tavares, que contribuíram nas correções e sugestões desse trabalho.

À **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Ticiana Sidorenko de Oliveira Capote**, por todo apoio e ajuda que me deu, pela sua amizade e compreensão, e a todos do Laboratório de Anatomia da Faculdade de Odontologia - UNESP - Araraquara, que me acolheram.

Ao **Dr.** Nicolino Lia Neto, e a toda equipe do Instituto de Patologia Cirúrgica e Citopatologia de Araraquara (IPC), pela disposição na preparação das lâminas.

Ao **Dr. Cleverton Roberto de Andrade** do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo auxílio na análise dos resultados.

Ao **Laboratório de Imunologia** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo auxílio dispensado no Citômetro de Fluxo.

À **Prof**<sup>a</sup>. **Dr**<sup>a</sup>. **Alexandra Ivo de Medeiros** e a sua técnica **Valéria** do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pela disponibilidade e auxilio no biotério.

As meninas da **Pós-Graduação**, pelo apoio técnico, dedicação e competência em seu trabalho e também a todos os **professores** e **funcionários** desta instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida e apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos da minha **família**, todos os meus **amigos** e a todas as **pessoas** que torceram por mim, contribuíram, acreditaram e me ajudaram na concretização desse sonho, seja de forma direta ou indireta.



## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	20
1. Introdução	
1.1. Câncer de Colo Uterino e Papilomavirus Humano (HPV)	22
1.2. HPV – Biologia e Ciclo de Vida	
1.3. Pterogyne nitens e alcalóides guanidínicos	28
1.3.1. Nitensidina A	
1.4. Morte Celular – Apoptose e Necrose	
1.4.1. Apoptose e anexina V	
1.4.2. Hoechst / Iodeto de Propídeo	
1.5. Genotoxicidade e Mutagenicidade	
1.5.1. Ensaio Cometa	
1.5.2. Ensaio de micronúcleo	35
1.6. Carcinogênese em camundongos <i>nude</i> BALB/c	36
1.6.1. Análise histológica em camundongos nude BALB/c	
2. Objetivos	
2.1. Objetivo Geral	
2.2. Objetivos Específicos	
3. Materiais e Métodos	
3.1. Procedimentos fitoquimicos: obtenção de nitensidina A	
3.2. Cultura de células – SiHa e C33A	
3.3. Tratamento das Linhagens Celulares e dos Animais	
3.4. Citotoxicidade com MTT	44
3.5. Ensaios de Apoptose	
3.5.1. Anexina V	
3.5.2. Hoechst e iodeto de propídeo	
3.6. Ensaios <i>in vivo</i>	
3.6.1. Camundongos nude BALB/c	
3.6.2. Implantação tumoral xenográfica de SiHa em camundongos nude BALB/c	
3.6.3. Administração de nitensidina A em camundongos nude BALB/c	
3.6.4. Estudos histológicos	
3.7. Ensaio de Genotoxicidade - Teste do Cometa	
3.8. Ensaio de Mutagenicidade - Teste do Micronúcleo	
3.9. Análises Estatísticas	
4. Resultados.	
4.1. Citotoxicidade	
4.2. Ensaio de anexina V	
4.3. Ensaio de Hoechst / Iodeto de Propídeo	
4.4. Crescimento Tumoral	
4.5. Análise Histológica	
4.5.1.Exame histológico	
4.5.2.Exame histopatológico	
4.6. Avaliação da Genotoxicidade	
4.7. Avaliação da Mutagenicidade	
5. Discussão	
5.1. Avaliação da Citotoxicidade	
5.2. Avaliação da apoptose por meio dos ensaios Anexina V e Hoechst / IP	
5.3. Determinação do crescimento tumoral em camundongos <i>nude</i> BALB/c	

5.4. Aspectos histopatológicos	. 75
5.5. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade em camundongos nude BALB/c	.76
6. Conclusões	. 79
7. Referências Bibliográficas	. 81
CAPÍTULO 2	
Artigo Científico	
	_

## Lista de Tabelas

- Tabela 1: Avaliação do tecido invasivo.
- Tabela 2: Avaliação do índice mitótico e necrose tumoral.
- **Tabela 3:** Avaliação da mutagenicidade em camundongos *nude* BALB/c.

## Lista de Figuras

- Figura 1. Representação esquemática do capsídeo e do genoma viral do HPV-16.
- Figura 2. O ciclo viral do Papilomavírus Humano (HPV).
- **Figura 3.** Planta *Pterogyne nitens* em seu habitat. (A) Árvore completa. (B) Detalhe das folhas.
- **Figura 4.** Estrutura química do alcalóide guanidínico isolados de *Pterogyne nitens* nitensidina A.
- Figura 5. Características morfológicas de apoptose e necrose.
- **Figura 6.** Ensaio de Citotoxicidade (MTT) com a substância nitensidina A, na linhagem de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV-16 (SiHa).
- **Figura 7.** Ensaio de Citotoxicidade (MTT) na linhagem de carcinoma cervical não imortalizada pelo HPV-16 (C33A).
- **Figura 8.** Ensaio de apoptose pelo teste de Anexina V, na linhagem de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV 16 (SiHa), tratadas com a substância nitensidina A.
- **Figura 9.** Ensaio de apoptose pelo teste de Anexina V, na linhagem de carcinoma cervical não imortalizada pelo HPV 16 (C33A), tratadas com a substância nitensidina A.
- **Figura 10.** Ensaio de apoptose e necrose pelo método de Hoechst Iodeto de Propídio na linhagem de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV 16 (SiHa), tratadas com a substância nitensidina A.
- **Figura 11.** Ensaio de apoptose e necrose pelo método de Hoechst Iodeto de Propídio na linhagem de carcinoma cervical não imortalizada pelo HPV 16 (C33A), tratadas com a substância nitensidina A.

Figura 12. Comparação do crescimento tumoral em camundongos *nude* BALB/c.

**Figura 13.** Inibição do crescimento tumoral em camundongos *nude* BALB/c tratados com nitensidina A.

Figura 14. Porcentagem de inibição do crescimento tumoral.

Figura 15. Imagens histológicas dos tumores.

Figura 16. Ensaio do Cometa realizado em nude BALB/c.

Figura 17. Avaliação da genotoxicidade através do teste do cometa em nude BALB/c.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - análise de variância

ATCC- American Type Culture Collection

ATV – associação de tripsina e versene

BALB/c- camundongos atímicos (espécie)

CN – controle negativo

CP – controle positivo

CV- controle de veículo

CI<sub>50</sub> – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular

C33a- células de carcinoma cervical humano não imortalizadas pelo HPV-16

DAF – diacetato de fluoresceína

DMEM – Dulbecco`s modification of Eagle's medium

E- *early* 

EP - erro padrão

E<sub>2</sub>F- fator epitelial 2

FITC - isotiocianato de fluoresceína

FN - fragmentos do nucleóide

Gy/min- gray por minuto

HO – Hoechst

HO / IP - Hoechst Iodeto de Propídio

HUVEC- células endoteliais da veia umbilical humana

HPF- high power field

HPV – "Human Papilomavirus"

IP – iodeto de propídeo

IPC - Instituto de Patologia Clínica

L-late

LCR – long control region

MF- fator mitótico

mg/kg p.c. – miligrama por kilograma e peso corpóreo

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio

NuBBE- Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

OECD - Organization for Economic Co-Operation & Economic Development

PB – pares de base

PBS – solução salina tamponada com fosfato

pRb- proteína do retinoblastoma

PS – fosfatidilserina

p53- proteína p53

q.s.p.- quantidade suficiente para

RT-PCR- transcrição reversa reação em cadeia de polimerase

SiHa- linhagem de carcinoma cervical humano imortalizadas pelo HPV-16

SFB – soro fetal bovino

TM – tail moment

URR – upstream regulatory region

Vero – linhagem cellular de rim de macaco verde africano

WB- Western Blot

3T3-L1 – fibroblasto de camundongo

## **RESUMO**

Atualmente, o câncer cervical é considerado a segunda causa mais comum entre as mulheres e encontra-se associado ao Papilomavírus Humano (HPV), que infecta células epiteliais escamosas, dando origem a grandes lesões. A nitensidina A é um alcalóide guanidínico isolado de Pterogyne nitens Tul. (Fabaceae), que possui atividade anti-inflamatória e antioxidante, além de um amplo aspecto de atividades biológicas que está sendo estudado. Foi testada nas concentrações de 20,0 a 0,25 µg/mL (diluição seriada 1:3) e nos tempos de 24 h e 48 h nas linhagens imortalizadas com HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C33A). Para avaliar a citotoxicidade da nitensidina A o teste MTT foi realizado sendo possível observar um efeito concentração-resposta em duas linhagens testadas (SiHa e C33A, CI<sub>50</sub> = 10,31 μg/mL e 11,91 μg/mL, respectivamente) por 24 h. Com o intuito de avaliar o potencial efeito indutor de apoptose, foi realizado o ensaio de anexina V por citometria de fluxo. Em ambas as linhagens e tempos de tratamento notaram-se uma morte mais relevante por apoptose precoce, sendo que há diferença apenas na maior concentração (20,0 µg/mL) na linhagem SiHa, que também induz morte por apoptose tardia/necrose. Para completar esse ensaio foi realizado o teste do Hoechst-iodeto de Propídeo, diferenciando assim apoptose precoce, tardia e necrose. Na linhagem SiHa tratada por 24 h nas menores concentrações houve morte celular por apoptose precoce, e na maior concentração por apoptose tardia (81,4±1,4 %). Por 48 h, em todas as concentrações a morte celular foi por apoptose tardia. Na linhagem C33A em 24 h não foi observado morte celular significativa. Em 48 h, a maior concentração induziu apoptose tardia (57,7±20,6 %). O modelo de estudo de implante tumoral xenográfico de células SiHa em camundongos nude BALB/c tratadas com nitensidina A permitiu avaliar uma redução no crescimento tumoral. Os camundongos apresentaram volume do tumor de  $0.27\pm0.01 \text{ cm}^3 \text{ e } 0.60\pm0.03 \text{ cm}^3 \text{ após o tratamento de } 0.244 \text{ mg/kg p.c. e } 0.128 \text{ mg/kg p.c. de}$ nitensidina A, respectivamente, enquanto que os animais tratados com salina apresentaram 1,20±0,12 cm<sup>3</sup> do volume do tumor. Os danos ocorridos no DNA podem ser observados por meio dos testes cometa e micronúcleo sendo recomendados para determinar se o composto apresenta atividade genotóxica e mutagênica, respectivamente. No teste do cometa in vivo foi possível observar o efeito dose-resposta. As porcentagens de danos ao DNA mostraram que nas concentrações de 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c. ocorreram danos crescentes com 11,0±1,47 % e 12,62±2,4 %, respectivamente. Por outro lado, na concentração de 0,06 mg/kg p.c., a porcentagem de danos foi menor (3,17±0,91 %), não apresentando significância quando comparadas ao controle negativo (3,21±071 %). Avaliando o teste do micronúcleo, não houve significância entre as doses testadas quando comparadas ao controle negativo, mostrando que a substância não foi mutagênica. Sendo assim, pode-se dizer que a morte celular por apoptose precoce ou tardia e necrose foi observada dependendo da concentração. Nitensidina A apresentou redução do crescimento tumoral nos experimentos in vivo. Por outro lado, mostrou um potencial genotóxico considerável nas doses superiores, mas não mutagênico.

Palavras-chave: câncer cervical, HPV, nitensidina A, apoptose, nude BALB/c.

## **ABSTRACT**

Currently, cervical cancer has been considered the second most common among women and is associated with human papillomavirus (HPV) which infects squamous epithelial cells, resulting in major injuries. Nitensidine A is a guanidine alkaloid isolated from Pterogyne nitens Tul. (Fabaceae), which has anti-inflammatory and antioxidant, as well as a broad spectrum of biological activities being studied. It was tested at concentrations from 20.0 to 0.25 mg/mL (serial dilution 1:3) and for 24 h and 48 h in immortalized with HPV-16 (SiHa) and non-immortalized (C33A) cell lines. To evaluate the cytotoxicity of nitensidine A MTT test was performed and it was possible to observe a concentration-response effect in two tested lines (SiHa and C33A,  $IC_{50} = 10.31$  mg/mL and 11.91 mg/mL, respectively) for 24 h. In order to assess the potential effect of inducing apoptosis, we performed the annexin V assay by flow cytometry. In both strains and treatment times were noted a death most significant by early apoptosis, and a difference only at highest concentration (20.0 mg/mL) in SiHa, which also induces death by late apoptosis / necrosis. To complete this test, it was performed the Hoechst-propidium iodide assay, thereby differentiating early, late apoptosis and necrosis. In SiHa treated for 24 h at lower concentrations there was cell death by early apoptosis, and late apoptosis at highest concentration (81.4  $\pm$  1.4%). For 48 h at all concentrations cell death was by late apoptosis. In C33A at 24 h was not observed significant cell death. At 48 h, the highest concentration induced late apoptosis (57.7  $\pm$  20.6 %). The study model of xenographic tumor implant of SiHa cells in nude mice BALB/c treated with nitensidine A allowed assessment of tumor growth reduction. The mice had tumor size of 0.27±0.01 cm<sup>3</sup> and 0.60±0.03 cm<sup>3</sup> after treatment with nitensidine A at 0.244 mg/kg b.w. and 0.128 mg/kg b.w., respectively, while animals treated with saline showed 1.20±0.12 cm<sup>3</sup> tumor size. DNA damages can be observed through the comet and micronucleus tests, which are recommended to determine if the compound has genotoxic and mutagenic activity, respectively. In the *in vivo* comet test was possible to observe the dose-response effect. The percentages of DNA damage showed that concentrations of 0.128 mg/kg b.w. and 0.244 mg/kg b.w. has increased to  $11.0 \pm 1.47$  % and  $12.62 \pm 2.4$  %, respectively. On the other hand, at concentration of 0.06 mg/kg b.w., the percentage of damage was lower (3.17±0.91 %) with no significance when compared to the negative control (3.21±071 %). Assessing the micronucleus test, there was no significant difference among the doses tested when compared to the negative control, showing that the compound was not mutagenic. Therefore, we can suggest that cell death observed by early or late apoptosis and necrosis was depending on the concentration. Nitensidine A decreased tumor growth in in vivo experiments. On the other hand, showed a significant genotoxic potential at higher tested doses, but not mutagenic effect.

Key-words: cervical cancer, HPV, nitensidine A, apoptosis, nude BALB/c

## CAPÍTULO 1

## 1. Introdução

## 1.1. Câncer de Colo Uterino e Papilomavirus Humano (HPV)

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2010). Câncer de mama, colo retal e câncer cervical são potencialmente curáveis, quando detectados precocemente (DUBARD et al., 2008).

O câncer cervical é a segunda causa mais comum de câncer mundial em mulheres, com aproximadamente 500.000 novos casos diagnosticados e mais de 270.000 mortes anualmente. Com a implantação do programa de rastreamento de câncer cervical durante as quatro décadas passadas, a incidência desse tipo de câncer e a incidência de mortalidade diminuíram drasticamente nos países desenvolvidos (MYERS et al., 2008).

Estimativas mostram que, no Brasil, o câncer do colo do útero é a segunda neoplasia mais comum na população feminina, de acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer divulgada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2011). Segundo dados do Ministério da Saúde o número de casos novos de câncer de colo do útero esperados para o Brasil em 2010 e 2011 são de 18.430, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Devido ao alto índice de morte que ocorre todo ano, e também a esse índice de proliferação constante, o câncer hoje é uma das doenças mais temidas em todo mundo.

Adolescentes apresentam um alto risco de contrair doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), devido a seus comportamentos inadequados, aumentando assim o risco de se associar com o Papilomavirus Humano (HPV) e consequentemente com as infecções cervicais (GANDER et al., 2009). Portanto a educação, assim como o fator sócio econômico, o início precoce de atividades sexuais e também o elevado número de parceiros são um dos fatores importantes que estão associados ao desenvolvimento do câncer de colo uterino.

O câncer de colo uterino é uma doença causada por fatores ambientais, genéticos e também infecciosos, onde o HPV relaciona-se com 90% dos casos entre a população mundial.

Dos 500.000 novos casos que são diagnosticados, aproximadamente 80% ocorrem nos países em desenvolvimento e estimativas mostram que até 2020, espera-se ainda um aumento de 90% dos casos (MACIAS et al., 2000; LIN et al., 2001; BOSCH & SANJOSÉ, 2003; STANLEY, 2003; ZUR HAUSEN, 2009; D'ANDRILLI et al., 2010).

Embora pouco conhecido pela população brasileira, o Papilomavirus Humano (HPV) se destaca como uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais comuns no mundo. A única forma visível da doença provocada por esse microrganismo são verrugas, também conhecidas como "crista de galo", que aparecem nas regiões genitais de homens e mulheres. No entanto, só os tipos mais benignos do HPV desenvolvem tais sintomas. Os que atuam de maneira secreta podem produzir problemas mais sérios e levar ao câncer.

O Brasil é um dos líderes mundiais em incidência de HPV. As vítimas preferenciais são mulheres entre 15 e 25 anos, embora a doença também acometa os homens. Especialistas acreditam que o número menor de registros entre pessoas do sexo masculino tenha como origem a baixa procura dos homens por serviços de urologia, por fatores como o preconceito ou a falta de informação (Ministério da Saúde, 2011).

O HPV então é considerado um problema de saúde pública que afeta principalmente países subdesenvolvidos em que a população com baixo nível social, com hábitos precários de higiene torna-se o principal foco da infecção viral que evolui para malignidade principalmente entre as mulheres (INCA, 2011). A infecção por subtipos de alto risco oncogênico do HPV é o maior fator de risco para o desenvolvimento de lesões malignas no colo uterino. Embora a infecção pelo o HPV possa ser o fator desencadeante do câncer cervical estudos recentes mostram a correlação com fatores genéticos e funções imunes intimamente relacionados com a prospecção da carcinogênese cervical e a infecção pelos principais subtipos de alto risco (ZUR HAUSEN, 2009).

Os diferentes tipos de HPV são vírus que infectam as células epiteliais escamosas. Mais de 200 tipos tem sido isolado e não há duvidas de que existem outros tipos que ainda não foram identificados. Estes vírus têm sido encontrados em muitos organismos, incluindo os seres humanos. Os HPVs dão origem a grandes lesões epiteliais, principalmente hiperplasia benigna (por exemplo, verrugas ou papilomas), com baixo potencial maligno. Uma pequena fração de pessoas infectadas com HPV de alto risco irá desenvolver câncer, que geralmente surgem muitos anos após a infecção inicial (PSYRRI & DIMAIO, 2008). HPVs da mucosa e genital são compostos por cerca de 30 tipos, sendo divididos em HPVs de baixo risco (tipos 6, 11, 42, 43 e 44) e HPVs de alto risco que estão associados com lesões pré-cancerígenas (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56), de acordo com a sua presença em lesões malignas do colo

do útero (NAIR & PILLAI, 2005). Quanto às linhagens celulares, a linhagem de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV-16 – SiHa, é uma linhagem tumorigênica que apresenta de uma a duas cópias virais e foi isolada de paciente, diferente da linhagem de carcinoma cervical que não é imortalizada pelo HPV-16 (C33A) e que foram utilizadas no presente estudo como células controle de imortalização por HPV.

A principal maneira utilizada para detecção precoce das lesões que podem levar ao câncer de colo uterino é a realização do exame popularmente conhecido como Papanicolaou. Este exame consiste na coleta do material citológico da parte externa (ectocervice) e também da parte interna (endocervice) do colo uterino, por meio da introdução de um espéculo vaginal e coleta, realizado com uma espátula de madeira e com uma escova endocervical, mediante os movimentos de 360°. Esse rastreamento que é realizado entre as mulheres permite a detecção precoce das lesões do colo uterino, reduzindo significativamente o aparecimento do câncer cervical.

O Sistema Único de Saúde (SUS) oferece exames gratuitos à população para detecção do vírus. Para evitar que a contaminação pelo HPV se transforme em câncer, é fundamental que as mulheres se submetam ao exame Papanicolaou regularmente. O Ministério da Saúde também recomenda visitas frequentes a ginecologistas, para prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e à reprodução. Alguns fatores aumentam a probabilidade de desenvolvimento desse câncer em mulheres infectadas pelo HPV. Entre eles, estão o número elevado de gestações, o uso de contraceptivos orais, tabagismo e infecção pelo HIV e outras DST (Ministério da Saúde, 2011).

O uso de preservativos durante a relação sexual é também uma prevenção primária do câncer do colo do útero, uma das formas de evitar o contágio pelo HPV, sendo que este é transmitido pelo contato genital com a pessoa infectada (incluindo sexo oral). Pode ser transmitido também por via sanguínea, de mãe para filho na hora do parto. Na maioria das vezes, a infecção é transitória e desaparece sem deixar vestígios. Por isso, quando se realiza o diagnóstico, não se consegue saber se a infecção é recente ou antiga. A doença viral pode permanecer sem se manifestar no corpo da pessoa. A explicação para tantos casos pode ter como causa o fato de a infecção do HPV se desenvolver de forma silenciosa no corpo humano. A maioria das pessoas não apresentam nenhum sintoma ao contrair a doença e, por isso, não procura tratamento. Esse comportamento é o grande responsável pela disseminação do vírus (Ministério da Saúde 2011).

## 1.2. HPV – Biologia e Ciclo de Vida

O HPV é um vírus de DNA, da família *Papovaviridae* do gênero *Papovavirus* que foi identificado por Strauss em 1949, e que vem sendo isolado em inúmeras espécies animais. As partículas virais completas não são envelopadas e possuem capsídeo protéico (composto por duas proteínas estruturais) de padrão icosaédrico, com 55 nm de diâmetro. Dentro do capsídeo, o genoma se apresenta circular de dupla fita de DNA, contendo aproximadamente 8.000 pares de base (pb) e peso molecular de 5,2 x 10<sup>6</sup> Da (DELIGEOROGLOU et al., 2009; ZUR HAUSEN, 2009; HORVATH et al., 2010).

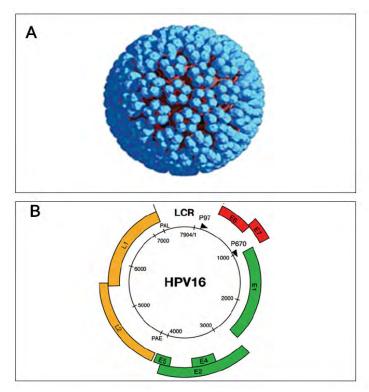
O genoma viral é dividido em três regiões gênicas, diferenciadas de acordo com os genes que são codificados em cada região. A região precoce (E, de *early*), com 7 a 8 genes funcionais, a região tardia (L, de *late*) que codifica as duas proteínas estruturais do capsídeo e uma região regulatória, não-codificadora, conhecida como *long control region* (LCR ) ou *upstream regulatory region* (URR ) (Figura 1) (SPPV, 2011).

O tamanho relativamente pequeno do genoma do HPV permite uma análise de cada gene e a interação das proteínas virais com a célula hospedeira. Os genes precoces formam 60% do genoma viral, são responsáveis pela replicação do DNA (gene *E1*), controle de transcrição (gene *E2*), maturação do vírus e alteração da matriz e citoesqueleto celular (gene *E4*), e 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 sequências altamente conservadas em todos os papilomavírus. Esses genes codificam proteínas do capsídeo viral que são responsáveis por sua antigenicidade, sendo a proteína L1, de 54 kDa como principal, e L2, de 52 kDa como secundária.

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 a E7, pRb é degrada 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 em resposta à entrada não programada na fase S induzida por E7 (DOORBAR & CUBIE, 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 & CUBIE, 2005).



**Figura 1:** Representação esquemática do capsídeo e do genoma viral do HPV-16. (A) Partícula viral com capsídeo de padrão icosaédrico, sem envelope, composta por 72 capsômeros (SPPV, 2011). (B) Representação esquemática do genoma do HPV-16, genes da região precoce (E), genes da região tardia (L) e a LCR. As setas correspondem aos promotores responsáveis pela regulação da transcrição dos genes da região E e L (modificado de DOORBAR, 2006).

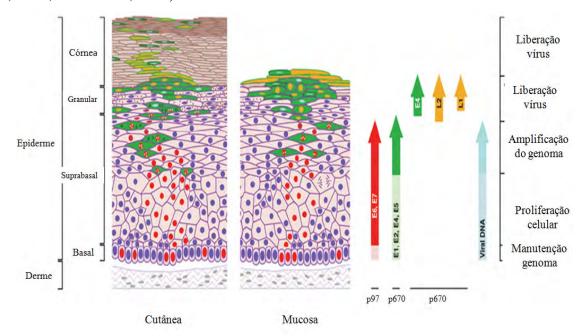
O HPV tem afinidade por células epiteliais da pele e mucosas. Dependendo do tipo de vírus, pode causar proliferação benigna ou maligna. Os diferentes tipos de HPV são definidos como tendo mais de 10 % de diferença em regiões específicas do seu genoma. Portanto, determinados tipos virais com diferentes formas de interação determinam, em conjunto, o potencial oncogênico do vírus. A infecção de pele e mucosas pelo HPV ocorre através 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.

A infecção pelo papilomavírus (Figura 2) exige a disponibilidade de células epiteliais da epiderme ou da mucosa que são capazes de proliferação, onde o ciclo de vida produtivo do vírus ocorre juntamente ao ciclo de diferenciação das células do hospedeiro infectado. A

infecção inicial pelo HPV ocorre em células basais, uma única camada de células proliferativas indiferenciadas (STANLEY, 2008).

As células escamosas epiteliais normais se dividem como células tronco e formam o epitélio estratificado. Após a divisão uma das células-filhas migra para a superfície do epitélio e começa a sofrer diferenciação terminal enquanto a outra permanece na camada basal desempenhando um lento ciclo para manter a renovação da população celular (WATT, 1998; DOORBAR, 2006; NARISAWA-SAITO & KIYONO, 2007).

O acesso às células basais acontece por meio de microlesões causadas por diversas formas de trauma físico e pela interação com certos receptores como α6β1 e α6β4 integrina (YOON et al., 2001; PSYRRI & DIMAIO, 2008). Nas células infectadas da camada basal são sintetizados baixos níveis de DNA viral, formando aproximadamente 50 a 100 cópias epissomais do genoma viral por célula (PETT & COLEMAN, 2007). A infecção das células basais pelo HPV leva à ativação de uma cascata de expressão de genes virais que resulta na replicação de seu genoma, no entanto, a expressão destes genes é amplamente reprimida, existindo apenas uma limitada expressão de genes virais específicos da região precoce. Os primeiros genes virais a serem expressos são os fatores de replicação, E1 e E2, que formam um complexo que se liga à origem de replicação e atua no sentido de recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias que mediam a replicação de DNA (CONGER et al., 1999; STANLEY, 2008).



**Figura 2:** Ciclo viral do Papilomavírus Humano (HPV). Através de microlesões o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio. Ao migrar para as camadas suprabasais os genes virais são ativados, o DNA do vírus é replicado e as proteínas do capsômero são sintetizadas. As partículas

virais formadas são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outras células (modificado de DOORBAR, 2006).

A replicação viral ocorre exclusivamente no núcleo da célula hospedeira e o genoma viral pode interagir com o DNA celular de forma epissomal (vegetativa) ou integrada (KANODIA et al., 2007). Assim, há dois modos de replicação do HPV: o primeiro ocorre nas células da camada basal do epitélio, onde o genoma viral é distribuído às células filhas, principalmente quando o DNA pró-viral encontra-se integrado ao genoma da célula hospedeira. O segundo modo de interação é chamado epissomal ou vegetativo, e a replicação do HPV ocorre nas camadas mais diferenciadas do epitélio, não havendo integração do DNA viral ao genoma celular. Neste caso, são produzidas múltiplas cópias do DNA do HPV que serão envolvidas pelo capsídeo protéico formando assim as partículas virais maduras denominadas vírions (ZUR HAUSEN, 2002; DOORBAR, 2006).

Nas lesões benignas (por exemplo, verrugas) o genoma do HPV está presente na sua forma epissomal, enquanto que em lesões malignas o genoma é tipicamente integrado. Sugere-se que a integração do DNA pode alterar a expressão gênica viral (MADKAN et al., 2007). Os 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. Pterogyne nitens e alcalóides guanidínicos

Entre as plantas brasileiras, *Pterogyne nitens* Tulasne (Figura 3) pertence à família Fabaceae e subfamilia Caesalpinoideae, sendo a única espécie do gênero e representa uma fonte de inúmeros alcalóides guanidínicos citotóxicos (BOLZANI et al., 1995). É uma planta pouco estudada dos pontos de vista químico e biológico, possuindo uma quantidade de flavonóides e alcalóides. Popularmente, é conhecida como amendoim, amendoim-bravo, viraró, madeira nova, pau-amendoim, óleo-branco, pau-de-fava, bálsamo (FERNANDES et al., 2008; REGASINI et al., 2008a). A madeira do "amendoim-bravo" apresenta-se moderadamente densa e relativa resistência física, sendo amplamente empregada na construção civil (CARVALHO, 1994; COLETTI et al., 2010).

Apresenta-se como uma espécie perene, ereta, arbórea de folhas glabras, de 10 a 15 m de altura, nativa do Brasil, bem como na Argentina, Bolívia e Paraguai. Propaga-se por sementes, contudo expande-se no local através de brotações de suas raízes, formando grandes

reboleiras. No território brasileiro, essa planta ocorre com freqüência na região de Mata Atlântica e do Cerrado, compreendida entre o Ceará até o Paraná (BUKART, 1952). É típica da floresta semidecídua da Bacia do Paraná, e perpetua-se nas áreas após o desmatamento, vindo a germinar e rebrotar intensamente nas pastagens implantadas no local, tornando-se indesejável. Seu maior inconveniente é o caráter tóxico das folhas novas de suas brotações que podem ser ingeridas pelo gado bovino. Muito prolífera e persistente, pode ser encontrada em grandes densidades mesmo após dezenas de anos de desmatamento (LORENZI, 2000).

A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. O estudo sobre a composição micromolecular das flores foi bastante significativo para o registro do perfil metabólico da espécie. Desse estudo foram isolados e identificados onze constituintes: quatro flavonóides, quatro derivados do ácido cinâmico, dois alcalóides guanidínicos e o ácido gálico (REGASINI et al., 2008 a; REGASINI et al., 2008 b).

Em trabalhos fitoquímicos anteriores, foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, os quais demostraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo supostamente apresentar ação antitumoral (BOLZANI et al, 1995). Ainda, frações obtidas do extrato etanólico de *P. nitens* apresentaram atividade antioxidante (VELLOSA, 2005) e antifúngica (REGASINI et al., 2010).

Contudo, esta espécie possui valor ornamental muito grande, não somente pela beleza e odor de suas flores, bem como de sua folhagem brilhante e frutificação, que apresenta tons variáveis à medida que amadurecem, sendo recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias e, na reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas (LORENZI, 2000b; TONIN et al., 2005, REGASINI et al., 2007).





**Figura 3:** Planta *Pterogyne nitens* em seu habitat. (A) Árvore completa. (B) Detalhe das folhas e flores (LORENZI, 2000).

## 1.3.1. Nitensidina A

Com o intuito de buscar agentes anticarcinogênicos em substâncias isoladas de produtos naturais, foram obtidos os alcalóides guanidínicos de *Pterogyne nitens*, denominados de nitensidinas A-E. A análise da estrutura química permitiu a caracterização das diferentes nitensidinas. Esses alcalóides apresentam-se substituídos por unidades terpênicas, tais como isopentilas e geranilas (REGASINI, 2008). No presente estudo foi utilizado o alcalóide denominado de nitensidina A e com a estrutura química apresentada na Figura 4.

Figura 4: Fórmula estrutural do metanossulfonato de nitensidina A (REGASINI, 2008).

Estudos com alcalóides guanidínicos pteroginina e pteroginidina isolados de *Pterogyne nitens* demonstraram que houve indução de apoptose e/ou necrose em células humanas de carcinoma epitelial (ZR 7531), podendo concluir que tais alcalóides apresentam atividade antineoplásica através da indução de morte celular programada (DUARTE et al., 2010). Sendo assim, é necessária a realização de experimentos que comprovem se há indução de apoptose (precoce e/ou tardia) e necrose, nas linhagens de carcinoma cervical imortalizadas (SiHa) e não imortalizadas (C33A).

## 1.4. 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, 2005).

A proliferação celular é modulada por múltiplos sinais, sobrevida e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência (FOSTER, 2008; MESTER & REDEUILH, 2008). 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

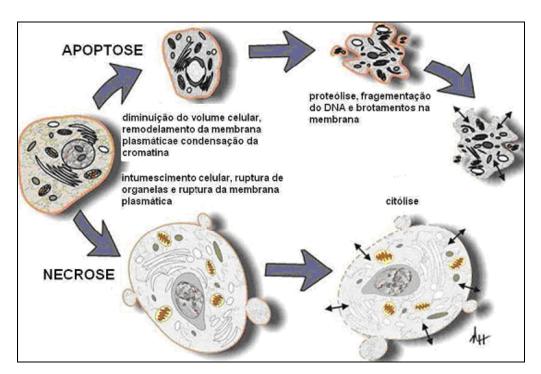
tóxicos ou deletérios à célula podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares (BAYLY et al., 1997; COTRAN, et al., 2000; FOSTER, 2008; KUWANA & NEWMEYER; 2003).

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 molecular da célula. A célula em apoptose (Figura 5) caracteriza-se por uma diminuição no tamanho, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, levando ao aparecimento de núcleo picnótico, formação de vacúolos autofágicos, dilatação de organelas citoplasmáticas como mitocôndria e complexo de Golgi, mas sem resposta inflamatória. Isso demonstra que a mitocôndria coordena os sinais de morte celular. Por fim, ocorre uma desintegração controlada da membrana formando os corpos apoptóticos (BRAS et al., 2005).

Por outro lado, 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 conseqüência, na morte da célula, é chamado de necrose (BRAS et al., 2005), que pode ser definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS et al., 2005). Nesse processo ocorre o rompimento de organelas e da membrana plasmática e também a liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local (BOUJRAD et al., 2007, KERR et al., 1995). Mesmo que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (KERR et al., 1995).

Na fase precoce da apoptose, na membrana plasmática, ocorre a translocação de fosfatidilserina (PS), da face interna para a face externa, podendo ser detectado pela ligação com a anexina V (WATANABE et al., 2002). Ao utilizar-se anexina V marcada com FITC para detecção de apoptose é possível avaliar os níveis de PS expostas na membrana celular externa que se associaram à anexina V, indicando fase inicial de apoptose (apoptose precoce). Ao utilizar o iodeto de propídeo (IP) pode-se mensurar células com permeabilidade de membrana, o que poderia indicar fase tardia de apoptose ou necrose (PEC et al., 2003). Assim, as células em necrose ou em apoptose tardia exibem os mesmos padrões característicos, especialmente quanto à permeabilidade de membrana. Tanto no processo de apoptose tardia quanto na necrose, a anexina V pode atravessar a membrana permeabilizada ao mesmo tempo em que o IP entra no citosol. Dessa maneira pelo ensaio de anexina V fica difícil diferenciar os dois estágios de apoptose: precoce e tardia. Ainda, estudos prévios

consideram a presença de dupla marcação referente à anexina V e ao IP possa ser interpretado como células em apoptose tardia (PEC et al., 2003). Portanto, estudo complementar ao ensaio de anexina V é fundamental, utilizando o método de marcação com Hoechst e IP, permitindo caracterizar com maior eficiência as diferenças entre apoptose precoce, tardia e necrose.



**Figura 5:** Características morfológicas de apoptose e necrose. (Figura extraída e modificada de HAIL et al., 2006).

## 1.4.1. Apoptose e anexina V

A apoptose também é acompanhada de perda de simetria da membrana e exposição de PS da face intracelular para a superfície celular. A expressão de PS 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 fosfolípideos de membrana na presença de Ca<sup>2+</sup>. A anexina V é um ligante altamente específico a PS e de ocorrência natural (MUNOZ et al., 2007). Portanto, a presença de PS em células apoptóticas pode ser medida *in vitro* com anexina V conjugada com fluorocromos (VAN GENDEREN et al., 2008). 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 e boa correlação clínica, além de oferecer a possibilidade de detectar as fases inicias da apoptose (VAN GENDEREN et al., 2008).

## 1.4.2. Hoechst / Iodeto de Propídeo

O ensaio de marcação com Hoechst (HO) e iodeto de propídeo (IP) permite caracterizar com maior eficiência as diferenças entre apoptose precoce, tardia e necrose. É um ensaio de fundamental importância para complementar os estudos feitos com anexina V (KIECHLER & ZHANG 2003).

Corantes fluorescentes como o Hoechst 33342 são amplamente utilizados para determinar a concentração de DNA e para corar núcleos avaliados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo que emite fluorescência azul quando se liga ao DNA. A bisbenzidina Hoechst 33342 é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, sendo utilizados para avaliação de ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis. Este corante é frequentemente incubado na presença de substâncias indutoras de apoptose, juntamente com células vivas por minutos até horas (KIECHLER & ZHANG 2003). Este corante é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais da apoptose, enquanto a membrana citoplasmática íntegra está impermeável ao IP. Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células. Desta forma, a combinação do Hoechst 33342 e o IP têm sido intensamente utilizadas para a diferenciação dos estágios de apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Pode-se também adicionar o corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca células com membrana celular intacta, mesmo as apoptóticas de verde, sendo um ensaio de três espectros coloridos diferentes. Assim as células são avaliadas de acordo com a coloração e morfologia em citoplasma verde e núcleo azul intacto (células viáveis), núcleo azul condensado e fragmentado (apoptose precoce), núcleo vermelho condensado e fragmentado (apoptose tardia) e núcleo intacto vermelho (necrose) (HASHIMOTO et al., 2003).

Para que os estudos sejam completos é necessário que haja ensaios que comprovem a genotoxicidade e mutagenicidade do composto testado, nitensidina A, para avaliar seu efeito nos ensaios, como no teste do cometa e também no teste do micronúcleo, respectivamente.

## 1.5. Genotoxicidade e Mutagenicidade

Desde os tempos mais remotos, plantas medicinais são utilizados para tratar doenças. Historicamente, as plantas e os microrganismos têm provido à indústria farmacêutica compostos importantes para a síntese de novos fármacos. Ainda, as plantas medicinais se tornaram uma importante fonte de quimioterápicos (MANSOUR et al., 2007). Atualmente, a validação do uso terapêutico de plantas medicinais é considerado uma etapa crucial no desenvolvimento de agentes fitoterápicos de baixo custo (CAVALCANTE et al., 2007).

Dessa forma, metabólitos de plantas vêm sendo estudados a fim de avaliar sua capacidade de modificar a atividade de agentes mutagênicos e carcinogênicos. As plantas possuem uma série de compostos que poderiam apresentar efeito protetor contra danos no DNA (DHIR et al., 1993; COZZI et al, 1997; CAVIN et al., 2001). Os danos causados ao DNA por mutagênicos ambientais podem ser nocivos para diversos organismos, incluindo os seres humanos. O acúmulo de mutações está relacionado ao desenvolvimento da maioria dos tumores malignos e desordens degenerativas, assim como a idade e anomalias genéticas (CUZZOCREA et al., 2001; MIGLIORE & COPPEDE, 2002). A fim de prevenir o risco genotóxico, é pertinente tanto identificar os mutagênicos e diminuir a exposição a eles, como também, aumentar a exposição a compostos antigenotóxicos como os que ocorrem naturalmente nas plantas (IKUMA et al., 2006; JEONG et al., 2006).

Contudo, é importante que se faça a análise da substância-teste acompanhada de testes *in vivo*, para que haja uma identificação da genotoxicidade e mutagenicidade dos compostos a serem testados.

## 1.5.1. Ensaio Cometa

O ensaio do cometa é um método sensível e versátil para medição de quebras de fita simples e dupla no DNA (COLLINS et al., 2008). O ensaio do cometa foi desenvolvido empiricamente por meio de dois protocolos relativamente simples descritos na literatura por Singh et al. em 1988 e Olive em 1989. O primeiro protocolo foi desenvolvido para mensurar pequenos níveis de quebras de DNA com alta sensibilidade, enquanto o segundo foi otimizado para detectar uma subpopulação celular com sensibilidade variável a determinados compostos quimicos ou radiação. No presente estudo, procedimentos de Singh et al. foram selecionados para os estudos de genotoxicidade (FAIRBAIRN et al., 1995). O pH alcalino do ensaio do cometa permite detectar um espectro amplo de lesões ao DNA, incluindo quebras

únicas, sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas (TICE et al., 2000). As vantagens desse teste incluem sua aplicabilidade a vários tecidos e/ou tipos celulares específicos, a grande sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos no DNA, a necessidade de utilizar um pequeno número de células por amostra, sua fácil execução, o curto tempo necessário para obter resultados e o seu relativo baixo custo (TICE et al., 2000). Mais especificamente, o ensaio cometa pertence à classe de testes indicadores, pois é capaz de detectar danos precoces de DNA e que podem futuramente originar mutações. Quando comparado a testes como o de micronúcleo ou de aberrações cromossômicas, o ensaio cometa mostra-se capaz de detectar danos mais recentes e passíveis de serem reparados (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; MOLLER, 2005).

Nos casos onde é relevante especular que determinado tratamento induz danos ao DNA em órgãos específicos (estômago, rins, bexiga, etc), o ensaio cometa é considerado o método mais confiável (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

### 1.5.2. Ensaio de micronúcleo

Os micronúcleos são pequenas massas intracitoplasmáticas resultantes tanto de quebras cromossômicas durante a divisão celular, como de cromossomos com atrasos na anáfase (KIRSCH-VOLDERS et al., 2000).

O micronúcleo é literalmente um núcleo pequeno, considerado um produto de quebra do DNA genômico de células eucarióticas. Durante a divisão celular, o material genético é duplicado e igualmente distribuído entre as duas células filhas. A radiação ou substâncias químicas podem ocasionar quebra ou dano cromossômico, afetando a distribuição do material genético entre as células filhas. Partes ou pedaços dos cromossomos, resultantes desse dano, podem ser distribuídos a qualquer uma das células filhas, e, ao não ser incorporado no novo núcleo, pode se apresentar sob a forma de micronúcleo claramente observável à microscopia óptica comum.

Heddle et al. (1991) afirmaram que os micronúcleos são originados de fragmentos acêntricos de cromossomos ou danos cromossômicos os quais são ocasionados por: perda mitótica de fragmento acêntrico; ação mecânica ocasionando quebra cromossômica; danos cromossômicos ocasionados por falha no filamento mitótico durante a anáfase ou apoptose.

Davies et al., (1998) postulam que, no momento da identificação da frequência de micronúcleos de células nucleadas, alguns critérios devem ser seguidos: os micronúcleos devem ser morfologicamente idênticos, porém menor do que o núcleo da célula e com

refração similar; apresentar diâmetro entre 1/3 a 1/6 do tamanho do núcleo; ter a forma ovalada ou arredondada.

Devido à sua simplicidade, confiabilidade e sensibilidade, o teste tem sido requisitado para a avaliação de mutagenicidade de substâncias, entre eles, produtos naturais, os quais podem exercer atividades clastogênicas (capacidade ou predisposição à quebra cromossômica), aneugênicas (capacidade ou predisposição de alterar o fuso mitótico resultando na perda de cromossomo), ou ambas (TOROUS, et al., 1998). Adicionalmente, o teste de micronúcleos é recomendado pelo OECD (Organization for Economic CO-Operation & Economic Development) como requerimento para testes em novos produtos químicos (VANPARYS et al., 1992).

A combinação dessas duas metodologias é recomendada para determinar os efeitos que substâncias poderiam exercer sobre o DNA. Principalmente porque ambas possuem como característica a capacidade de, respectivamente, avaliar danos de DNA em estágios específicos do ciclo celular (CAVALCANTI et al., 2006; RIVA et al., 2007).

## 1.6. Carcinogênese em camundongos nude BALB/c

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação de câncer, ocorre de uma maneira lenta, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível. Para chegar a um tumor esse processo passa por vários estágios (INCA, 2010).

No primeiro estágio ocorre a modificação de alguns genes, as células estão geneticamente alteradas. Já no segundo estágio essas células alteradas sofrem o efeito de agentes cancerígenos (oncopromotores), sendo então transformada em célula maligna. O último estágio se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, assim o câncer já está instalado e surgem então os primeiros sintomas da doença.

A carcinogênese também pode ser induzida de maneira acelerada, através de implantes xenográficos em camundongos com timo ausente. Essa indução subcutânea pode ser utilizada como modelo para explorar terapias antitumorais (LIEBMAN, et al., 2007). A implantação das células tumorais pode acontecer de duas maneiras, elas podem ser inoculadas na cavidade intraperitoneal e se desenvolver formando um tumor ascítico, ou seja, na sua forma líquida e também células inoculadas subcutaneamente formando tumores sólidos (OLIVEIRA-JUNIOR, 2008). O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI & XU, 2006).

Estudos demonstram que a partir da alta freqüência de lesões induzidas por HPV em indivíduos imunodeprimidos, e da presença de linfócitos T e macrófagos infiltrados em papilomas que regridem espontaneamente, o sistema imune exerce um papel de controle em doenças associadas ao HPV. Respostas celulares imunes, especialmente as linfócitos T - antígeno específicas são o mecanismo de defesa mais importante no combate à infecção por HPV. Experimentos realizados com camundongos *nude* BALB/c são apropriados para o implante tumoral xenográfico de células SiHa, pois são animais que apresentam deficiência em seu sistema imunológico (KAUFMANN, et al., 2001). Dessa forma, com o implante tumoral facilitado por animais imunodeprimidos, poder-se-á verificar se a nitensidina A é capaz de inibir o crescimento tumoral.

# 1.6.1. Análise histológica em camundongos nude BALB/c

Hanahan e Weinberg (2000) propuseram que as características do câncer, juntas, constituem um principio organizado que proporciona uma estrutura lógica para entender a diversidade do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000). As características do câncer humano compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante varias etapas do desenvolvimento (sustentar a sinalização proliferativa, evitar supressores de crescimento, ativar a invasão e a metástase, possibilitar a imortalidade replicativa, induzir a angioênese e resistir à morte celular) (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Em 2011, Hanahan e Weinberg reportaram que este conceito progrediu na última década e discutiram a nova 'caracterização do câncer' como 'evitar a destruição imunológica', 'promover a inflamação tumoral', 'desregular o metabolismo celular' 'apresentar instabilidade mutação geônmica'(HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Ativação da invasão e a metástase: O processo multi-etapas de invasão e metástase é uma sequência de passos, e formas distintas de invasão foram identificadas em diferentes tumores(HANAHAN & WEINBERG, 2011)

O indicador de mitose (MI: porcentagem de células mitóticas), que é definido como a soma de figuras mitóticas (MFs) por 10 campos de alta potência (HPF) na área mais proliferativa tem sido correlacionada com a velocidade de proliferação da célula e tem um fator de prognóstico significante (POPIOLEK et al., 2004).

# 2. Objetivos

#### 2.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo, verificar a atividade antitumoral, genotóxica e mutagênica de nitensidina A, por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, empregando modelo de implantação xenográfica de células imortalizadas com HPV 16 (SiHa), em camundongos *nude* BALB/c.

# 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade e determinar a concentração inibitória de 50 % das células (CI<sub>50</sub>), nas linhagens de carcinoma cervical imortalizadas pelo HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C33-A);
- Avaliar quantitativamente a apoptose e necrose celular, utilizando o ensaio de anexina
   V por citometria de fluxo em linhagens celulares epiteliais cervicais imortalizadas pelo
   HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C33-A);
- Avaliar qualitativa e quantitativamente a apoptose e necrose celular, para diferenciação de apoptose precoce, tardia e necrose, utilizando os corantes de Hoechst e iodeto de propídeo, em linhagens celulares epiteliais cervicais imortalizadas pelo HPV-16 (SiHa) e não imortalizadas (C33-A);
- Implantação subcutânea xenográfica de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa) em camundongos *nude* BALB/c, observando a diminuição ou progressão do implante tumoral;
- Detectar danos tardios no DNA em células de medula óssea retirada do fêmur de camundongos *nude* BALB/c com implante para avaliação da mutagenicidade por meio do ensaio do micronúcleo;
- Detectar danos precoces de DNA no sangue caudal de camundongos *nude* BALB/c com implante tumoral, para avaliação de genotoxicidade por meio do teste do cometa;

 Analisar os locais de invasão do tumor xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa) nos camundongos *nude* BALB/c, bem como avaliar o índice mitótico e necrose dos tumores xenográficos.

# 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Procedimentos fitoquimicos: obtenção de nitensidina A

O processo de obtenção do alcalóide guanidínico, nitensidina A, foi realizado nas dependências do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), 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 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) 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 extração líquido-líquido empregando-se acetato de etila e posteriormente *n*-butanol, obtendo-se três frações.

A fração *n*-butanólica foi acidificada com CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H aquoso (25 %) e levada à partição líquido-líquido em CHCl<sub>3</sub>. A fração clorofórmica foi descartada e a fração aquosa foi tratada com NH<sub>4</sub>OH até pH 7 e novamente submetida à partição líquido-líquido em CHCl<sub>3</sub>. A fração clorofórmica foi evaporada, obtendo-se a fração alcaloídica.

A fração alcaloídica foi cromatografada por sucessivas colunas de gel de sílica, eluídas em CHCl<sub>3</sub>:MeOH (0-25% de MeOH), obtendo-se o metanossulfonato de nitensidina A, o qual teve sua estrutura molecular identificada por técnicas espectroscópica, tais como: RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C.

#### 3.2. Cultura de células – SiHa e C33A

O potencial efeito citotóxico de nitensidina A foi avaliado na linhagem de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV-16 (SiHa-ATCC:HTB-35) e não imortalizada pelo HPV (C33A-ATCC:HTB-31). As linhagens *American Type Culture Collection* (ATCC) foram cedidas pela Dra. Luiza Lina Villa, do Laboratório de Virologia, do Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer. As linhagens SiHa e C33-A foram cultivadas em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F10 (Sigma Co., St. Louis, USA) acrescido de 100 U/mL de penicilina, 100

μg/mL de estreptomicina, 0,25 μg/mL de anfotericina B, 0,1 mg/mL de kanamicina (Sigma) e 10 % de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas, Brasil). As células foram cultivadas em frascos de cultura, mantidas a 5% de CO<sub>2</sub> e a temperatura de 37 °C até que a monocamada celular estivesse confluente. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,35 g de NaHCO<sub>3</sub>, 1 g de glicose, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1000 mL) e tripsinizadas acrescentado-se 1 mL 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 um frasco foi transferida para outros frascos, de modo a obter 10<sup>5</sup> células/frasco. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para os experimentos.

# 3.3. Tratamento das Linhagens Celulares e dos Animais

Para todos os experimentos as células foram tratadas por diferentes concentrações (0,25 μg/mL; 0,74 μg/mL; 2,22 μg/mL; 6,66 μg/mL; 20 μg/mL) de nitensidina A. Como controle positivo, utilizou-se a doxorrubicina 50 μg/mL (exceto para o teste do MTT que foi utilizado 15 μg/mL), como controle de veículo o meio de cultura contendo 1 % de DMSO (v/v) e como controle negativo foi utilizado somente meio de cultura. Todos os testes foram realizados com três experimentos independentes em três replicatas.

Para os ensaios de citotoxicidade (MTT), foi utilizada uma suspensão de  $5\times10^4$  células/mL das linhagens SiHa e C33-A. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, e após 24 h de cultivo, foram tratadas com o nitensidina A. As células foram tratadas por 24 h. Para avaliar o efeito de pós-tratamento, as células foram tratadas por 24 h e com tempo de recuperação de 24 h em meio fresco sem tratamento, procurando avaliar o potencial efeito concentração-resposta para citotoxicidade.

Para os ensaios de apoptose por citometria de fluxo com anexina V, cerca de  $1\times10^5$  células/poço foram cultivadas em placas de 12 poços por 24 horas para a formação da monocamada confluente. Depois do crescimento, as células foram tratadas nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de citotoxicidade empregando MTT. Para o ensaio de apoptose complementar ao teste da anexina V, o método do Hoechst e IP, foram plaqueadas  $2\times10^5$  células/mL em placas de 12 poços (1 mL/poço). Nos dois testes utilizou-se 24 e 48 h como tempos de tratamento.

44

Para todos os experimentos *in vivo* as doses utilizadas foram de 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c. de nitensidina A, concentrações pré estabelecidas através de ensaios realizados anteriormente (piloto). Como controle positivo foi utilizado doxorrubicina a 0,500 mg/kg p.c., controle de veículo DMSO 1 % (v/v) e como controle negativo foram feitos dois testes, animais sem tratamento nenhum (sem indução tumoral, análise somente dos órgãos) e animais tratados com salina a 0,9%.

#### 3.4. Citotoxicidade com MTT

O método de citotoxicidade empregado foi MTT utilizado para a avaliação de citotoxicidade. Esse tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 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 no item 3.3, o meio de cultura foi removido e 5 mg/mL de MTT em PBS foram adicionados em cada poço, as células na microplaca foram incubadas a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (3 h). Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 L de álcool isopropílico absoluto foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540 nm, foi realizada em leitor de placas (Bio-Tek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc.,USA). A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG et al. 2004:

Células vivas (%) = Absorbância do teste x 100

Absorbância do controle negativo

#### 3.5. Ensaios de Apoptose

#### 3.5.1. Anexina V

Após o tratamento e período de recuperação (descrito no item 3.3), as células foram tripsinizadas, transferidas para microtubos estéreis e centrifugadas por 10 minutos. As células foram lavadas com meio de cultura e centrifugadas novamente. Para o ensaio da anexina V foi utilizado o kit de detecção de apoptose por anexina-V conjugada com FITC (Alexis, Lausen, Switzerland). A seguir, as células foram ressuspendidas com 500 L de tampão de ligação, 5 L de anexina V conjugada com FITC, e 5 L de IP. A reação foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A intensidade de fluorescência (FITC e IP) foi avaliada utilizando o equipamento FACSCanto (Bencton Dickinson, USA), nas dependências do laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

## 3.5.2. Hoechst e iodeto de propídeo

O ensaio citomorfológico para detecção de células apoptóticas, utilizando os corantes Hoechst 33342 e iodeto de propídeo foi realizado nas linhagens celulares (SiHa e C33A) tratadas com nitensidina A conforme descrito no item 3.3.

A avaliação de células apoptóticas e necróticas foi realizada pelo método de exclusão de fluorocromos, utilizando-se uma solução fluorescente, contendo DAF, IP, e HO 33342 (Invitrogen®). Após o tratamento com nitensidina A, o meio de cultura foi recolhido (células mortas em suspensão), as células aderentes foram tripsinizadas, e ambas foram centrifugadas. Na suspensão celular de 100 μL foi acrescentada uma solução de fluorocromos, contendo 25 % da solução aquosa de IP (1 mg/mL), 50 % da solução de DAF em DMSO (1,5 mg/mL), 10 % da solução aquosa de HO (1 mg/mL) e 15 % de PBS. A reação foi incubada por 5 minutos a 37 °C e as células foram observadas em microscopia de fluorescência, em espectro de absorção em dois comprimentos de ondas de 360 nm e 538 nm.

Em seguida, a apoptose foi avaliada qualitativa e quantitativa, estabelecendo-se a porcentagem de células em apoptose precoce, tardia e em necrose, levando-se em consideração a morfologia e coloração das células. As células foram classificadas como normais (núcleo azul esférico corado pelo HO, citoplasma verde, em espectro de absorção 360 nm), apoptóticas (núcleo azul com corpos apoptóticos corado pelo HO, citoplasma verde, em

espectro de absorção 360 nm), e necróticas (núcleo vermelho esférico ou em vesículas corado pelo IP, citoplasma vermelho, em espectro de absorção 538 nm). Ainda, as células foram classificadas em apoptose precoce (núcleo em azul e morfologia nuclear com corpos apoptóticos), apoptose tardia (núcleo corado em vermelho e com presença de corpos apoptóticos) e necrótica (núcleo preservado e com coloração em vermelho) segundo proposto por KOROSTOFF et. al. (1998) e HASHIMOTO et al. (2003).

#### 3.6. Ensaios in vivo

# 3.6.1. Camundongos nude BALB/c

O experimento foi realizado com camundongos *nude* BALB/c, fêmeas de 6 a 8 semanas de idade (Comitê de Ética em Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP – processo nº 63/2009), que apresentavam deficiências no sistema imunológico (ausência de timo). Os animais foram adquiridos da Comissão Nacional de Energia Nuclear - IPEN/CNEN-SP, Centro de Biotecnologia e foram mantidos em uma isoladora, dentro de gaiolas com ração, água (*ad libitum*) e maravalha devidamente autoclavadas, com controle de claro e escuro a cada 12 horas.

Os animais foram submetidos a uma sessão de radioterapia em acelerador de partículas e receberam 1.37 Gy/min., no Centro de Oncologia da Região de Araraquara (CORA), sob responsabilidade do físico Francisco Carlos Campos Azevedo, com o objetivo de destruir as células de defesa (linfócitos) e assim facilitar a implantação das células tumorais (SiHa). O experimento foi realizado após o implante de células com cinco animais por grupo, com um total de 5 grupos. Nas concentrações 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c. foram realizados os testes do cometa, micronúcleo e de volume tumoral, contando ainda com os grupos de controle positivo (CP), controle negativo (CN) e controle de veículo (CV).

#### 3.6.2. Implantação tumoral xenográfica de SiHa em camundongos nude BALB/c

A implantação das células tumorais (SiHa) nos camundongos *nude* foi realizada no momento em que as células apresentaram confluência de aproximadamente 80 % da área do frasco (75 cm²). A tripsina foi adicionada (0,5%) e deixada na estufa a 37 °C por até três minutos para que as células desprendessem da garrafa. As células foram ressuspendidas e transferidas para o tubo de centrífuga de 15 mL. A partir de uma alíquota foram contadas o

número de células viáveis utilizando azul de tripan. Aliquotou-se o número necessário de células (1,5 x 10<sup>7</sup> cels./mL), aspirou-se o meio e as células foram ressuspensas em PBS. As células foram centrifugadas e ressuspendidas em volume final de PBS. Aspirou-se cuidadosamente (0,2 mL) com seringa de insulina e injetou subcutaneamente no flanco dorsal do animal. O crescimento do tumor foi acompanhado diariamente até que o tumor atingisse 5 mm de diâmetro (SIMONART, et al., 2003).

#### 3.6.3. Administração de nitensidina A em camundongos nude BALB/c

O tratamento com nitensidina A (0,2 mL) de duas concentrações 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c.foi feito após 35 dias da realização da indução do tumor, período em que este apresentou-se com aproximadamente 5 mm de diâmetro. Os camundongos foram pesados antes do implante celular e após 35 dias, o peso dos camundongos e o tamanho do tumor foram acompanhados e medidos em dias alternados. O tratamento intratumoral foi realizado em três dias, com intervalo de dois dias para cada dose de nitensidina A. Após o tratamento os animais foram sacrificados em uma câmara de CO<sub>2</sub>. Os órgãos rins, baço, fígado, pulmão, o tumor e o fêmur de cada animal foram retirados, pesados e lavados com solução salina 0,9 % (m/v). Cada tumor foi medido com um paquímetro para determinar o volume tumoral.

O volume tumoral foi calculado de acordo com a fórmula (LIEBMAN, 2007):

#### Volume do tumor = comprimento x largura x altura.

Os tumores foram colocados em tubos contendo formol para conservação, onde permaneceram por 48 horas. Depois foram colocados em álcool 70 % indefinidamente, até o momento de processamento da amostra.

#### 3.6.4. Estudos histológicos

A inclusão de todos os órgãos (rim, baço, fígado e pulmão) e dos tumores, em parafina e a preparação das lâminas foram realizadas com o auxílio do médico patologista Dr. Nicolino Lia Neto, responsável pelo Instituto de Patologia Cirúrgica e Citopatologia de Araraquara (IPC), e a análise dos resultados foi realizada pelo Dr. Cleverton Roberto de Andrade do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP – Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

Os órgãos, assim que retirados dos animais, foram colocados em tubos, contendo formol para sua fixação, durante 48 horas, posteriormente foram colocados em álcool 70 % e levados ao IPC. No IPC eles foram submetidos a baterias de álcool 70 %, álcool 80 %, álcool 90 %, passados para o álcool absoluto por três vezes, álcool/xilol e passados no xilol também por três vezes consecutivas. Depois disso foram incluídos na em duas baterias consecutivas de parafina. Então foi realizado um corte no micrótomo com três micra e colocados em lâmina na estufa com a finalidade de fixar os cortes histológicos.

Após passar por todas as etapas mencionadas acima, foi realizado o processo de coloração pelo método de hematoxilina e eosina. No processo da coloração as lâminas foram passadas três vezes no xilol por três minutos cada, em seguida foram passadas no álcool/xilol, quatro vezes durante três minutos. Logo após foram imersas em álcool 90 % durante três minutos, no álcool 80 % por três minutos e no álcool 70 % por mais três vezes e também durante três minutos. Então as lâminas foram deixadas na hematoxilina por quatro minutos, colocadas na água por mais um minuto, na eosina por trinta segundos e lavadas rapidamente na água. Em seguida passaram rapidamente pelo álcool 95 % e no álcool absoluto por quatro vezes consecutivas. Depois disso, foram imersas no álcool/xilol, e por último, por duas vezes, no xilol e assim as lâminas estavam prontas para serem montadas com Permount.

#### 3.7. Ensaio de Genotoxicidade - Teste do Cometa

O teste do cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Singh et al. (1988). Lâminas limpas foram mergulhadas horizontalmente em agarose com ponto de fusão normal à 60 °C aproximadamente, e em seguida foram secas e armazenadas sob refrigeração para posterior utilização. Para a realização do teste do cometa, primeiramente foi preparada uma solução de lise que ficou sob refrigeração 2 h antes do uso ou até que atingisse 4 °C, depois, a agarose de baixo ponto de fusão foi diluída em solução de PBS 1X e, posteriormente

foi transferida para um banho-maria a 37 °C e os seguintes procedimentos foram executados sem a incidência direta de luz branca.

Para a realização do ensaio cometa dos animais com implante tumoral (células SiHa) e controles, foram retirados 20 µL de sangue e transferido para microtubos, onde foi adicionado 200 µL de agarose (Low melting point - Sigma) e realizada a homogeneização. A seguir, essa mistura foi distribuída sobre as lâminas previamente preparada com agarose com ponto de fusão normal e cobrimos lentamente com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas na geladeira por 15 minutos e, após esse procedimento, a lamínula foi retirada cuidadosamente e a lâmina foi mergulhada, em solução de lise, overnight, sob refrigeração ao abrigo da luz. Em seguida a eletroforese foi realizada com a cuba de eletroforese envolvida num banho de gelo, mantendo-a a 4 °C. As lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas na cuba de eletroforese, sendo demarcado o lado da lâmina que foi deixado para o pólo negativo, a fim de que os cometas (fragmentos de DNA) não fossem perdidos na solução-tampão durante o desenvolvimento eletroforético. Os eventuais espaços excedentes na cuba foram preenchidos por lâminas limpas, a solução tampão de eletroforese (4 °C) foi colocada na cuba de eletroforese até cobrir as lâminas e estas foram deixadas durante 20 minutos em repouso para que houvesse o relaxamento das moléculas de DNA. Em seguida, a fonte de eletroforese foi regulada para 25 V, bem como, a 300 mA e potência, sendo as lâminas submetidas ao desenvolvimento eletroforético por 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e lavadas com solução de neutralização por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto para fixação e secadas a temperatura ambiente. Para coloração das lâminas, foram utilizados 20 L de solução de brometo de etídio por lâmina e, posteriormente, a lâmina foi coberta com lamínula (24 x 60 mm). A leitura das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração em um microscópio de fluorescência com filtro de 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400 vezes. Esse aumento permitiu a observação de imagens microscópicas com contorno circular (sem danos no DNA) ou núcleo celular fragmentado em forma de "cometa" (com danos no DNA). Para a realização do ensaio cometa dos animais com implante tumoral (células SiHa) e controles, foram capturadas imagens de 100 nucleóides por alíquota de sangue da cauda dos camundongos e posteriormente analisadas pelo software TriTek CometScore TM versão 1.5. Esse software fornece os seguintes dados: tamanho dos fragmentos do nucleóide (FN) sob a forma de cometa, média da fragmentação do cometa, área da cabeça do cometa, FN da cabeça do cometa, média da FN da cabeça no cometa, porcentagem de DNA na cabeça, FN da cauda, média da FN da cauda, porcentagem de DNA na cauda, tamanho da cauda, *Tail Moment* (TM) e *Olive Moment*. A análise do TM nos permite relacionar a quantidade de DNA fragmentado com a distância que os fragmentos migraram durante a eletroforese. (MOLLER, 2005).

#### 3.8. Ensaio de Mutagenicidade - Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado segundo proposto por Salvadori et al. (2003). As lâminas foram lavadas com extran 3%, secas naturalmente e depois identificadas. Após retirar os fêmures dos animais, um corte foi feito nas epífises distais e com uma seringa contendo 1 mL de Soro Fetal Bovino (SFB), a medula óssea foi coletada, após a lavagem, e depositada em um tubo de centrífuga contendo previamente SFB. O próximo passo foi de homogeneizar com uma pipeta Pasteur e de centrifugar a 800 rpm por 10 min, então, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido com 0,3 mL do sobrenadante. Após esfregaço, as lâminas foram submetidas à coloração com May- Grunwald-Giemsa e, posteriormente as células foram analisadas microscopicamente. Foram avaliadas 1,0x10<sup>3</sup> células por lâmina, em microscópio óptico comum em magnitude de 400 vezes, A frequencia de micronúcleos foi expressa em porcentagem.

#### 3.9. Análises Estatísticas

Para os resultados de citotoxicidade, determinação da CI<sub>50</sub> foram feitas linhas de tendências lineares e por meio das equações das retas obtidas, os valores foram definidos. Para comparação dos resultados obtidos nos ensaios de anexina V, Hoechst/IP e crescimento tumoral, pelo tratamento com nitensidina A nas diferentes concentrações, foram aplicados o teste de análise de variância *oneway* (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Nos ensaios do Cometa e Micronúcleo foi utilizada a comparação entre os grupos por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's. Para avaliação do índice mitótico e necrose tumoral foi realizado o teste não paramétrico de Mann Whitney. As análises foram realizadas com software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de p < 0.05.

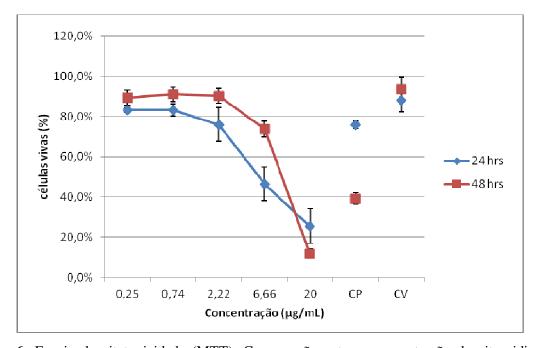
# 4. Resultados

#### 4.1. Citotoxicidade

A citotoxicidade da nitensidina A foi avaliada nas concentrações de 0,25; 0,74; 2,22; 6,66 e 20 μg/mL, solubilizadas em meio de cultura nas duas linhagens celulares – SiHa (linhagem de carcinoma cervical imortalizada com HPV-16) e C33A (linhagem de carcinoma cervical não imortalizada pelo HPV-16) e em dois tempos de tratamento (24 e 48 horas). Para determinação do CI<sub>50</sub> (concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular) foram feitas linhas de tendências lineares e por meio das equações das retas obtidas, os valores foram definidos.

Foi possível observar um aumento da citotoxicidade proporcionalmente ao aumento da concentração (efeito concentração-resposta) na substância testada na linhagem SiHa (Figura 6), 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  $\mu$ g/mL). A análise estatística foi realizada com o teste One Way ANOVA com pós-teste de Tukey. CI<sub>50</sub> nitensidina A em 24 horas: 10,3  $\mu$ g/mL (y = -0,0297x + 0,8065); CI<sub>50</sub> nitensidina A em 48 horas: 11,2  $\mu$ g/mL (y = -0,0409x + 0,9572).



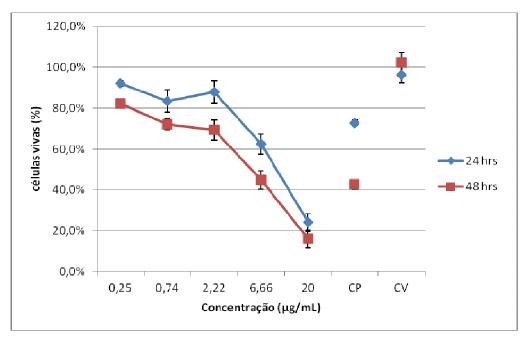
**Figura 6:** Ensaio de citotoxicidade (MTT). Comparação entre a concentração de nitensidina A e porcentagem de células SiHa vivas em diferentes tempos de tratamento. Os dados referem-se às

médias de três experimentos independentes e erro padrão ( $M \pm EP$ ). CP: controle positivo, doxorrubicina 15  $\mu$ g/mL; CV: controle de veículo, DMSO 1 %.

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 linhagem C33A foi possível observar o efeito concentração-resposta (Figura 7) e, na maior concentração (20 µg/mL), houve a maior taxa de morte celular, enquanto nas menores concentrações as taxas de morte foram baixas e sem diferença estatística nos dois tempos avaliados (24 e 48 h).

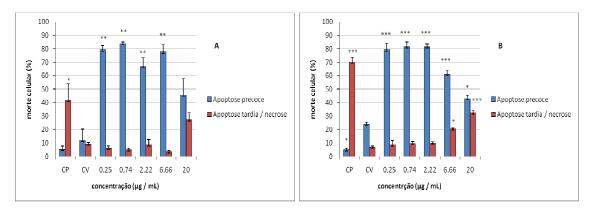
A análise estatística foi realizada com o teste One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.  $CI_{50}$  nitensidina A em 24 horas: 11,9  $\mu$ g/mL (y = -0,0337x + 0,9015);  $CI_{50}$  nitensidina A - 48 horas: 8,18  $\mu$ g/mL (y = -0,0314x + 0,757).



**Figura 7:** Ensaio de citotoxicidade (MTT). Comparação entre a concentração de nitensidina A e porcentagem de células C33A vivas em diferentes tempos de tratamento. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP: controle positivo, doxorrubicina 15 μg/mL; CV: controle de veículo, DMSO 1%.

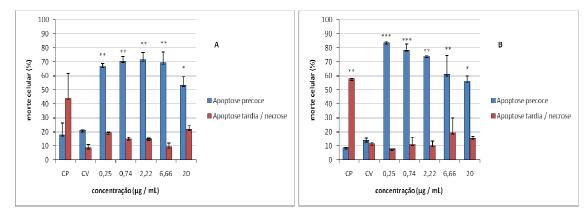
#### 4.2. Ensaio de anexina V

Com o intuito de avaliar o potencial efeito indutor de apoptose, foi realizado o ensaio de anexina V por citometria de fluxo nas linhagens SiHa e C33A tratadas com 0,25; 0,74; 2,22; 6,66 e 20,0 µg/mL de nitensidina A. Para a realização do experimento, as células foram tratadas por 24 e 48 h. Houve uma diferença na concentração do controle positivo, relacionado ao ensaio de citotoxicidade devido ao baixo índice de morte celular. Para o controle positivo, no ensaio de anexina V, a concentração adotada foi de 50 µg/mL, sendo maior que aquela empregada no ensaio de citotoxicidade (15 µg/mL). Essa variação de concentração foi devido à baixa porcentagem de células mortas na concentração de doxorrubicina no ensaio de citotoxicidade, necessitando utilizar uma concentração maior para o efeito de morte celular no ensaio de anexina V.



**Figura 8:** Ensaio de apoptose pelo teste de anexina V em células SiHa após tratamento com nitensidina A por 24 h (A) e 48 h (B). Relação entre apoptose tardia / necrose e apoptose precoce. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão (M $\pm$ EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CV). CP: controle positivo, doxorrubicina 50  $\mu$ g/mL; CV: controle de veículo; DMSO 1 %; \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

Na linhagem SiHa tratada com nitensidina A (Figura 8) foi possível observar uma elevada indução de morte celular por apoptose precoce. Na maior concentração do tratamento, 20 µg/mL, é possível observar uma menor taxa de morte celular por apoptose precoce e subsequente aumento de morte por apoptose tardia/necrose. Quanto aos tempos de tratamento é possível observar que aparentemente não houve diferença evidente entre 24 e 48 h. No tempo de 48 h é possível observar a morte celular com claro efeito concentração-resposta.



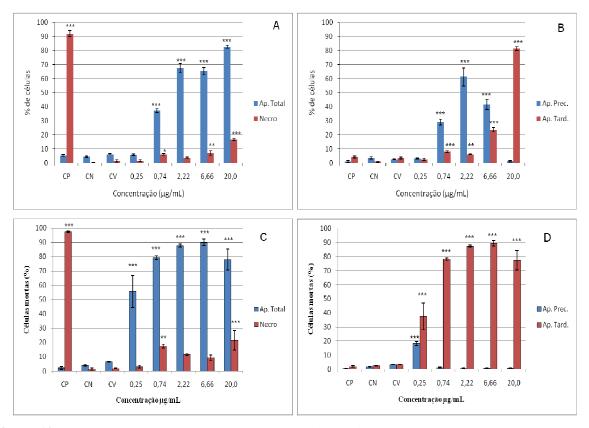
**Figura 9:** Ensaio de apoptose pelo teste de anexina V em células C33A após tratamento com nitensidina A por 24 h (A) e 48 h (B). Relação entre apoptose tardia / necrose e apoptose precoce. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão (M $\pm$ EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados *vs* CV). CP: controle positivo, doxorrubicina 50  $\mu$ g/mL; CV: controle de veículo; DMSO 1 %; \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

Na linhagem C33A (Figura 9) foi observado um perfil semelhante ao da linhagem SiHa, em ambos os tempos de tratamento. As taxas de morte por apoptose precoce foram elevadas nas concentrações testadas, sendo possível observar também um discreto aumento das mortes por apoptose tardia/necrose com o aumento da concentração (aproximadamente entre 10% a 15%). Além disso, quando se compara o tratamento por um período de 48 horas, é também possível observar o aumento de apoptose precoce e um discreto aumento de apoptose tardia/necrose nas concentrações testadas do alcalóide nitensidina A.

#### 4.3. Ensaio de Hoechst / Iodeto de Propídeo

O ensaio do Hoechst / Iodeto de Propídeo foi utilizado como ensaio complementar ao ensaio da Anexina V, diferenciando assim, a apoptose precoce, a apoptose tardia e a necrose, nas linhagens SiHa e C33A tratadas com 0,25; 0,74; 2,22; 6,66 e 20,0 μg/mL de nitensidina A. Para a realização do experimento, as células foram tratadas por 24 e 48 h. Houve uma diferença na concentração do controle positivo, relacionado ao ensaio de citotoxicidade devido ao baixo índice de morte celular. Para o controle positivo, no ensaio do Hoechst / Iodeto de Propídeo, a concentração adotada foi de 50 μg/mL, sendo maior que aquela empregada no ensaio de citotoxicidade (15 μg/mL). Essa variação de concentração foi devido à baixa porcentagem de células mortas na concentração de doxorrubicina no ensaio de citotoxicidade, necessitando utilizar uma concentração maior para o efeito de morte celular no ensaio de anexina V.

Os gráficos demonstram a apoptose por coloração Hoechst / IP em células SiHa nos dois tempos de tratamento (Figura 10).

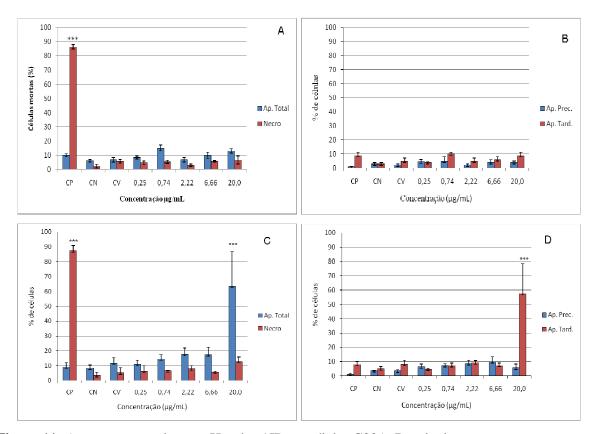


**Figura 10:** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células SiHa. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e erro padrão (M  $\pm$  EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados vs CN). A) Relação entre apoptose total e necrose de células tratadas com nitensidina A por 24 h; B) Relação entre apoptose precoce e tardia de células tratadas com nitensidina A por 24 h; C) Células tratadas com nitensidina A por 48 h, relação entre apoptose total e necrose; D) Células tratadas com nitensidina A por 48 h, relação entre apoptose precoce e tardia. CP: doxorrubicina 50 µg/mL; CN: células não tratadas; CV: controle de veículo DMSO 1 %; \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

No tratamento realizado por 24 horas com nitensidina A, na linhagem SiHa (Figura 10-A), foi possível observar um efeito concentração-resposta de aumento de apoptose quando comparada com a morte por necrose. A partir da análise da diferença entre apoptose precoce e apoptose tardia (Figura 10-B), observa-se uma maior morte celular por apoptose precoce nas concentrações de 0,74  $\mu$ g/mL (29,2%  $\pm$  2,0); 2,22  $\mu$ g/mL (61,2%  $\pm$  6,5) e 6,66  $\mu$ g/mL (41,6%  $\pm$  3,7). Em contrapartida, na maior concentração (20  $\mu$ g/mL) verificou-se uma maior morte celular por apoptose tardia com morte celular de 81,4% $\pm$  1,4.

Em 48 horas observou-se uma diferença significativa da apoptose total em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle negativo (Figura 10-C). Quanto à morte celular por necrose foi possível observar pequena porcentagem de morte, tanto quanto o controle negativo. Por outro lado, nas concentrações de 0,74 μg/mL e 20,0 μg/mL foi observada 17,4%±1,3 e 21,7%±6,8 de morte, respectivamente. Ao analisar a diferença entre apoptose precoce e apoptose tardia (Figura 10-D), foi possível observar efeito concentração resposta significativa de apoptose tardia nas concentrações de 0,25 μg/mL (37,5%±9,7de morte celular); 0,74 μg/mL (78,3%±0,7 de morte celular); 2,22 μg/mL (87,5%±0,7 de morte celular).

A apoptose avaliada pelo ensaio de Hoechst / IP em células C33A estão demonstradas na Figura 11 em ambos os tempos de tratamento, 24 e 48 horas.



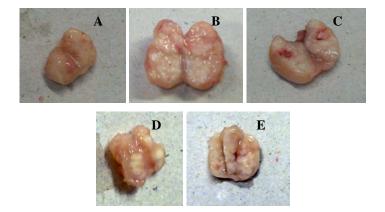
**Figura 11:** Apoptose por coloração Hoechst / IP em células C33A. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (tratados *vs* CN). A) Relação entre apoptose total e necrose de células tratadas com nitensidina A por 24 h; B) Relação entre apoptose precoce e tardia de células tratadas com nitensidina A por 24 h; C) Células tratadas com nitensidina A por 48 h, relação entre apoptose total e necrose; D) Células tratadas com nitensidina A por 48h, relação entre apoptose precoce e tardia. CP: doxorrubicina 50 μg/mL; CN: células não tratadas; CV: controle de veículo DMSO 1 %; \*\*\*\* p < 0,001.

Ao avaliar o tratamento com nitensidina A na linhagem C33A, não foi possível observar uma diferença entres os tipos de morte celular (apoptose total e necrose) no tempo de tratamento de 24 horas (Figura 11-A), apresentando assim, um número pequeno de morte celular. Quando foi avaliada a morte celular por apoptose precoce e apoptose tardia (Figura 11-B), não houve morte celular e, portanto ausência de diferença significativa em todas as concentrações.

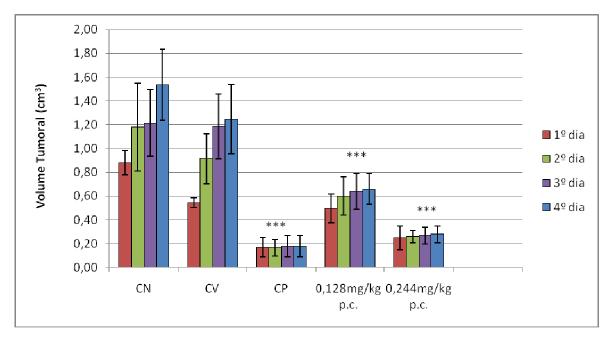
Em 48 horas, não verificou-se uma diferença significativa entre o tipo de morte celular por necrose e o controle negativo (Figura 11-C). Na análise da apoptose total, foi observada diferença significativa somente na maior concentração testada (20 μg/mL), com morte celular de 63,4%±23,4. Ao comparar os tipos de apoptose precoce e tardia (Figura 11-D), foi possível observar diferença significativa de apoptose tardia na maior concentração testada (20 μg/mL), com 57,7±20,6 % das células mortas.

#### 4.4. Crescimento Tumoral

A comparação do crescimento tumoral está demonstrada na figura 12 e a inibição do crescimento tumoral em *nude* BALB/c tratados com nitensidina A, estão apresentadas na figura 13.



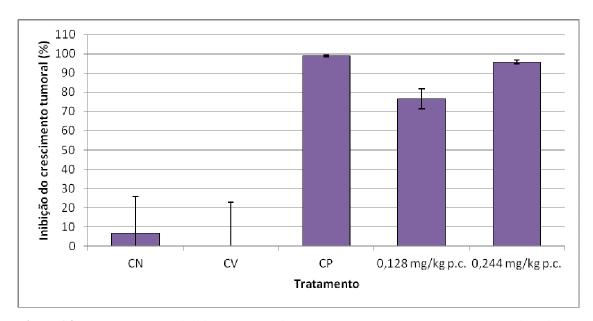
**Figura 12:** Comparação do crescimento tumoral em camundongos *nude* BALB/c, com implante de células SiHa. A) Controle positivo (0,6 cm); B) Controle negativo (1,6 cm); C) Controle de veículo (1,5 cm); D) Grupo tratado - 0,128 mg/kg p.c. de nitensidina A (0,8 cm); E) Grupo tratado - 0,244 mg/kg p.c. de nitensidina A (1,0 cm)



**Figura 13:** Inibição do crescimento tumoral em camundongos *nude* BALB/c tratados com nitensidina A nas concentrações de 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c. Os resultados são apresentados com média de volume tumoral em 5 animais por grupo ± erro padrão (M±EP). Controle Negativo (animais não tratados), Controle Positivo (doxorrubicina 0,5 mg/kg p.c.) e Controle de Veículo (DMSO 1%). p < 0.001, One-way ANOVA com pós test de Tukey (tratados vs CN). \*\*\* p < 0,001.

A redução do crescimento tumoral foi observada nos camundongos *nude* BALB/c tratados com nitensidina A nas duas concentrações testadas de 0,128 e 0,244 mg/kg p.c., quando comparadas ao controle negativo. Pode-se observar que houve uma redução maior do crescimento tumoral na maior concentração testada (0,244 mg/kg p.c.). Os camundongos *nude* BALB/c apresentaram tamanho do tumor de 0,60±0,03 cm³ e 0,27±0,01 cm³ após o tratamento, respectivamente, de 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c do alcalóide nitensidina A quando comparados ao controle negativo (salina, 1,20±0,12 cm³).

O crescimento do tumor no grupo controle de veículo (CV) foi de 0,70 ± 0,16 cm³, o que significa que 100% de crescimento tumoral foi observado entre os dias de tratamento. Portanto, as taxas de inibição foram calculados considerando o crescimento do tumor no grupo controle (CV) como porcentagem de inibição zero (Figura 14). Assim, os resultados dos outros grupos foram normalizados pela inibição de crescimento tumoral no grupo controle de veículo. A porcentagem de inibição dos camundongos *nude* BALB/c camundongos foram 76,7±5,19 na menor concentração de nitensidina A (0,128 mg/kg p.c.) e 95,7±0,92 na maior concentração testada (0,244 mg/kg p.c.).



**Figura14:** Porcentagem de inibição do crescimento tumoral após o tratamento com nitensidina A. CN: controle negativo (camundongos tratados com solução salina 0,9%); CV: controle de veículo (DMSO 1%); CP: controle positivo (doxorrubicina 0,5 mg/kg p.c.). Resultados estão expressos como a média e erro padrão (M ± EP).

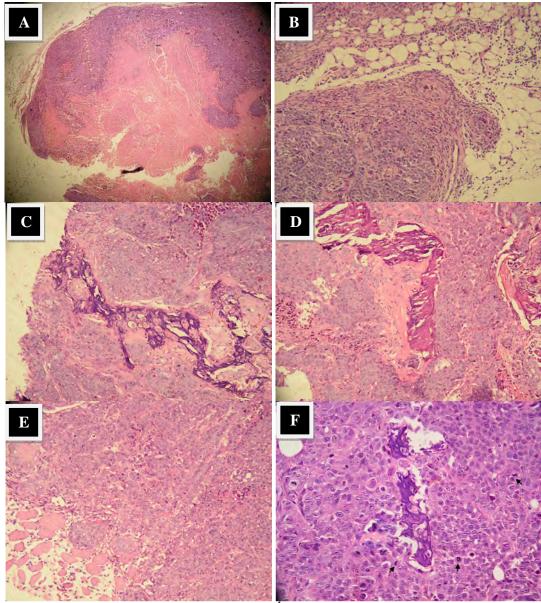
## 4.5. Análise Histológica

# 4.5.1.Exame histológico

O tumor, rins, baço, fígado e pulmão foram cada um fixados em formalina neutra tamponada (10%), seguido do protocolo padrão para incorporação em parafina. Seções de 5 µm de espessura foram cortadas de cada órgão e tumor e corados com hematoxilina e eosina. As imagens histológicas foram escolhidas para ilustrar diferentes achados em diferentes grupos (Figura 15). As seções foram vistas com um microscópio Olympus Bx51 equipado com câmera (Camedia C5060 – Olympus) e monitor.

Os tecidos invadidos foram identificados pela presença de células tumorais invadindo tecidos normais. A razão necrose/tumor foi calculada em dois círculos. O primeiro inclui o tumor inteiro e o segundo, a área necrótica.

O fator mitótico foi calculado pela soma de MF por 10 HPF (campos analisados) consecutivos (400 x) na área mais proliferativa e é correlacionado com a velocidade de proliferação celular (POPIOLEK et al., 2004).



**Figura 15:** Imagens histológicas dos tumores. A) Área em necrose (H&E, 40 X), B) Tecido adiposo invasivo (H&E, 200 X), C) Invasão na cartilagem (H&E, 200 X), D) Invasão do tecido ósseo (H&E, 200 X), E) Invasão no músculo estriado (H&E, 200 X) e F) As setas indicam mitose (H&E, 400 X).

#### 4.5.2.Exame histopatológico

Os dados de tecidos invadidos em diferentes grupos estão descrito na tabela 1. O grupo doxorrubicina (0,5 mg/kg p.c.) teve apenas dois tecidos invadidos. Os grupos controle negativo, controle de veículo e o alcalóide nitensidina A (0,128 mg/Kg p.c.) demonstraram três ou mais animais com dois tecidos invadidos

**Tabela 1:** Avaliação do tecido invasivo.

	Tubela II II anagao do teerdo ini asiro.					
_	Dox	Negat	DMSO	niten(0,128)	niten(0,244)	
Animal 1	1	5	5	0	5	
Animal 2	3	2	1	5	1	
Animal 3	0	5	5	5	2	
<b>Animal 4</b>	0	5	5	5	0	
Animal 5	0	5	5	1	1	

dox=doxorrubicina (0,5 mg/kg p.c.), Negat = controle negativo, DMSO = controle de veículo DMSO (1%), Niten (0,128) = nitensidina A (0,128 mg/kg p.c.), niten (0,244) = nitensidina A (0,244 mg/kg p.c.). Invasão: 1 = tecido adiposo, 2 = músculo estriado, 3 =osso, 4 = cartilagem, 0 = sem invasão e 5 = mais de uma região invadida.

O grupo controle positivo (doxorrubicina) teve invasão no tecido adiposo e no osso em dois animais apenas, o grupo controle negativo teve invasão no músculo estriado e em mais de uma região invadida, em todos os animais, o que foi um resultado similar obtido no grupo controle de veiculo (DMSO 1%) no qual a invasão ocorreu em todos os animais e houve invasão no tecido adiposo e em mais de uma região foi invadida. As duas doses testadas de nitensidina A tiveram invasão nos tecidos em quatro animais, na menor concentração (0,128 mg/kg p.c.) houve invasão no tecido adiposo e em mais de uma região, e a maior concentração testada (0,244 mg/kg p.c.) teve invasão no tecido adiposo, no músculo estriado e também mais de uma região foi invada. Em comparação com as duas concentrações, a maior concentração testada demonstrou ser um pouco mais eficiente, pois a menor concentração apresentou invasão em mais de um tecido e em três animais. O grupo doxorrubicina (0,5 mg/Kg p.c.) teve apenas dois tecidos invadidos. Os grupos controle negativo, controle de veículo demonstraram todos os animais com invasão em mais de uma região.

Os resultados do índice mitótico e a necrose dos tecidos tumorais estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Avaliação do índice mitótico e necrose tumoral.

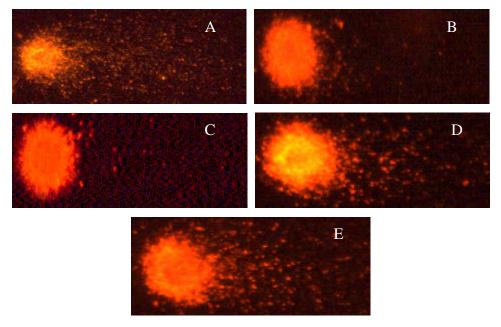
	IM(%)	Necrose
Tratamento	Média±EP	Média±EP
doxorrubicina	$0,62\pm0,53^{a}$	0,43±0,21 <sup>a</sup>
controle negativo	5,24±1,81 <sup>b</sup>	$0,55\pm0,15^{a}$
controle de veículo	5,88±3,08 <sup>b</sup>	$0,64\pm0,11^{a}$
nitensidina A 0,13 mg/kg p.c.	$3,56\pm1,26^{b}$	$0,64\pm0,13^{a}$
nitensidina A 0,25 mg/kg p.c.	2,84±1,91 <sup>b</sup>	$0,52\pm0,19^{a}$

IM = índice mitótico. As analises foram realizadas entre os tratamentos e o controle negativo. O teste não paramétrico de Mann Whitney (p<0.05) foi aplicado. N=5.

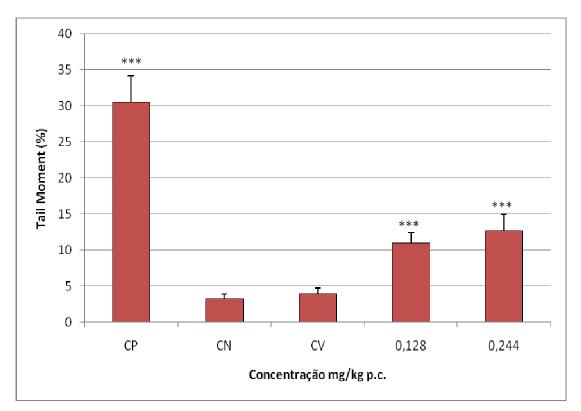
De acordo com a tabela acima pode-se observar que na avaliação da necrose não houve diferença significativa entre os grupos controles e tratados. Analisando o índice mitótico apenas o controle positivo (doxorrubicina 0,5 mg/kg p.c.) demonstrou diferença estatística em relação a outras formas de tratamento e ao controle negativo, ressaltando uma discreta diferença entre as concentrações testadas de 0,128 mg/kg p.c (3,56±1,26) e 0,244 mg/kg p.c (2,84±1.91).

# 4.6. Avaliação da Genotoxicidade

Os resultados do ensaio do Cometa para avaliação de genotoxicidade, por meio da medida de fragmentação do DNA na cauda distante do nucleóide estão demonstrados na Figura 16 e 17. Os resultados (Figura 15) estão apresentados como média ± erro padrão (M±EP) e indicam que nitensidina A mostrou-se genotóxica.



**Figura 16:** Ensaio do cometa realizado em *nude* BALB/c, demonstrando os níveis de danos ao DNA, através da fragmentação do DNA na cauda. A) Controle positivo (doxorrubicina 0,5 mg/kg p.c.); B) Controle Negativo (salina 0,9%); C) Controle de Veículo (DMSO 1%); D) Tratamento com nitensidina A (0,128 mg/kg p.c.) e E) Tratamento com nitensidina A, (0,244 mg/kg p.c).



**Figura 17:** Avaliação da genotoxicidade por meio do teste do cometa em *nude* BALB/c, tratados com nitensidina A nas concentrações 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c. Controle Positivo (doxorrubicina 0,5 mg/kg p.c.), Controle Negativo (CN - animais não tratados – salina 0,9%) e Controle de Veículo (DMSO 1%). p<0.0001, Kruskal-Wallis com pós test de Dunn's (tratados vs CN). \*\*\* p < 0,001.

Na análise de genotoxicidade, nitensidina A apresentou efeito dose resposta nas concentrações testadas, quando comparadas ao controle negativo. As porcentagens de danos ao DNA foram avaliadas pelo *Tail Moment* e demonstram que nas duas maiores concentrações 0,128 mg/kg p.c. e 0,244 mg/kg p.c., ocorre dano de DNA, respectivamente, de 11±1,47 % de dano e 12,62±2,4 %, apresentando diferença significativa quando comparadas ao controle negativo (3,21±0,71 %).

# 4.7. Avaliação da Mutagenicidade

A análise do teste do micronúcleo (tabela 3) em camundongos *nude* BALB/c, demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos controle e teste. Esses resultados demonstram que nitensidina A não induz mutagenicidade.

**Tabela 3:** Avaliação da mutagenicidade em camundongos *nude* BALB/c

	MN (%)	EPC/ENC
Tratamento		
	Média±EP	Média±EP
doxorrubicina	$10,78\pm1,53$	2,05±0,11
	0.74.0.40	0.51.0.00
controle negativo	$0,56\pm0,12$	$0.51\pm0.02$
controle de veículo	0,52±0,06	0,52±0,01
controle de veledio	0,32±0,00	0,32±0,01
nitensidina A 0,13 mg/kg p.c.	$0,90\pm0,03$	1,27±0,22
nitensidina A 0,25 mg/kg p.c.	$1,04\pm0,05$	0,84±0,02

MN = micronúcleo, EP = erro padrão, EPC = eritrócito policromático, ENC = eritrócito normocromático. Comparação entre os grupos através do teste não paramétrico de Kruskal Wallis com Pós teste de Dunn's (p> 0,05). N=5.

# 5. Discussão

#### 5.1. Avaliação da Citotoxicidade

O tipo papilomavirus humano HPV-16 encontra-se relacionado ao câncer cervical e por estar integrado ao genoma dessas células, contribui para a instabilidade genômica e conseqüente desenvolvimento de tumores. De acordo com o Ministério da Saúde, o Brasil apresenta uma das maiores incidências de HPV e esse fato torna a carcinogênese associado ao vírus um grave problema de saúde pública.

O alto índice de disseminação dessa doença pode estar relacionado ao fato do HPV se desenvolver de uma forma silenciosa no corpo humano, relacionando-se também com fatores ambientais e genéticos (MACIAS et al., 2000; LIN et al., 2001; BOSCH, 2003; STANLEY, 2003; ZUR HAUSEN, 2009; D'ANDRILLI et al., 2010).

Vários estudos estão sendo realizados na busca de novos agentes extraídos de fontes naturais contra o câncer. Dessa maneira, o presente estudo utilizou nitensidina A, um alcalóide de *Pterogyne nitens*, avaliando sua atividade antitumoral, em experimentos *in vitro* e *in vivo* por meio do modelo de implante xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa), em camundongos *nude* BALB/c. Contudo, nesse estudo foi possível quantificar a apoptose e demonstrar se o tratamento com esse alcalóide guanidínico induzia danos genotóxicos e mutagênicos nos camundongos *nude* BALB/c.

O tratamento com nitensidina A apresentou citotoxicidade concentração - resposta indistintamente entre as duas linhagens celulares, linhagem de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV-16 (SiHa) e não imortalizada (C33A).

Os alcalóides derivados de plantas são compostos que podem impedir a divisão celular, evitando a formação de células novas, atuando como agentes antimicóticos tais como: colchicina e alcalóides da Vinca. A capacidade dos alcalóides em destruir as células tumorais vem sendo amplamente investigada, demostrando ser fonte promissora para o desenvolvimento de novos farmácos (LI et al., 2008).

Os estudos de citotoxicidade com o extrato etanólico obtido das sementes de *Myracroduon urundeuva*, utilizando o ensaio de MTT, demonstraram o potencial citotóxico desta planta contra as células cancerígenas, inibindo assim, a proliferação celular (FERREIRA et al., 2011). No estudo de Ferreira et al, quatro linhagens humanas, HL-60 (leucemia promielocítica); MBA/MB-435 (melanoma); SF-295 (glioblastoma) e HCT-8 (colon) foram tratadas com extrato etanólico obtido das sementes de *Myracroduon urundeuva*, sendo que o composto demonstrou atividade moderada em linhagens celulares de glioblastoma e especialmente leucemia, visto que os valores do IC50 foram, respectivamente, de 25,1 µg/mL

e 12,5 μg/mL. De acordo com o American National Cancer Institute, os valores considerados promissores para uma futura purificação de extrato bruto estão abaixo de 30 μg/mL (apod Stufness e Pezzuto, 1990).

Outro estudo realizado com timoquinona, um componente ativo da planta *Nigella sativa*, demonstrou uma redução significativa na viabilidade celular avaliada pelos ensaios do MTT e azul de Trypan, nos quais a timoquinona apresentou-se mais citotóxica para a linhagem de carcinoma cervical imortalizada com HPV-16 (SiHa) em comparação com a cisplatina (controle), mas não houve citotoxicidade em linhagens normais (3T3-L1 e Vero) (NG et al., 2011). ABREVEATURAS

Em mais um estudo realizado com produtos naturais, observou-se que o extrato aquoso de *Brucea javanica* foi mais citotóxico na linhagem SiHa do que para as linhagens normais, onde foi demonstrado um aumento significativo da proteína p53, em linhagens com p53 e sem p53, contribuindo a indução de morte celular por apoptose (GAO et al., 2011).

Entretanto, no presente estudo não houve diferença estatística significativa de viabilidade celular entre as linhagens SiHa e C33A, provavelmente indicando que não há seletividade de morte celular para a linhagem contendo HPV-16. Corroborando com o resultado do presente estudo o tratamento com lopinavir, um antiretroviral da família dos inibidores de proteases, observou-se que a citotoxicidade do composto não foi exclusivamente seletiva para células transformadas ou imortalizadas pelo HPV, onde em baixas concentrações de tratamento pelo fármaco também foram citotóxicas para células não imortalizadas pelo HPV (C33A) (ZEHBE et al., 2011).

## 5.2. Avaliação da apoptose por meio dos ensaios Anexina V e Hoechst / IP

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram a atividade de alcalóides guanidínicos, pteroginina e pteroginidina; isolados de *Pterogyne nitens* na indução de apoptose em linhagem de carcinoma epitelial (ZR 7531). Esses compostos induziram morte celular programada (DUARTE et al., 2010). No presente estudo foram realizados experimentos para a avaliação de morte celular por apoptose ou necrose, nas linhagens de carcinoma cervical SiHa e C33A. Em ambas as linhagens SiHa e C33A foi possível observar que houve uma predominância de morte celular por apoptose, por meio do ensaio da anexina V nos tempos de 24 e 48 h, apenas na maior concentração testada (20 μg/mL) houve morte celular por apoptose tardia/necrose para a linhagem SiHa.

O teste da anexina V é considerado um teste sensível e essencial para detecção de apoptose, no qual células normais apresentam fosfatidilserina interna enquanto em células em apoptose, ocorre a externalização da fosfatidilserina (PS) translocada e ancorada da membrana externa, assim a anexina conjugada ao FITC pode-se ligar facilmente à essa fosfatidilserina (MOCHIZUKI et al., 2003). Dessa maneira, utilizando o teste de anexina V conjugada com FITC, pode-se avaliar os níveis de PS expostas na membrana externa, indicando a apoptose precoce e associando o iodeto de propídeo (IP) podemos mensurar células com permeabilidade na membrana, podendo diferenciar uma fase tardia de apoptose da necrose (PEC et al., 2003).

Células em necrose ou apoptose tardia exibem os mesmos padrões, pois a anexina V pode atravessar a membrana permeabilizada ao mesmo tempo em que o iodeto de propídeo entra no citosol, tornando-se difícil a diferenciação dentre os dois estágios de apoptose tardia ou necrose. (PEC et al., 2003). Entretanto, como esse ensaio não permite diferenciação entre apoptose tardia e necrose, os resultados foram expressos em apoptose precoce e apoptose tardia/necrose. Sendo assim, faz-se necessária a utilização do teste Hoechst-Iodeto, para que haja a diferenciação clara entre apoptose precoce, tardia e necrose, fundamental para caracterizar o tipo de morte celular. No teste do Hoechst-Iodeto, a apoptose tardia apresenta corpos apoptóticos e aumento da membrana celular, permitindo a entrada do IP nas células, dessa forma, essa combinação tem sido muito utilizada para diferenciação de apoptose tardia e necrose (HASHIMOTO et al., 2003).

No presente trabalho houve a predominância de apoptose precoce e uma pequena expressão de apoptose tardia ou necrose. A relação entre apoptose e câncer vem sendo enfatizada cada vez mais, sugerindo que a progressão da neoplasia envolve alterações dos estágios de apoptose em células normais (YANG et. al., 2006). A progressão das células malignas e a velocidade em que estas células são mortas e eliminadas determinam o crescimento do tumor. Estudos com modelos animais e com linhagens celulares demonstram que há alguma falha na programação da morte de células neoplásicas na maioria dos diferentes tipos de cânceres. Dessa maneira uma estratégia terapêutica ideal seria conseguir inibir o crescimento do tumor e induzir a morte nestas células tumorais (YANG et. al., 2006). Entretanto, o maior desafio nos tratamentos de câncer é diminuir a citotoxicidade e morte celular de modo seletivo, e afetando levemente as células normais com multiplicação controlada.

Um estudo com curcumina foi realizado para verificar seu papel como um indutor eficaz de apoptose em células de câncer cervical. Este estudo demonstrou por meio do método

de coloração por laranja de acridina e brometo de etídio avaliados por microscopia de fluorescência, que a curcumina é capaz de induzir seletivamente a apoptose em células de câncer cervical, linhagens SiHa e HeLa. Por outro lado, na linhagem C33A o número de células apoptóticas foi menor em comparação com as duas linhagens celulares HPVs positivas. Outros resultados reforçados por meio de ensaios com RT-PCR e Western Blot demonstraram que a curcumina diminui a expressão das proteínas E6 e E7 em SiHa (HPV16) e HeLa (HPV18), pois E6 e E7 modulam a proliferação celular e também a apoptose (DIVYA & PILLAI, 2006).

A inibição da proliferação celular apresenta-se claramente associada com a indução de apoptose em estudos realizados utilizando substancia Witaferina A de *Withania somnifera*, onde se observou por meio do teste de anexina V, na linhagem CasKi (HPV positiva) que houve morte celular por apoptose precoce em 24 horas e apoptose tardia em 48 horas. Neste estudo, onde quatro linhagens de câncer cervical foram testadas (CasKi, HeLa, SiHa e C33A), a Witaferina A inibiu a proliferação celular, deixando claro que a seletividade da lactona esteroidal sobre as oncoproteínas E6 e E7 do HPV exercem profundo efeito na supressão das proteínas do tumor, acelerando a degradação da ubiquitinização (MUNAGALA, et al 2011). No estudo de Munagala et al. (2011) houve um diminuição da expressão da proteína E6 em todas as linhagens HPVs positivas e subseqüente aumento nos níveis de p53 e P21<sup>cip1/waf1</sup>, de forma concentração dependente determinada pelo Western blot, sendo que na linhagem celular C33A os níveis de p53 mutante permaneceram constantes e a expressão de P21<sup>cip1/waf1</sup> aumentou. Portanto, esses dados sugerem que a Witaferina A reprimiu a oncoproteína E6 e favoreceu a modulação da p53 que é efetor da molécula P21<sup>cip1/waf1</sup> sugerindo a apoptose nessas células (MUNAGALA, et al 2011).

Estudos com jasmonato de metila demonstraram, por meio de testes como o ensaio de anexina V e a verificação dos níveis protéicos por Western Blot, a indução de apoptose precoce em maior quantidade na linhagem SiHa, quando comparada com outras linhagens tumorais (C33A, Caski, HeLa), sem apresentar diferença entre os tempos de tratamento, alternados entre 24 e 48 h. Esse composto afetou diretamente a expressão de p53 nos diferentes alvos, sendo que na linhagem CasKi o nível foi aumentado, em HeLa e SiHa houve diminuição e em C33A não houve alteração (KNIAZHANSKI et al, 2008). No estudo de Kniazhanski e colaboradores, a diminuição observada nos níveis de expressão de p21 poderiam explicar a indução de apoptose em SiHa e HeLa, e os baixos níveis de p21 em C33A poderiam ser responsáveis pela indução nessas células, sugerindo que o jasmonato de metila foi eficaz contra linhagens de câncer cervical, sendo capaz de induzir mortes celulares

características de apoptose e necrose independentemente do status do HPV e da p53. Embora o ensaio de anexina V permite a diferenciação de apoptose precoce, não conseguindo distinguir apoptose tardia de necrose, um método complementar é o emprego do ensaio de Hoechst-Iodeto.

O teste do Hoechst-Iodeto foi realizado no presente estudo, assim as alterações que ocorrem nas células durante o estágio de apoptose precoce são claramente definidas, diferenciando os estágios de morte celular (apoptose precoce, tardia e necrose), tornando-se um teste complementar ao ensaio da anexina V (MACIOROWSKI et al., 1998; ELSTEIN & ZUCKER, 1994). Nesse estudo, pode-se observar morte celular por apoptose precoce e apoptose tardia, o qual foi um resultado importante pois apoptose é uma via de morte menos devastadora do que as mortes por necrose, pois neste caso ocorre a lise celular e a indução de resposta inflamatória intensa, apoptose é conhecida como "morte celular programada", sendo rigidamente controlada desempenhando um papel fundamental na homeostase de um tecido e também nos processos de uma doença (PULIDO & PARRISH, 2003; RAZAVI et al., 2005).

No presente estudo, identificou-se por meio do método do Hoechst-Iodeto que na linhagem SiHa em 24 horas de tratamento, (20 µg/mL), houve morte celular aproximadamente em 80 % por apoptose tardia. Em 48 horas diferenciou-se o tipo de morte celular (apoptose tardia ou necrose) por meio do teste Hoechst-Iodeto, em todas as concentrações para a linhagem SiHa, na qual houve morte por apoptose tardia, com efeito concentração-resposta. Na linhagem C33A, observou-se que houve um número muito pequeno de morte celular. Contudo, em 24 horas de tratamento não foi possível observar nenhuma diferença significativa, apenas na maior concentração testada (20 µg/mL) e em 48 horas houve diferença significativa ocorrendo morte celular por apoptose tardia. Essa diferença na porcentagem de morte celular entre as duas linhagens sugere que a nitensidina A, mostrou-se seletiva para linhagens SiHa. Estudos prévios com tratamento do extrato etanólico liofilizado de framboesa-preta foi utilizado (durante três dias) para exposição de células apoptóticas por meio da coloração dupla de anexina V e iodeto de propidio, seguida de análise por citometria de fluxo, observando-se um aumento nas populações de células apoptóticas em todas as linhagens de células cervicais (HeLa, SiHa e C33A). De maneira similar aos nossos resultados para C33A, o número de células apoptóticas foi relativamente menor, sendo confirmado pelo método Hoechst Iodeto, o qual evidenciou pelas características nucleares incluindo condensação da cromatina e microscopia de fluorescência. Essa variação das células apoptóticas pode ser devido as heranças genéticas das proteínas expressas em cada linhagem (HeLa e SiHa – p53 do tipo selvagem e C33A p53 mutante). Com cinco dias de exposição ao extrato de framboesa, notou-se um aumento de apoptose dramático, considerando assim o tempo dependente do tratamento (ZHANG et al., 2011).

Esses estudos prévios fazem com que possivelmente a morte celular observada no presente estudo, utilizando diferentes ensaios, possua seletividade para células infectadas por HPV-16. Esses resultados corroboraram com os resultados observados no presente estudo. Entretanto, estudos futuros são necessários para avaliar se o tratamento com a nitensidina A diminui a expressão de E6 ou E7 contribuindo assim para a morte celular seletiva em células SiHa.

# 5.3. Determinação do crescimento tumoral em camundongos nude BALB/c

O câncer é o termo usado para designar malignidade celular, cuja característica principal é a perda do controle da proliferação e crescimento celular. Isso leva à desdiferenciação celular, crescimento desregulado e invasão de tecidos locais e vizinhos (metástases). O controle do câncer pode ser obtido por meio de prevenção, detecção precoce e terapêutica cirúrgica e/ou quimioterapia. (TAO et al., 2008; GIOVANNUCCI, 1998; LIMA, 2004).

O crescimento tumoral resulta de um desequilíbrio entre a proliferação celular e apoptose, na qual o potencial invasivo é influenciado por alterações na interação célula-célula e célula-matriz. Estudos que exploram os efeitos candidatos a fármacos em ambientes que mimetizam o microambiente tumoral em seres humanos podem auxiliar o estabelecimento e padronização da ação de potenciais fármacos sobre as células tumorais, de forma próxima da que ocorre *in vivo*. Portanto, mimetizando o microambiente dérmico tumoral nesses camundongos, é possível avaliar mecanismos de ação de fármacos na terapia antineoplásica.

Os camundongos *nude* BALB/c foram utilizados no presente estudo como modelo para implante tumoral xenográfico, visto que as células SiHa são humanas e tumorigênicas. A inoculação das células tumorais foi feita no flanco dorsal dos camundongos (SIMONART et al., 2003).

Quando analisado o volume tumoral final (Figura 13) foi observado que os animais do grupo tratado com 0,25 mg/kg p.c. de nitensidina A tiveram um menor desenvolvimento tumoral em relação ao grupo tratado com 0,13 mg/ kg p.c. Ambos os tratamentos foram estatisticamente significativos (p < 0,001) em relação ao controle negativo estabelecido por animais sem tratamento, indicando portanto que possivelmente haja uma ação do alcalóide guanidínico no crescimento do implante tumoral. O grupo controle veículo apresentou sutil

diferença no volume tumoral em relação ao grupo controle negativo, mas esta diferença não mostrou-se estatisticamente significativa.

No presente estudo, observou-se que o crescimento tumoral foi gradual demonstrado pelo grupo controle negativo, em função do tempo. Já nos grupos tratados a partir do 1° dia foi observado o processo de redução significativa do crescimento tumoral (p < 0,001). Entre os 2° e 4° dia de tratamento, também se observou significativa diminuição da proliferação celular em relação ao grupo controle (p < 0,001). Em relação aos tratamentos com nitensidina A, na dose de 0,25 mg/kg p.c., foi obtido a melhor resposta na inibição do crescimento tumoral, semelhante ao observado no controle positivo, doxorrubicina a 0,5 mg/kg p.c. (Figura 14).

A doxorrubicina é um fármaco extensamente utilizado nos tratamentos de tumores sólidos, como os de mama, fígado e sarcomas (MUGGIA & GREEN, 1991; KOLARIC et al., 1977; SESSA et al., 1999). O seu mecanismo de ação baseia-se na intercalação do DNA, afetando a síntese de ácidos nucléicos, promovendo a inibição da topoisomerase II (ALBRIGHT et al., 2005). Apesar de ser um quimioterápico clássico, utilizado desde a década de 60 para o tratamento de neoplasias, infelizmente seu uso clínico é altamente limitado, devido à sua cardiotoxicidade (CASCALES et al., 2010). Atualmente é utilizado na forma de sistemas estruturados em lipossomas, melhorando sua biodisponibilidade e diminuindo a quimiorresistência, bem como a interação com as células normais. (ABOU-ALFA et al., 2010; JIN et al., 2010; IQBAL et al., 2011).

A eficácia de compostos antitumorais usados clinicamente é limitada pela toxicidade não específica sobre as células normais, resultando em baixo índice terapêutico. Desta forma, potencializar a ação de novas substâncias por combinação de fármacos é uma alternativa possível de tratamento. Em estudos com camundongos, a doxorrubicina em combinação com outros a gentes quimiopreventores de origem natural diminuiu a formação de tumor e metástase no modelo de melanoma murino B16 (BENBOW et al 1999).

A significativa redução tumoral após o tratamento com nitensidina A, obtida no presente estudo, pode estar correlacionada às taxas de citotoxicidade demonstrada pelo ensaio de MTT e ainda pelo perfil de morte celular demonstrado nos ensaios de apoptose. A partir desses resultados acredita-se que esse alcalóide possua um papel especial no microambiente tumoral, podendo tornar-se potencialmente aplicável como agente antineoplásico. Dentre as características químicas que podem estar relacionadas ao efeito antineoplásico de nitensidina A destaca-se suas cadeias geranílicas de dez átomos de carbono, as quais conferem notável lipofilia ao alcalóide. Nesse contexto, inúmeros autores tem descrito a importância da lipofilia

(ou hidrofobicidade) como parâmetro crucial para a capacidade de compostos em atravessar membranas biológicas de células tumorais, controlando a proliferação celular em alvos citoplasmáticos (BARREIRO & FRAGA 2001; BOGO 2009).

Efeitos antiangiogênicos, antiproliferativos e pró-apoptóticos *in vivo*, já foram descritos para um alcalóide guanidínico de *Pterogyne nitens* (LOPES et al. 2005; LOPES et al. 2009). O alcalóide pteroginidina, demonstrou claramente uma potente atividade antiangiogênica ao inibir a formação de estrutura tipo capilares em células HUVEC (LOPES et al. 2005; LOPES et al. 2009) sugerindo que um mecanismo similar esteja provavelmente ocorrendo na regulação do processo de carcinogênese.

## 5.4. Aspectos histopatológicos

Camundongos desenvolvem tumores nos mesmos tecidos e na maioria das vezes com padrões histopatológicos extremamente semelhantes aos observados em humanos. (YUSPA, 1998; BALMAIN & HARRIS, 2000). O início e progressão do câncer humano é um processo complexo com várias etapas, no qual as células tumorais adquirem a habilidade de se espalhar pelas células vizinhas normais. Com o aumento da massa tumoral, o câncer invade as células vizinhas e tecidos, as vasculaturam e ultimamente metastatizam-se para órgãos longínquos. (STORZ et al., 2009). Diversos mecanismos são atribuídos a capacidade do tumor invadir tecidos periféricos e órgãos distantes, sendo já estudado marcadores de invasão e metástase em diferentes tumores (YUE et al., 2009; ZIGRINO et al., 2009; NIEBOROWSKA-SKORSKA et al., 2006).

No presente estudo, a análise histopatológica demonstrou que houve invasão do tumor nos tecidos dos animais. No controle positivo (doxorrubicina 0,50 mg/kg p.c.) a invasão foi menos conceituada, e nos grupos controle negativo e controle de veículo (DMSO 1%) a invasão demonstrou-se presente em mais tecidos e em maior número de animais. As duas concentrações testadas de nitensidina A demonstraram uma invasão nos tecidos menos conceituada do que os grupos controle negativo e controle de veículo, sendo melhor ainda na maior concentração testada. A inibição farmacológica da motilidade celular pode beneficiar o tratamento clínico, prevenindo a invasão e metástase em órgãos internos (COLLISSON et al., 2003, MATSUDA et al., 2011). Dessa forma, o presente estudo demonstra que o tratamento com nitensidina A diminui a invasão em tecidos vizinhos e não demonstrou metástase em órgãos a distância. Entretanto, mais estudos deverão ser conduzidos para determinar o

mecanismo de ação e alvos proteicos que contribuíram para os resultados encontrados em nosso estudo.

No presente estudo, os resultados do índice mitótico dos tecidos tumorais demonstraram que o controle positivo (doxorrubicina 0,50 mg/kg p.c.) evidenciou diferença estatística significante em relação as concentrações utilizadas e aos controles negativo e veículo (tabela 2). De acordo com Fadare et al. 2007 a atividade celular proliferativa é aumentada em neoplasia cervical contendo o vírus HPV, aumentando assim o índice mitótico, o mesmo ocorre em células de carcinoma cervical imortalizadas com HPV-16. Observou-se em nosso experimento que houve uma diminuição do índice mitótico no grupo controle positivo, o que era esperado pois a doxorrubicina é um antitumoral efetivo já bem estabelecido. Mesmo sem apresentar diferença significativa, nitensidina A apresentou uma discreta diferença que deve-se levar em consideração, quando comparado ao controle negativo, diminuindo assim o índice mitótico. Segundo Bernardi et al. 2009 a diminuição do índice mitótico e outras características histológicas conferem ao tumor aspectos menos invasivos e proliferativos. Provavelmente, se outra análise for realizada, novas descobertas poderão ser avaliadas em relação a esse alcalóide. Na avaliação da necrose não houve nenhuma diferença significativa. Em estudos com células de glioblastoma implantadas em ratos, tratadas com nanocápsulas de indometacina, houve a redução do índice mitótico, confirmando o potencial papel da indometacina como um fármaco antiproliferativo, o que corroborou com os nossos resultados, onde a nitensidina A apresentou comportamento similar (BERNARDI et al. 2009).

## 5.5. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade em camundongos nude BALB/c.

Estudos na literatura indicam que diferentes metabólitos secundários, tais como flavonóides e alcalóides, amplamente utilizados nos últimos tempos, podem ser potencialmente genotóxicos (SCHMITTA et al., 2003). Os mecanismos envolvidos que explicam a clastogenecididade e/ou interação com o DNA não estão totalmente elucidados. A segurança ou toxicidade da utilização destes compostos estão relacionados ao tempo de exposição e à dose utilizada administrada (SCHMITTA et al., 2003).

O dano ao DNA, tanto por agentes químicos como físicos, pode ser avaliado em vários tipos celulares por meio de análises citogenéticas (aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, formação de micronúcleo) e bioquímicas (teste do cometa). Para a avaliação dos níveis de dano no DNA, existem algumas técnicas disponíveis. A eletroforese

de células isoladas (teste do cometa), por exemplo, de células epiteliais humanas, nos permite avaliar o índice de danos no DNA. É uma técnica simples, rápida e não requer altos investimentos com equipamentos analíticos. Os cometas podem ser classificados por imagem computacional em diversas categorias, com base no comprimento de migração e na proporção relativa de DNA na cauda, atribuindo-se características a cada classe de migração.

O dano ao DNA, no ensaio do cometa pode ser induzido por drogas, radiações e substâncias inorgânicas. A exposição do DNA ao estresse oxidativo leva a mais de 20 diferentes tipos de dano (produzindo bases nitrogenadas oxidadas) (COSTA et al., 2001). O dano mais comum às purinas é a formação do produto oxidado 8-oxo-dG, o qual é usado para avaliação de ensaios ao DNA (BARZILAI & YAMAMOTO 2004). Dessa maneira faz-se necessária a utilização dos testes do cometa e do micronúcleo, para avaliar a atividade genotóxica e mutagênica, respectivamente, da nitensidina A, pois no presente estudo esse composto demonstrou ser um agente antitumoral potente. Entretanto, o seu tratamento pode apresentar danos ao DNA que são identificados por meio dos ensaios do cometa e micronúcleo.

Em relação à análise da genotoxicidade, foram avaliados danos causados no DNA das células sanguíneas de camundongos *nude* BALB/c, submetidos à exposição ao alcalóide, nas concentrações de 0,13 e 0,25 mg/kg p.c. (Figura 17). Os resultados demonstraram que quando comparado ao grupo controle negativo, os valores foram estatisticamente significativos (p < 0,001), ou seja, foi observada genotoxicidade. O cometa teve maior fragmentação nas concentrações de 0,13 e 0,25 mg/kg p.c. Esse fato demonstrou que mesmo sendo uma administração intratumoral, houve uma disseminação sistêmica, justificando assim o resultado de genotoxicidade. A genotoxicidade é um dano de DNA passível de ser reparado e por isso, para corroborar nossos resultados foi realizado o ensaio de micronúcleo que revela danos de DNA sem ação reparadora.

Como não existem, ainda, publicações sobre o potencial genotóxico e antigenotóxico de compostos isolados *Pterogyne nitens in vivo* os resultados foram comparados com estudos *in vitro* descritos na literatura. De acordo com Ferreira et al (2009), frações de *P. nitens* demonstraram efeito genotóxico a mutagênico *in vitro Trandescantia pallida*, podendo essas características serem atribuidas a presença de alcalóides guanidino-terpênicos pteroginina, pteroginidina e nitensidina A entre outros metabólitos potencialmente ativos. Outros estudos ainda abordam que alcalóides são capazes de induzir aberrações cromossômicas em linhagens CHO (chinese hamster ovary) (SASAKI et al., 1992). Diversos estudos vêm sendo conduzidos para a utilização de fármacos que tenham como mecanismo de ação a ligação ao

DNA ou que se intercalem seletivamente neste, induzindo sinais intracelulares que levam as células tumorais à morte por apoptose (HAVELKA et al., 2007; WHEATE et al., 2007). A vincristina e a camptotecina são alcalóides naturais, que vem sendo utilizados na Oncologia por interferir na desorganização de microtúbulos e inibir a topoisomerase I, respectivamente (COSTA et al., 2008; SIRIKANTARAMAS et al., 2007).

Os resultados do presente estudo permitem inferir que nitensidina A exibe atividade citotóxica e genotóxica dose-dependente, porém não mutagênica. A nitensidina A não aumentou a frequência de danos mutagênicos em camundongos *nude* BALB/c em relação a frequência de micronúcleos do grupo controle negativo (Tabela 3). Esses resultados confrontam-se com os apresentados por Ferreira et al (2009), na qual demonstra que fração butanólica e hidroalcoólica de *P. nitens* apresentaram ação mutagênica. Estudos prévios demonstraram que outros alcalóides são capazes de induzir aberrações cromossômicas em linhagem celular CHO (*chinese hamster ovary*) (SASAKI et al., 1992), mutagenicidade em células pulmonares de hamster chinês (CHL) (NAKAYASY et al., 1983); induzem mudanças em cromátides irmãs de linfócitos periféricos humanos (MADLE et al., 1981); e aumentam a frequência de micronúcleo e alterações em cromátides irmãs em células meristemáticas de *Allium cepa* (HAZEN & GUTIÉRREZ-GONZÁLVEZ, 1988).

A morte celular seja por necrose ou por apoptose, podem evitar a propagação de células danificadas. Entretanto, a presença de células micronucleadas não garante que os danos não sejam propagados para as células filhas. No presente estudo, os dados obtidos demonstraram que os camundongos portadores de tumores foram mais susceptíveis à ação genotóxica e citotóxica de nitensidina A em relação aos camundongos do grupo controle negativo (animais sadios), respondendo com maior intensidade ao tratamento. A baixa frequência de micronúcleos após as três doses do tratamento intratumoral de nitensidina A, sugeriu que o dano genotóxico em linfócitos periféricos dos camundongos, três doses após tratamento intratumoral de nitensidina A seja mínimo e a dose absorvida tão baixa que não permitam a indução de formação de micronúcleo.

Embora não tenha sido detectado frequência de micronúcleo em relação ao aumento da dose administrada, ficou claro a capacidade da nitensidina A em causar alterações no DNA, caracterizando-o como um agente potencialmente genotóxico. Entretanto, já é sabido que o dano genotóxico é passível de reparo e o recomendável é utilizar doses antineoplásicas e não genotóxicas.

# 6. Conclusões

Através da análise dos resultados obtidos no presente estudo, pose-se concluir que:

- O alcalóide guanidínico (nitensidina A), extraído de *Pterogyne nitens*, apresentou citotoxicidade concentração-resposta nas linhagens de carcinoma cervical imortalizadas pelo HPV 16 (SiHa) e não imortalizadas (C33A);
- A morte celular ocasionada demonstrou ser por apoptose (apoptose precoce e tardia),
- A avaliação de genotoxicidade (Teste do Cometa) e mutagenicidade (Teste do micronúcleo) demonstrou que o tratamento com nitensidina A ocasionou danos genotóxicos, mas não apresentou mutagenicidade;
- Nos experimentos realizados com nude BALB/c, o tratamento com nitensidina A demonstrou uma redução no crescimento tumoral dose-resposta;
- A análise histológica dos camundongos nude BALB/c demonstrou que houve invasão do tumor nos tecidos, mas não demonstrou metástase nos órgãos. Houve diferença significativa no índice mitótico e a avaliação da necrose não evidenciou diferença significativa.

# 7. Referências Bibliográficas

- ABOU-ALFA, G.K.; JOHNSON, P.; KNOX, J.J.; CAPANU, M.; DAVIDENKO, I.; LACAVA, J.; LEUNG, T.; GANSUKH, B.; SALTZ, L.B. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. **The Journal of the American Medical Association**, v.304(19), p.2154-60, 2010.
- ALBRIGHT, C.F.; GRACIANI, N.; HAN, W.; YUE, E.; STEIN, R.; LAI, Z.; DIAMOND, M.; DOWLING, R.; GRIMMINGER, L.; ZHANG, S.Y.; BEHRENS, D.; MUSSELMAN, A.; BRUCKNER, R.; ZHANG, M.; JIANG, X.; HU, D.; HIGLEY, A.; DIMEO, S.; RAFALSKI, M.; MANDLEKAR, S.; CAR, B.; YELESWARAM, S.; STERN, A.; COPELAND, R.A.; COMBS, A.; SEITZ, S.P.; TRAINOR, G.L.; TAUB, R.; HUANG, P.; OLIFF, A. Matrix metalloproteinase-activated doxorubicin prodrugs inhibit HT1080 xenograft growth better than doxorubicin with less toxicity. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.4(5), p.751-60, 2005.
- BALMAIN, A.; HARRIS, C.C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, v.21(3), 371-377, 2000.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. **Química Medicinal**. Porte Alegre, RS: Artmed Editora, 2001.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. Review: DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v.3(8-9), p.1109-1115, 2004.
- BAYLY, A. C.; ROBERTS, R. A.; DIVE, C. Mechanisms of apoptosis. In: BITTAR, E. E. Advances in molecular and cell biology, Greenwich, CT: JAI Press, v. 20, p. 183-229, 1997.
- BENBOW, U.; MAITRA, R.; HAMILTON, J.W.; BRINCKERHOFF, C.E. Selective modulation of collagenase 1 gene expression by the chemotherapeutic agent doxorubicin. **Clinical Cancer Research**, v.5(1), p.203-208, 1999.
- BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BATTASTINI, A. M. O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces *in vivo* glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v.281, p.53–63, 2009.
- BOGO, D. Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica do ácido lacanórico e de seus produtos de modificação estrutural. 2009. **Dissertação.** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2009.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A.; KINGSTON, D. G. I. **Journal of Natural Products**, v.11, p.1683-1688, 1995.
- BOSCH, X. F.; SANJOSÉ, S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v.31, p.3-13, 2003.
- BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2612-2619, 2007.

- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, p. 231-239, 2005.
- BRENDLER-SCWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.
- BUKART, A., Las Leguminosas Argentinas. Aemé Agengy: Buenos Aires, 1952.
- CARVALHO, P.E.R., Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **EMBRAPA-CNPF**: Colombo, 1994.
- CASCALES, A.; SÁNCHEZ-VEJA, B.; NAVARRO, N.; PASTOR-QUIRANTE, F.; CORRAL, J.; VICENTE, V.; DE LA PEÑA, F.A. Clinical and genetic determinants of anthracycline-induced cardiac iron accumulation. **International Journal of Cardiology**, IJCA-12910 [Epub ahead of print], 2010.
- CAVALCANTE, W.L.G.; CAMPOS, T.O.; PAI-SILVA, M.D.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n.3, p. 490-497, 2007.
- CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.; RAO, V.S; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 44, p. 388-392, 2006.
- CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E.A.; SCHILTER, B. Protective effects of coffe diterpene against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 39, p. 549-556, 2001.
- COLETTI, J.; BONDUELLE, G. M.; IWAKIRI, S. Avaliação de defeitos no processo de fabricação de lamelas para pisos de madeira engenheirados com uso de ferramentas de controle de qualidade. **Acta Amazonica**, v. 40, p. 135-140, 2010.
- COLLINS, R. A.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI. M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Advance Access Publication**, v. 23, p. 143-151, 2008
- COLLISSON, E. A.; KLEER, C.; WU, M. et al. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.2, p.941-948, 2003.
- CONGER, K.L.; LIU, J.S.; KUO, S.R.; CHOW, L.T.; WANG, T.S. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 2696- 2705, 1999.
- COSTA, M. M.; HILLIOU, F.; DUARTE, P.; PEREIRA, L. G.; ALMEIDA, I.; LEECH, M.; MEMELINK, J.; BARCELO, A.R.; SOTTOMAYOR, M. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolismo of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, v.146, p.403-417, 2008.

- COSTA, R.M.A.; LIMA, W.C.; VOGEL, C.I.G.; BERRA C.M.; LUCHE, D.D.; MEDINA-SILVA, R.; GALHARDO, R.S.; MENCK, C.F.M.; OLIVEIRA, V.R. DNA repair-related genes in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.131-140, 2001.
- 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, p. 1-26, 2000.
- COZZI, R., RICORDY, R., AGLITTI, T., GATTA, V., PERTICONE, P., DE SALVIA, R. Ascorbic acid and  $\beta$ -carotene as modulators of oxidative damage. **Carcinogenesis**, v.18, p. 223-228, 1997.
- CUZZOCREA, S.; RILEY, P.D.; CAPUTI, P.A.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, in Xammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 135–159, 2001.
- D'ANDRILLI, G.; BOVICELLI, A.; GIORDANO, A. HPV Vaccines: Stages of the Art. **Journal Cellular Physiology**, v.224, p.601-604, 2010.
- DAVIES, H.W.; KENNEDY, S.M.; TESCHKE, K.; QUINTANA, P.J. Citogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. **Mutation Research**, v. 416, p. 101-113, 1998.
- DELIGEOROGLOU, E.; CHRISTOPOULOS, P.; ARAVANTINOS, L.; PAPADIAS K. Human papilloma virus molecular profile and mechanisms of cancerogenesis: a review. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v.30, n. 2, p.128-132, 2009.
- DHIR, H.; KUMAR, A.; SHARMA, A. Relative efficiency of *Phyllanthus emblica* fruit extract and ascorbic acid in modifying lead and aluminium-induced sister chromatid exchanges in mouse bone marrow. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.21, p. 229-236, 1993.
- DIVYA, C.S.; PILLAI M.R. Antitumor Action of Curcumin in Human Papillomavirus Associated Cells Involves Downregulation of Viral Oncogenes, Prevention of NFkappaB and AP-1 Translocation, and Modulation of Apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**, v.45, p.320-332, 2006.
- DOORBAR, J.; CUBIE, H. Molecular Basis for Advances in Cervical Screening. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v.9, n.3, p.129-142, 2005.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papilomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v.110, p.525-541, 2006.
- DUARTE, R.A.; MELLO, E.R.; ARAKI, C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D. H. S.; REGASINI; L. O.; SILVA, T. G. A.; MORAIS, M. C. C. XIMENES, V. F.; SOARES, C. P. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumor Biology**, v.31, n. 5, p.513-522, 2010.

- DUBARD, A. C.; Schmid, D.; YOW, A.; ROGERS, B. A.; LAWRENCE, W.W. Recommendation for and Receipt of Cancer Screenings Among Medicaid Recipients 50 Years and Older. **Archives of Internal Medicine**, v.168, n. 18, 2008.
- ELSTEIN, K. H.; ZUCKER, R. M. Comparison of ellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. **Experimental Cell Research**, v.211, p.322-331, 1994.
- FADARE, O.; YI, X.; LIANG, S. X.; MA, Y.; ZHENG, W. Variations of mitotic index in normal and dysplastic squamous epithelium of the uterine cervix as a function of endometrial maturation. **Modern Pathology,** v.20, p.1000–1008, 2007.
- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p.37-59, 1995.
- FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M.; SIQUEIRA, D. H. S. Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Flavones from *Pterogyne nitens*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 723-726, 2008.
- FERREIRA, F. G.; REGASINI, L. O.; OLIVEIRA, A.M.; CAMPOS, J. A. D. B.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SANTOS, R. A.; BASSI, C.L.; BOLZANI, V. S.; SOARES, C. P. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em Tradescantia pallida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19(1A), p. 61-67, 2009.
- FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B.M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; CARVALHO, A.F.U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Annals of the Brazilian Academy of Science**, v. 83(3), p. 1045-1058, 2011.
- FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.
- GANDER, S.; SCHOLTEN, V.; OSSWALD, I.; SUTTON M.; VAN WYLICK R. Cervical Dysplasia and Associated Risk Factors in a Juvenile Detainee Population. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, 2009
- GAO, H.; LAMUSTA, J.; ZHANG, W.F.; SALMONSEN, R.; LIU, Y.; O'CONNELL, E.; EVANS, J.E.; BURSTEIN, S.; CHEN, J.J. Tumor Cell Selective Cytotoxicity and Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from *Brucea javanica*. **North American Journal of Medical Sciences**, v.4(2), p.62–66, 2011.
- GIOVANNUCCI, E. Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. **American Journal of Epidemiology**, v.147, p.1043-1052, 1998.
- HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006.
- HANAHAN, D.; WEINBERG; R.A. The hallmarks of cancer. Cell, v.100(1), p.57-70, 2000.

- HANAHAN, D.; WEINBERG; R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144(5), p.646-74, 2011.
- HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A.; ITO, T.; KAWAMURA, J.; KAWABE, A.; KAGANOI, J.; MAEDA, M.; WATANABE, G.; IMAMURA, M. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v.39, p.2239-2246, 2003.
- HAVELKA, A. M.; BERNDTSSON, M.; OLOFSSON, M. H.; SHOSHANMC, LINDER, S. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.7(10), p.1035-9, 2007.
- HAZEN, M. J.; GUTIÉRREZ-GONZÁLVEZ, M. G. UV-mediated toxic bioactivity of harmine in the meristematic cells of *Allium cepa*. **Mutagenesis**, v.3(4), p.333-5, 1988.
- HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHEELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H.; MACCGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenic damage: Past, Present, and Future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, p. 277-291, 1991.
- HORVATH, C. A. J.; BOULET, G. A. V.; RENOUX, V. M.; DELVENNE, P. O.; BOGERS, J. J. Mechnisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology Journal**, v.7, p.1-7, 2010.
- IKUMA, N.E.M.; PASSONI, H.M.; BISO, I.F.; LONGO, C.M.; CARDOSO, P.R.C.; CAMPANER, S.L.; VARANDA, A.E. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 361–366, 2006.
- INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas e incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa. Acesso em: 10/01/2011.
- IQBAL, S.; TSAO-WEI, D.D.; QUINN, D.I.; GITLITZ, B.J.; GROSHEN, S.; APARICIO, A.; LENZ, H.J.; EL-KHOUEIRY, A.; PINSKI, J.; GARCIA, A.A. Phase I clinical trial of pegylated liposomal doxorubicin and docetaxel in patients with advanced solid tumors. **American Journal of Clinical Oncology**, v.34(1), p.27-31, 2011.
- JEONG, T.J.; MOON, J.-H.; PARK, K.H.; SHIN, S.CH. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2123–2128, 2006.
- JIN, C.; LI, H.; HE, Y.; HE, M.; BAI, L.; CAO, Y.; SONG, W.; DOU, K. Combination chemotherapy of doxorubicin and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.136(2), p.267-74, 2010.
- KANODIA, S.; FAHEY, L.M.; KAST, W.M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007

- KAUFMANN, A. M.; NIELAND, J.; SCHINZ, M.; NONN, M.; GABELSBERGER, J.; MEISSNER, H.; M'ULLER, R.T.; JOCHMUS2, I.; GISSMANN, L.; SCHNEIDER, A.; DURST, M. HPV 16 L1e7 Chimeric Virus-Like Particles Induce Specific Hla-Restricted T Cells In Humans After In Vitro Vaccination. **International Journal of Cancer**, v. 92, p. 285-293, 2001
- KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 1–27, 1995.
- KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27–45, 2003.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLES, J.; VON DER HUDE, W.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v. 35, p. 167-172, 2000.
- KNIAZHANSKI, T.; JACKMAN, A.; HEYFETS, A.; GONEN, P.; FLESCHER, E.; SHERMAN, L. Methyl jasmonate induces cell death with mixed characteristics of apoptosis and necrosis in cervical cancer cells. **Cancer Letters**, v.271, p.34–46, 2008.
- KOLARIĆ, K.; MARICIĆ, Z.; NOLA, P.; KRUSIĆ, J. Modified administration schedule of adriamycin in solid tumors. Zeitschrift für Krebsforschung und klinische Onkologie. **Cancer Research and Clinical Oncology**, v.88 (3), p.255-60, 1977.
- KOROSTOFF, J.; WANG, J.F.; KIEBA, I.; MILLER, M.; SHENKER, B.J.; LALLY, E. T. *Actnobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. **Infection and Immunity,** v. 66, n. 9, p. 4474-4483, 1998.
- KUWANA, T.; NEWMEYER, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 691–699, 2003.
- LI, J.; LI, Q.; FENG, T.; LI, K. Aqueous extract of *Solanum nigrum* inhibits growth of cervical carcinoma (U14) via modulating immune response of tumor bearing mice and inducing apoptosis of tumor cells. **Fitoterapia**, v.79, p.548–556, 2008.
- LIEBMAN, A. M.; ROCHE I. M.; WILLIAMS, R. B.; KIM, J.; PAGEAU, C. S.; SHARON, J. Antibody treatment of human tumor xenografts elicits active anti-tumor immunity in *nude* mice. **Immunology Letters**, v. 114, p. 16-22, 2007
- LIMA, D. R. Manual de farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia. Cp 12. **Oncologia**. Medsi, RJ. 2004.
- LIN, P.; KOUTSKY, L. A.; CRITCHLOW, C. W. HLA Class II DR-DQ and Increased Risk of Cervical Cancer among Senegalese Women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.10, p.1037-1045, 2001.
- LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-α production in peritoneal macrophages by ethyl acetate

- fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological & Pharmaceutical. Bulletin**, v. 28(9), p. 1726-1730, 2005.
- LOPES, F. C. M.; ROCHA, A.; PIRRACO, A.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; AZEVEDO, I.; CARLOS, I. Z.; SOARES, R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 9:15 doi:10.1186/1472-6882-9-15, 2009.
- LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3 ed. Nova Odessa, São Paulo, **Instituto Plantarum**, p. 395, 2000.
- LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª ed., Nova Odessa, São Paulo, **Instituto Plantarum**, p. 395, 2000b.
- MACIAS, P. C.; SCHLECHT, N. F.; SOUZA, P. S. A. Major Histocompatibility Complex Class II Polymorphisms and Risk of Cervical Cancer and Human Papillomavirus Infection in Brazilian Women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention,** v.9, p.1183-1191, 2000.
- MACIOROWSKI, Z.; DELIC, J.; PADOY, E.; KLIJANIENKO, J.; DUBRAY, B.; COSSET, J-M.; DUMONT, J.; MAGDELÉNAT, H.; VIELH, P. Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in Hodgin's lymphomas. **Cytometry**, v. 32, p. 44-50, 1998.
- MADKAN, V.K.; COOK-NORRIS, R.H.; STEADMAN, M.C.; ARORA, A.; MENDOZA, N.; TYRING, S.K. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 228–241, 2007.
- MADLE, E.; OBE, G.; HANSEN, J.; RISTOW, H. Harman and norharman: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro and interaction with isolated DNA. **Mutagenesis Research**, v.90(4), p.433-42, 1981.
- MANSOUR, H.B.; BOUBAKER, J.; BOUHLEL, I.; MAHMOUD, A.; BERNILLON, S.; CHIBANI, J.B.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antigenotoxic activities of crude extracts from *Acacia salicina* leaves. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v. 48, n.1, p. 58-66, 2007.
- MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; IWAMI, J.; LI, X.; PONGPIRIYADACHA, Y.; NAKAI, M.; KUBO, M.; FUKUYAMA, Y.; YOSHIKAWA, M. Invasion Inhibitors of Human Fibrosarcoma HT 1080 Cells from the Rhizomes of *Zingiber cassumunar*: Structures of Phenylbutanoids, Cassumunols. **Chemical Pharmaceutical Bulletin,** v. 59(3), p. 365-370, 2011.
- MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 872-885, 2008.
- MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutation Research**, v. 512, p. 135–153, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativas alertam sobre o HPV. Portal da Saude – SUS. Disponivel em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\_texto.cfm?idtxt=22444. Acesso em: 20/06/2011.

MOCHIZUKI, T.; RUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J.F.; TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with <sup>99m</sup> Tc- annexin V. **Journal of Nuclear Medicine**, v.44, n.1, 2003.

MOLLER, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 336–345, 2005.

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

MUGGIA, F.M.; GREEN, M.D. New anthracycline antitumor antibiotics. **Critical Reviews** in **Oncology/Hematology**, v.11 (1), p.43-64, 1991.

MUNAGALA, R.; KAUSAR, H.; MUNJAL, C.; GUPTA, R.C. Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and up-regulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. **Carcinogenesis Advance**, 2011.

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. **Current Medicinal Chemistry**, v.14, n.3, p.271-277, 2007.

MYERS, E.; HUH, W. K.; WRIGHT, J. D.; SMITH, J. S. The current and future role of screening in the era of HPV vaccination. **Gynecologic Oncology**, v.109, p. S31–S39, 2008.

NAIR, S.; PILLAI, M.R. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. **Oral Diseases**, v. 11, p. 350–359, 2005.

NAKAYASU, M.; NAKASATO, F.; SAKAMOTO, H.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. Mutagenic activity of heterocyclic amines in Chinese hamster lung cells with diphtheria toxin resistance as a marker. **Mutagenesis Research**, v.118(1-2), p.91-102, 1983.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, v. 98, n. 10, p. 1505–1511, 2007.

NG, W.K.; YAZAN, L.S.; ISMAIL, M. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. **Toxicology in Vitro**, v.25, p.1392–1398, 2011.

NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; HOSER, G.; RINK, L.; et al. Id1 Transcription Inhibitor-Matrix Metalloproteinase 9 Axis Enhances Invasiveness of the Breakpoint Cluster

- Region/Abelson Tyrosine Kinase-Transformed Leukemia Cells. **Cancer Research**, v.66, p.4108-4116, 2006.
- OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v. 117, n.1, p. 79-92, 1989.
- OLIVEIRA-JUNIOR, R. J. Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180. 2008. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Bioquímica) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2008.
- 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 dehydrothyrsiferol. **Biochemical Pharmacology**, v.65, p.1451–1461, 2003.
- PETT, M.; COLEMAN, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? **Journal of Pathology,** v. 212, p. 356–367, 2007.
- POPIOLEK, D.; VENTURA, K.; MITTAL, K. Distinction of low-grade squamous intraepithelial lesions from high-grade squamous intraepithelial lesions based on quantitative analysis of proliferative activity. **Oncology Reports**, v.11(3), p.687-91, 2004.
- PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 1, n. 5, p. 24-31, 2008.
- PULIDO, M. D.; PARRISH, A. R. Metal-induced apoptosis: mechanisms. **Mutation Research**, v.533, p.227-241, 2003.
- QI, L.; XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.4243-4245, 2006.
- RAZAVI, H. M.; HAMILTON, J. A.; FENG, Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. **Pharmacology & Therapeutics**, v.106, p.147-162, 2005.
- REGASINI, L. O. Estudo químico de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcalóides guanidínicos e análogos. 2008. **Tese** (**Doutorado em Química**) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- REGASINI, L.O.; FERNANDES D.C.; CASTRO-GAMBOA I.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M., BOLZANI V.S, BARREIRO E.J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, M.C.M.; TORRES L.B.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quimica Nova**, n. 31, p. 802-806, 2008a.
- REGASINI, L. O.; VELLOSA, J.C.R.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O.M.M.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I.L.; YOUNG, M.C.M.; BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v.69, p. 1739-1744, 2008b.

- RIVA, C.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *Dreissena polymorpha* using the comet and micronucleus assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 9, p. 735-43, 2007.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO L. R., FENECH., M. Teste do Micronúcleo em Células Humanas *in vitro*. In: L.R. RIBEIRO, D.M.F. SALVADORI, E.K. MARQUES (Eds.). **Mutagênese Ambiental**, Editora da ULBRA, Canoas, p. 201-223, 2003.
- SASAKI, Y. F.; YAMADA, H.; SHIMOI, K.; KINAE, N.; TOMITA, I.; MATSUMURA, H.; OHTA, T.; SHIRASU, Y. Enhancing effects of heterocyclic amines and beta-carbolines on the induction of chromosome aberrations in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v.269(1), p.79-95, 1992.
- SCHMITTA, E. M. M.; JONASA, R.; DEKANTA, W.; STOPPER, H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.542, p.43-48, 2003.
- SESSA, C.; ZUCCHETTI, M.; GHIELMINI, M.; BAUER, J.; D'INCALCI, M.; JONG, J.; NAEGELE, H.; ROSSI, S.; PACCIARINI, M.A.; DOMENIGONI, L.; CAVALLI, F. Phase I clinical and pharmacological study of oral methoxymorpholinyl doxorubicin (PNU 152243). **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.44 (5), p.403-410, 1999
- SIMONART, T.; BOELAERT, J. R.; ANDREI, G.; CLERCQ, E.; SNOECKA, R.; Iron withdrawal strategies fail to prevent the growth of SiHa-induced tumors in mice. **Gynecologic Oncology**, v. 90, p.91–95, 2003.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SIRIKANTARAMAS, S.; ASANO, T.; SUDO, H.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. Camptothecin: therapeutic potential and biotechnology. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 8, p.196-202, 2007.
- SPPV, SOCIEDADE PORTUGUESA DE PAPILLOMAVÍRUS. Características gerais dos HPV's. Disponível em: http://www.sppv.org/info\_ciencia.html. Acesso em: 07/01/2011.
- STANLEY, M. Genital human papillomavirus infections-current and prospective therapies. **Journal of National Cancer Institute Monographs**. v.31, p.117-124, 2003.
- STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, S15-S21, 2008.
- STORZ, P.; DÖPPLER, H.; COPLAND, J.A.; SIMPSON, K.J.; TOKER, A. FOXO3a promotes tumor cell invasion through the induction of matrix metalloproteinases. **Molecular and Celullar Biology**, v.29(18), p.4906-17, 2009.

- TAO, K.S.; WANG, W.; WANG, L.; CAO, D.Y.; LI, Y.Q.; WU, S.X.; DOU, K.F. The multifaced mechanisms for coffe's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses**, v.71 (5), p.730-736, 2008.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- TONIN, G.A.; GATTI, A.B.; CARELLI, B.P.; PEREZ, S.C.J.G.A., Influência da temperatura de condicionamento osmótico na viabilidade e no vigor de sementes de *Pterogyne nitens*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n.2, p. 35-43, 2005.
- TOROUS, D.K.; DERTINGER, S.D.; HALL, N.E.; TOMETSKO, C.R. An automated method for discriminating Aneugen vs. Clastogen- induced micronuclei. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p.340-344, 1998.
- VAN GENDEREN. H. O.: KENIS, H.: HOFSTRA, L.; NARULA, J.: P. Extracellular REUTELINGSPERGER. C. M. annexin A5: **Functions** of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. Biochimita et Biophysica **Acta,** v. 1783, p. 953–963, 2008.
- VANPARYS, P.; DEKENUDT, G., VERMEIREN, F.; SYSMANS, M.; MARSBOOM, R. Sampling times in micronucleus testing. **Mutation Research**, v. 282, p. 191-196, 1992.
- VELLOSA, J.C.R. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase, **Dissertação** (mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Câmpus de Araraquara, Araraquara, p. 64, 2005.
- WATT, F.M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,** v. 353, p. 831–837, 1998.
- WATANABE, M.; HITOMI, M.; VAN DER WEE, K.; ROTHENBERG, F.; FISHER, S. A.; ZUCKER, R.; SVOBODA, K. K. H.; GOLDSMITH, E. C.; HEISKANEN K.M.; NIEMINEN, A. L. The Pros and Cons of Apoptosis Assays for Use in the Study of Cells, Tissues, and Organs. **Microscopy and Microanalysis**, v. 8, p. 375–391, 2002.
- WHEATE, N. J.; BRODIE, C. R.; COLLINS, J.G.; KEMP, S.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.7(6), p.627-48, 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.
- YOON, C.S.; KIM, K.D.; PARK, S.N.; CHEONG, S.W. Alpha(6) integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, p. 668–673, 2001.

- YUE, W.; SUN, Q.; LANDRENEAU, R.; WU, C.; SIEGFRIED, J. M.; YU, J.; ZHANG, L. Fibulin-5 suppresses lung cancer invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-7 expression. **Cancer Research**, v.69(15), p.6339-6346, 2009.
- YUSPA, S. H. The pathogenisis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenisis. **Journal of Dermatological Science**, v. 17(1) p.1-7, 1998.
- ZEHBE, I.; RICHARD, C.; LEE, K.F.; CAMPBELL, M.; HAMPSON, L.; HAMPSON, I.N. Lopinavir shows greater specificity than zinc finger ejecting compounds as a potential treatment for human papillomavirus-related lesions. **Antiviral Research**, v.91, p.161–166, 2011.
- ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmaceutica**, v.25, p.83-89, 2004.
- ZHANG, Z.; KNOBLOCH, T.J.; SEAMON, L.G.; STONER, G.D.; COHN, D.E.; PASKETT, E.D.; FOWLER, J.M.; WEGHORST, C.M. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells. **Gynecologic Oncology**, doi:10.1016/j.ygyno.2011.07.023, p.1-6, 2011.
- ZIGRINO, P.; KUHN, I.; BAUERLE, T.; ZAMEK, J.; FOX, J.W.; NEUMANN, S.; LICHT, A.; SCHORPP-KISTNER, M.; ANGEL, P.; MAUCH, C. Stromal Expression of MMP-13 Is Required for Melanoma Invasion and Metastasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, p.2686-2693, 2011.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer,** v. 2, p. 342-350, 2002.
- ZUR HAUSSEN, H. Papillomviruses in the causation of human cancers a brief historical account. **Virology**, v.384, p.260-265, 2009.

# CAPÍTULO 2

# Artigo Científico

Nitensidine A induces apoptosis in cervical cancer cell lines immortalized with HPV16 (SiHa).

Juliana M. Sorbo Bozeto<sup>(a)</sup>, Felipe de O. Souza<sup>(a)</sup>, Mauro C. Cafundó de Morais<sup>(a)</sup>, Flávio de C. M. Monteiro<sup>(a)</sup>, Jamile A. Oliveira<sup>(a)</sup>, Luis O. Regasini<sup>(b)</sup>; Dulce H. S. Silva<sup>(b)</sup>, Vanderlan S. Bolzani<sup>(b)</sup> and Christiane P. Soares<sup>(a)</sup>\*.

<sup>(a)</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State - UNESP, R. Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14801-902, Araraquara, Sao Paulo, Brazil. <sup>(b)</sup>Institute of Chemistry of Araraquara, University of São Paulo State - UNESP, R. Prof. Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, Zip code 14801-970, Araraquara, Sao Paulo, Brazil.

C.P. Soares. Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Phone +55 16 3301 5707; fax +55 16 3301 6559; e-mail address: soarescp@hotmail.com

<sup>\*</sup> Author to whom correspondence must be sent:

#### **Abstract**

Cervical cancer is the second most common of cancer among women and is associated with human papillomavirus (HPV) which infects squamous epithelial cells. Nitensidina A is a guanidine alkaloid isolated from Pterogyne nitens, which has anti-inflammatory and anti-oxidants. To evaluate the cytotoxicity of nitensidine A MTT test was performed and it was to observe a concentration-response effect (SiHa IC<sub>50</sub> = 10.31  $\mu$ g/ml, C33A =11.91  $\mu$ g/ml) for 24 h. To apoptosis assay was evaluated through Annexin V assay, in both cell lines and treatment times we could observed death most significant by early apoptosis in SiHa cells and C33A. The Hoechst-IP assay was performed, in SiHa treated for 24 h at lower concentrations we could observe cell death by early apoptosis, and only late apoptosis at highest concentration (81.4±1.4%). For 48 h at all concentrations cell death was by late apoptosis. In C33A at 24 h was not observed significant cell death. At 48 h, the highest concentration induced late apoptosis (57.7±20.6 %). We can conclude that SiHa and C33A presented apoptosis profile in annexin V, but in Hoechst/Propidium Iodide apoptosis was mainly observe in SiHa cell lines, indicating a relative selectivity of apoptosis in cell immortalized by HPV16.

Key-words: cervical cancer, HPV, nitensidine A, apoptosis.

#### Introduction

Cervical cancer is the second most common cancer worldwide, with nearly five hundred thousand cases and more than two hundred and seventy thousands deaths annually [1]. According to the Ministry of Health the number of new cases of cervical cancer expected to Brazil in 2010 and 2011 are 18,430 with an estimated risk of 18 cases per 100,000 women [2]. This cancer has been correlated with environmental, genetic and infectious factors, where HPV is related to 90% of cases among the global population. Of the 500,000 new cases that are diagnosed, approximately 80% occur in developing countries and estimates show that by 2020, is still expected an increase of 90% of cases [3-4-5-6-7-8].

HPV is a public health problem that primarily affects developing countries, where the population with low social status and poor hygiene habits becomes the main focus of viral infection that progresses to malignancy [2]. Infection with high-risk oncogenic subtypes of HPV is the major risk factor for the development of malignant lesions in the cervix. Although HPV infection may be the triggering factor, studies show that a linkage between genetic factors and immune functions are corelated to cervical carcinogenesis and infection by the major subtypes of high-risk [7].

Over 200 types of HPV have been isolated, and there is no doubt that there are other types that have not been identified. HPV leads to large epithelial lesions, mostly benign, such as warts or papillomas, with low malignant potential. A small fraction of people infected with the type of high-risk HPV will develop cancer, which usually arise many years after initial infection [9]. There are about 30 types of HPV and genital mucosa divided into low risk (types 6, 11, 42, 43 and 44) and high risk that are associated with precancerous lesions (types 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 and 56), according to their presence in malignant lesions of the cervix [10].

Apoptosis is a controlled cell death process and its role complements mitosis and cellular growth. It is initiated by excess or lack of cell growth stimuli, proliferation and even cellular damage. Therefore, apoptosis is critical for controlling the growth of organs and tissues and in maintaining life [11]. Tumor Cell proliferation is modulated by several survival and cell death signals. This coordinated action allows the normal cell to grow and divide until their senescence [12-13]. However, cancer cells lose their capacity to regulate these signals, resulting in uncontrolled proliferation and absence of cell death, contributing to the development of tumors. In general, chemical stimuli may induce cell death by necrosis or apoptosis, which are differentiated by the morphology and cellular pathways [12-14-15-16].

As part of our bioprospecting program [17], aiming to discover novel antitumor agents, *Pterogyne nitens* and its alkaloids were selected for detailed biological studies [18]. Among these compounds, pterogynine and pterogynidine, two hemiterpene guanidines, showed potent cytotoxic [19], pro-apoptotic [20] and anti-angiogenic activities [21]. The present study described activity of nitensidine A, a monoterpene-guanidine alkaloid from *P. nitens*. This property was tested by in vitro assays, included apoptosis-inducing activity against on cervical cancer cell lines infected with HPV16 (SiHa) and non-infected (C33A).

#### Materials and Methods

#### Cell culture

Cervical cancer cell lines immortalized by HPV16 (SiHa-ATCC: HTB-35) and non-immortalized (C33A- ATCC: HTB-31) were kindly provided by Dr. Luiza Lina Villa (Ludwig Institute for Cancer Research), but the cells came previously of ATCC. Cells were cultivated in DMEM and Ham's F10 nutrient mixture (1:1) with antibiotics and supplemented with 10% fetal bovine serum in incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

## Phytochemical procedure

Pterogyne nitens leaves were collected at the Botanic Garden of São Paulo, São Paulo State, Brazil, in January 2005. A voucher specimen (SP204319b) has been deposited in the herbarium of the Botanic Institute (São Paulo State, Brazil).

The shade-dried leaves (1.4 kg) were ground and defatted with hexanes (1.0 L  $\times$  5, at room temperature, for five weeks) and exhaustively extracted by maceration with ethanol (2.0 L  $\times$  5, at room temperature). The ethanol extract was concentrated under reduced pressure ( $\leq$  50 oC) to yield 5.8 g of a syrup. The concentrate was diluted with methanol–water (1:4) (1.5 L) and partitioned successively with ethyl acetate (2.5 L  $\times$  3) and n-butanol (2.5 L  $\times$  3). After removal of the solvent 2.3 g and 2.9 g of extract were afforded, respectively.

The n-butanol fraction (2.5 g) was subjected to gel permeation column chromatography using Sephadex LH-20, eluted with methanol to afford nine fractions (B1–B9), which were combined after comparison of their TLC profile [chloroform-methanol (9:1)] revealed with Dragendorff's and Sakaguchi's reagents. The alkaloidal fraction (B2, 1,5)

g) was subjected to reversed-phase C18 silica gel column chromatography eluted with acetonitrile:water gradient that furnished eight fractions (ALK1–ALK8). Fraction ALK-8 (670 mg) was further purified by High Performance Liquid Chromatography, [acetonitrile-water-acetic acid (16:84:0.01), 235 nm, and 13 mL/min], to yield a colorless oil (422 mg).

The molecular structure of nitensidine A was identified through 1H NMR, 13C NMR, and by comparison with literature data [22-23]. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δH (multiplicity; J in Hz): 6.80 (br s), 5.19 (t; 6.5), 5.00 (t; 5.0), 3.80 (t; 6.5), 2.00–2.05 (m), 1.58 (s), and 1.59 (s). 13C NMR (125 MHz, DMSO-d6) δC: 157.5, 141.6, 132.0, 123.5, 118.4, 39.5, 39.3, 26.2, 25.6, 17.6, and 16.3.

The extraction, isolation and characterization of nitensidine A from Pterogyne nitens branches were previously described by Regasini and co-authors [23]

# Cytotoxicity

Cells were seeded at  $5\times104$  cells/mL (100 µL/well) in a clear 96-well plate and incubated. After 24h, cell culture media was replaced by fresh media with compound diluted in several concentrations. Cells were treated for 24h (t0) or treated for 24h and additional 24h in fresh media without compound (t24) in order to evaluate treatment recovery. After treatment, cell media was discarded and 10 µL MTT solution (5 mg/mL in PBS) was added in each well. Plates were incubated at 37 oC protected from light for three hours, so living cells to reduce MTT to a blue formazan salt. Crystals were dissolved in 100 µL of isopropanol and plates scanned in spectrophotometer at 540 nm. Live cells percentage was estimated according to the formula [24]:

Live cells  $\% = (O.D.test / O.D.vehicle control) \times 100$ 

## Anexin V assay

Cells were seeded at 1×105 cell/well in 12-well plate for 24 h. After incubation, cells were treated as described above and harvested with trypsin. Cell suspension was transferred to microtubes and washed twice with PBS after centrifugation (for 10 minutes). Annexin V was measured with FITC-conjugated Annexin-V Apoptosis Detection Kit (Alexis, Lausen, Switzerland). Cells were suspended in 500 L of binding buffer, 5 L of FITC-conjugated Annexin-V and 5 l of propidium iodide (PI). Reaction was performed at room temperature protected from light. Cells fluorescence was measured in FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Cells marked with FITC were considered in apoptosis and cells marked with IP were considered necrosis.

#### Hoechst 33342 stain assay

Cell stain with Hoechst 33342 (HO) and PI allows differentiate between early apoptosis, late apoptosis and necrosis. Cells were seeded in 12-well plates at 2×105 cells/mL and incubated for 24 h to attach. After treated as described above, cells were harvested and labeled with HO (1 μg/ml), PI (2.5 μg/ml) and DAF (5 μg/mL) at 37 °C for 5 minutes. The cells were examined by fluorescence microscopy and considered viable (intact blue nuclei), early apoptotic (fragmented blue nuclei), late apoptotic (fragmented pink nuclei) and necrotic (intact pink nuclei) [25]. The percentage of viable, apoptotic, and necrotic cells were represented out of a total of 500 cells counted.

#### Statistical analyses

For statistical analysis of the cytotoxicity assay (MTT), Annexin V, Hoechst and Caspase methods, data were first tested for normality. This showed a normal distribution, so a parametric test was applied. Differences were tested by one-way analysis of variance (ANOVA), with Tukey's post-test. This analysis was performed with GraphPad Prism® Version 5.1 software (GraphPad Software Inc., USA). Results are expressed as mean of three independent experiments ± standard deviation.

#### Results

#### Cytotoxicity

The cytotoxicity of the alkaloid nitensidine A was evaluated in a proportion of 3:1. Therefore the concentrations evaluated in the present study were 0.25; 0.74; 2.22; 6.66 e 20.0 µg/ml, all concentration was solubilized in cell culture médium appropriede to allown the growth the cell lines SiHa (HPV-16) e C33A (cell line not infected with HPV16) in two times (24 e 48 hours). To determinate the IC50 and after linear calculations to graphic the reta equation.

We can observe that a dose concentration was seen in the different concentrations in cell lines SiHa (Figure 2). Its possible observe that ih higher concentration was higher cell death in both time of treatment. In lower concentrations, a small number of cell death was observed also in both time of treatment, showing that cytotoxicity activity. Statistical analyze demonstrate that IC50 nitensidine A in 24 hours was  $10.31 \,\mu\text{g/ml}$  (y = -0.0297x + 0.8065) and IC50 nitensidine A in 48 hours was  $11.17 \,\mu\text{g/ml}$  (y = -0.0409x + 0.9572).

As we could observe the cytotoxicity in C33A cell line was quite similar to SiHa cytotoxicity and no statistical difference was observed between both cell lines. In C33A was

possible to observe a clear dose-concentration response (Figure 3) and no statistical differences was observed in time-concentration (24 and 48 hours). Statistical analyze demonstrate that IC50 nitensidine A in 24 hours demonstrate that IC50 nitensidine A in 24 hours was  $11.91 \,\mu\text{g/ml}$  (y = -0.0337x + 0.9015) and IC50 nitensidina A in 48 hours was  $8.18 \,\mu\text{g/ml}$  (y = -0.0314x + 0.757).

## Anexin V assay

In order to evaluate if nitensidine A induced apoptosis, we have done Anexin V assay in flow cytometry (BD FACSCanto) to both cell lines (SiHa e C33A) treated in 0.25; 0.74; 2.22; 6.66 e 20.0 μg/ml concentrations of the alkaloid nitensidine A. Moreover the cells were treated in two time (24 and 48 hours to evaluate which one is better to induce apoptosis. To positive control in the anexin V, we used higher (doxorrubicine 50 μg/mL) because in anexin V did not response to 15 μg/mL as observed in cytotoxicity assay.

In the cell line SiHa treated with nitensidine A (Figure 4) we could observe a higher cell death with early apoptosis in both tempos. In contrast, in the highest concentration (20.0  $\mu$ g/ml), the cell death was to late apoptosis/necrosis. No difference was observed in time of treatment (24 and 48 hours). In addition, in 48 hours of treatment um clear dose-concentration response was observed in anexin V assay.

To C33A cell line (Figure 5) we could observe the same results found in SiHa, to both time of treatment. The early apoptosis was high and a discrete elevation of late/necrosis (10% a 15% of cell death) to both time of treatment with nitensidine A.

#### Hoechst / Propidium Iodide assay

The do Hoechst / Propidium Iodide was developed to complement the results of AnexinV since in this assay we can define early apoptosis, late apoptosis and necrosis. The figure 5 demonstrate the results of Hoechst / Propidium Iodide in SiHa cell lines and in both time of treatment (24 and 48 hours).

In the 24 hours of treatment with nitensidine A in SiHa cells (Figura 6-A) we could observe a concentration-response with predominantly elevation of apoptosis than necrosis. When we compare precocious and late apoptosis (Figura 6-B), it is possible to observe higher cell death with early apoptosis than late one. The relation between early apoptosis and concentration with nitensidine A demonstrated that 0.74 μg/mL (29.2% ± 2.0); 2.22 μg/mL (61.2%±6.5) e 6.66 μg/mL (41.6%±3.7). In contrast, in the highest concentration the cell death was for late apoptosis (81.4%±1.4). In 48 hours of treatment with nitensidine A in SiHa cell line (Figure 6-C), we could observe that the cell death was by apoptosis in all concentrations when compared with negative control. A discrete percentage of cells died by necrosis. Nevertheless, the relation between concentration and cell death by apoptosis in concentrations de 0.25μg/mL to 20.0 μg/mL. To evaluate early and late apoptosis (Figure 6-D), it is possible to observe a clear concentration response predominantly by late apoptosis in the concentrations 0.25 μg/mL (37.5%±9.7); 0.74 μg/mL (78.3%±0.7); 2.22 μg/mL (87.5%±0.7); 6.66 μg/mL (89.5%±1.9) e 20.0 μg/mL (77.5%±7.0).

The apoptosis and necrosis was also evaluated to C33A, using Hoeschdt/Propidium Iodide method (Figura 7) in different concentration and times (24 and 48 hours).

The treatment of 24 hours with nitensidine A in C33A cell line no statistical difference was observed between apoptosis and necrosis (Figure 7-A), showing a low percentage of cell death. The also results was observed when early and late apoptosis were evaluated because low cell death was observed. (Figure 7-B). To 48 hours of treatment with nitensidine A in C33A cell line was observed apoptosis in the highest concentration (20.0 µg/mL), with cell

death percentage 63.4%±23.4 (Figure 7-C). To early and late apoptosis (Figure 7-D) we observe late apoptosis in the highest (20.0µg/mL), concentration in 48 hours of treatment showing percentage of cell death of 57.7±20.6 %

#### Discussion

In the present study the cell lines SiHa (HPV16) and C33A (non-infected) treated with nitensidine A, isolated from Pterogyne nitens, a Brazilian plant of Cerrado Biome, they have shown cytotoxicity concentration-response. However, no significant difference was observed between cytotoxicity of both cell lines. Corroborating with our findings, recent study with Lopinavir, a antiretrovirus inhibitor of proteases, demonstrated that the cytotoxicity was not selective to HPV immortalized cells when compared with C33A [26].

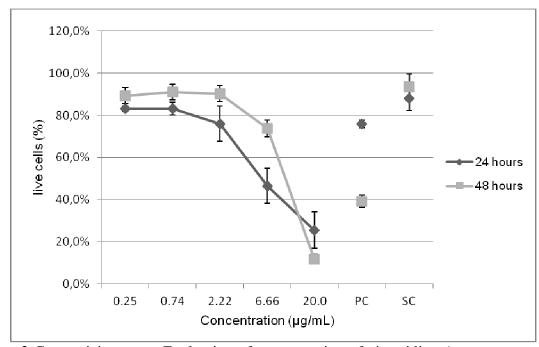
The alkaloids, as nitensidine A, are compounds, which is responsable to inhibition of celular division possessing in this way a good potential to antitumoral activity [27]. In fact natural products has been considered prototypes of antitumor drugs. MTT cytotoxicity studies in several cell lines treated with ethanolic extracts from seeds of M. Urundeuva, demonstrated inhibition of cell proliferation [28]. Aqueous extract from Brucea javanica presented higher cytotoxicity in SiHa cell lines when compared with normal cells, demonstrating that the high levels of p53 contributed to apoptosis cell death [29].

In the present study to evaluate the apoptosis cell death both cell lines (SiHa and C33A), no difference was observed between both cell lines, demonstrating early apoptosis cell death in both treatment times (24 and 48 hours). However in the high concentration of nitensidine A (20 µg/ml) was observed apoptosis/necrosis cell death only in SiHa cell line. Recent studies conducted by our group demonstrated apoptosis cell death in epithelial carcinoma cell lines (ZR 7531) treated with other alkaloids (Pterogynine and Pterogynidine)

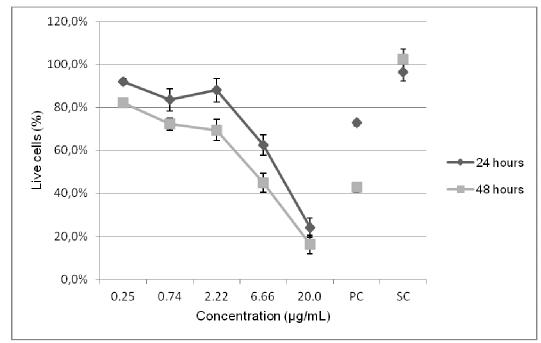
isolated from the same plant Pterogyne nitens, demonstrating that alkaloids extracted from this plant could be a good antitumor prototype [20]. Recent study with compounds isolated from leaves of Withaferin somnifera kill CasKi cells (HPV16) by early apoptosis in 24 hours of treatment and late apoptosis in 48 hours in the Anexin V assay. In the same study cell proliferation was inhibited in four different cell lines immortalized or not by HPV (CasKi, HeLa, SiHa e C33A), however MUNAGALA et al.(2011) demonstrated a low expression of E6 oncoprotein in cell lines HPV positive and high levels of p53 e p21cip1/waf1, suggesting that Withaferin somnifera repressed E6 oncoprotein levels and modulate positively p53 and p21 cip1/waf1 culminating n apoptosis of HPV cel lines [31]. Unfortunately, n anexin V we did not differences of apoptosis n SiHa and C33A except in the high concentration.

In the present study using Hoechst-Propidum Iodide method our findings demonstrated, in SiHa cells treated by 24 hours, early apoptosis in low concentrations and late apoptosis in highest concentration (20 µg/mL), with 80 % of cells death. In contrast, no apoptosis was observed in C33A. In 48 hours of treatment it was observed late apoptosis in all concentrations in SiHa cells whereas in C33A approximately 60% of cell died by late apoptosis in the highest concentration. Thus, the results with Hoechst-Propidum Iodide method suggested selectivity cell death to SiHa cells (HPV-16). Recent study the cells lines (HeLa, SiHa e C33A) have shown that apoptosis cell death was low in C33A when compared with cell lines infected with HPV: HeLa (HPV18) and SiHa (HPV16). That same selectivity was observed in a recent study [32], which treated the cell lines with extract from raspberry and observed the same deathly profile using Hoechst-Propidum Iodide assay. The authors suggested that different cell lines have properly genetic variability. ZHANG, 2011 demonstrated that HeLa and SiHa possessed p53 wild type whereas C33A express the mutant p53 and that difference could explain apoptosis death in HPV infected cell lines e non infected (C33A).

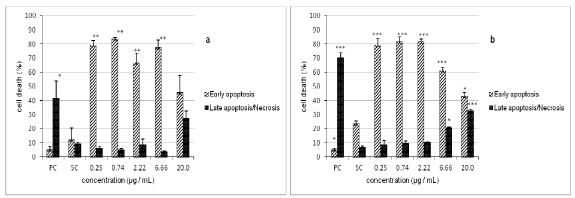
Figure 1 Molecular structure of synthetic nitensidine A methanesulphonate



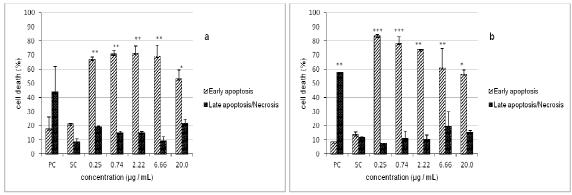
**Figure 2** Cytotoxicity assay. Evaluation of concentration of nitensidine A versus percentage of SiHa living cell lines in different times of treatment. The results are expressed of media of three independent experiments and standard error (M±SE). PC: positive control (doxorubicin 15 μg/mL); SC: solvent control (DMSO 1 %).



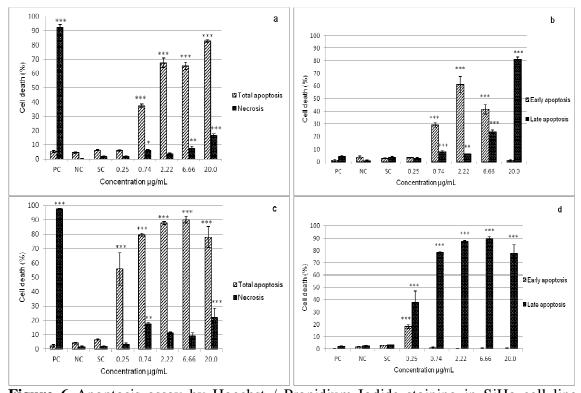
**Figure 3** Cytotoxicity assay. Evaluation of concentration of nitensidine A versus percentage of C33A living cell lines in different times of treatment. The results are expressed of media of three independent experiments and standard error (M±SE). PC: positive control (doxorubicin 15 μg/mL); SC: solvent control (DMSO 1 %).



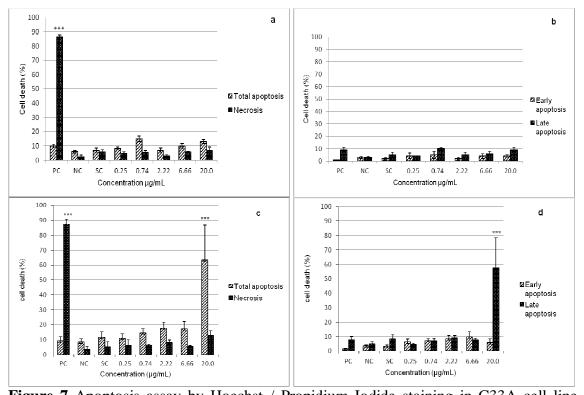
**Figure 4** Anexin V assay in flow cytometry in cell line SiHa after treatment with nitensidine A for (A) 24 hours and (B) 48 hours. Comparison between late apoptosis/necrosis and early apoptosis. The results are expressed as mean of three independent experiments and standard error (M±SE). The statistical analysis was one-way ANOVA with Tukey post-test (treated vs SC). PC: positive control (doxorubicin 50  $\mu$ g/mL); SC: solvent control; (DMSO 1 %); \* p< 0.05; \*\* p< 0.01 \*\*\* p< 0.001.



**Figure 5** Anexin V assay in flow cytometry in cell line C33A after treatment with nitensidine A for (A) 24 hours and (B) 48 hours. Comparison between late apoptosis/necrosis and early apoptosis. The results are expressed as mean of three independent experiments and standard error (M±SE). The statistical analysis was one-way ANOVA with Tukey post-test (treated vs SC). PC: positive control (doxorubicin 50  $\mu$ g/mL); SC: solvent control; (DMSO 1 %); \* p< 0.05; \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001.



**Figure 6** Apoptosis assay by Hoechst / Propidium Iodide staining in SiHa cell line. The results are expressed as mean of three independent experiments  $\pm$  standard error (M $\pm$ SE), evaluated by one-way ANOVA with Tukey post-test (treated vs NC). A) Comparison between total apoptosis and necrosis, cell line treated with nitensidina A for 24 hours; B) Comparison between early and late apoptosis, cell line treated with nitensidine A for 24 hours; C) Cell line treated with nitensidine A for 48 hours, comparison between total apoptosis and necrosis; D) Cell line treated with nitensidine A for 48 hours, comparison between early and late apoptosis. PC: doxorubicin (50  $\mu$ g/mL); NC: cells not treated; SC: solvent control (DMSO 1 %); \* p< 0.05; \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001.



**Figure 7** Apoptosis assay by Hoechst / Propidium Iodide staining in C33A cell line. The results are expressed as mean of three independent experiments  $\pm$  standard error (M $\pm$ SE), evaluated by one-way ANOVA with Tukey post-test (treated vs NC). A) Comparison between total apoptosis and necrosis, cell line treated with nitensidina A for 24 hours; B) Comparison between early and late apoptosis, cell line treated with nitensidine A for 24 hours; C) Cell line treated with nitensidine A for 48 hours, comparison between total apoptosis and necrosis; D) Cell line treated with nitensidine A for 48 hours, comparison between early and late apoptosis. PC: doxorubicin (50  $\mu$ g/mL); NC: cells not treated; SC: solvent control (DMSO 1 %); \* p< 0.05; \*\* p< 0.01; \*\*\* p< 0.001.

## **Conclusions**

Cell lines of cervical casrcinoma immortalized with HPV16 (SiHa) and non-immortalized (C33A) treated with guanidinic alkaloid (nitensidine A), isolated from *Pterogyne nitens*, carried out concentration-response cytotoxicity. in both cell lines (SiHa and C33A) and treatment to 24 and 48 hours. To Hoechst / Propidium Iodide assay apoptosis (early or late) was observed in SiHa cell line in 24 hours of treatment and only in higher concnetration it could observe late apoptosis in C33A in 48 hours of treatment. We can conclude that SiHa and C33A presented apoptosis profile in annexin V, but in Hoechst/Propidium Iodide apoptosis was mainly observe in SiHa cell lines, indicating a relative selectivity of apoptosis in cell immortalized by HPV16

## Acknowledgments

The present study was supported by Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP), Brazil, as part of the Biodiversity Virtual Institute Program (Biota-FAPESP; www.biotasp.org.br and Bioprospecta Program; www.bioprospecta.org.br). Our acknowledgement to CAPES which funded the scholarship of Juliana Maria Sorbo Bozeto.

## References

- [1] Myers E, Huh WK, Wright JD, Smith JS. The current and future role of screening in the era of HPV vaccination. Gynecol Oncol. 2008; 109: S31–S39.
- [2] INCA (2011) Instituto Nacional do Câncer. http://www.inca.gov.br/estimativa. Acesso em: 10/01/2011.Estimativas e incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro.
- [3] Macias PC, Schlecht NF, Souza PSA. Major Histocompatibility Complex Class II Polymorphisms and Risk of Cervical Cancer and Human Papillomavirus Infection in Brazilian Women. Cancer Epidemiol Biomark & Prev. 2000; 9: 1183-1191.
- [4] Lin P, Koutsky LA, Critchlow CW. Hla Class II DR-DQ and Increased Risk of Cervical Cancer among Senegalese Women. Cancer Epidemiol Biomark & Prev. 2001; 10: 1037-1045.
- [5] Bosch XF, Sanjosé S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; 31: 3-13.
- [6] Stanley M. Genital human papillomavirus infections-current and prospective therapies. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; 31: 117-124.
- [7] Zur Haussen H. Papillomviruses in the causation of human cancers a brief historical account. Virol. 2009; 384: 260-265.

- [8] D'andrilli G, Bovicelli A, Giordano A. HPV Vaccines: Stages of the Art. J Cel Physiology. 2010; 224: 601-604.
- [9] Psyrri A, Dimaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nat Clin Pract Oncol. 2008; 1: 24-31.
- [10] Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. Oral Dis. 2005; 11: 350–359.
- [11] Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. Biochem. 2005; 70: 231-239.
- [12] Foster I. Cancer: A cell cycle defect. Radiogr. 2008; 14: 144-149.
- [13] Mester J, Redeuilh G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. Anticancer Agents Med Chem. 2008; 8: 872-885.
- [14] Bayly AC, Roberts RA, Dive C. Mechanisms of apoptosis. In: Bittar EE. Adv mol cell biol. Greenwich, CT: JAI Press. 1997; 20: 183-229.
- [15] Cotran RS, Vinay Kumar MV, Collins T. Patología celular I: lesão e morte da célula. In: Cotran RS et al. Patologia estrutural da célula e functional. 2000 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-26.

- [16] Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. Curr. Opin. Cell. Biol. 2003; 15: 691–699.
- [17] Vieira-Júnior GM, Gonçalves TO, Regasini LO, Ferreira PMP, Pessoa CO, Lotufo LVC, Torres RB, Boralle N, Bolzani VS, Cavalheiro AJ. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*. J Nat Prod. 2009; 72: 1847–1859.
- [18] Regasini LO, Lopes AA, Silva DHS, Furlan M, Young MCM, Maria DA, Barreiro EJ, Bolzani VS. Antiproliferative effect of *Pterogyne nitens* on melanoma cells. J Basic and Appl Pharm Sci. 2007; 28 (3): 335–340.
- [19] Regasini LO, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Barreiro EJ, Ferreira PMP, Pessoa C, Lotufo LVC, MoraesMO, Young MCM, Bolzani VS. Cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. J Nat Prod. 2009; 72: 473–476.
- [20] Duarte RA, Mello ER, Araki C, Bolzani VS, Silva DHS, Regasini LO, Silva TG, Morais MCC, Ximenes VF, Soares CP. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. Tumor Biol. 2010; 31: 513–522.
- [21] Lopes FCM, Rocha A, Pirraco A, Regasini LO, Silva DHS, Bolzani VS, Azevedo I, Carlos IZ, Soares R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloids isolated from *Alchornea glandulosa*. BMC Complement Altern Med. 2010; 9:15.
- [22] Bolzani VS, Gunatilaka AA, Kingston DGI.; J Nat Prod. 1995; 11:1683-1688.

- [23] Regasini LO, Pivatto M, Scorzoni L, Benaducci T, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS, Barreiro EJ, Silva DHS, Bolzani VS. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. Braz J Pharmacogn. 2010; 20: 706–711.
- [24] Zhang Y, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Evadiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. Acta Pharm. 2004; 25: 83-89.
- [25] Hashimoto Y, Shimada Y, Itami A et al. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. Eur J Cancer (Oxford, England: 1990). 2003; 39: 2239-2246.
- [26] Zehbe I, Richard C, Lee KF, Campbell M, Hampson L, Hampson IN. Lopinavir shows greater specificity than zinc finger ejecting compounds as a potential treatment for human papillomavirus-related lesions. Antivir Res.2011; 91: 161–166
- [27] Li J, Li Q, Feng T, Li K. Aqueous extract of Solanum nigrum inhibit growth of cervical carcinoma (U14) via modulating immune response of tumor bearing mice and inducing apoptosis of tumor cells. Fitoter. 2008; 79: 548–556
- [28] Ferreira PMP, Farias DF, Viana MP, Souza TM, Vasconcelos IM, Soares BM, Pessoa C, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, and Carvalho AFU. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. Annals Braz Acad Sci. 2011; 83(3): 1045-1058.

- [29] Gao H, Lamusta J, Zhang WF, Salmonsen R, Liu Y, O'Connell E, Evans JE, Burstein S, and Chen JJ. Tumor Cell Selective Cytotoxicity and Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from Brucea javanica. North Am J Medic Sci. 2011; 4(2): 62–66.
- [31] Munagala R, Kausar H, Munjal C and Gupta RC. Withaferin A induces p53-dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and up-regulation of tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. Carcinog Adv. 2011
- [32] Zhang Z, Knobloch TJ, Seamon LG, Stoner GD, Cohn DE, Paskett ED, Fowler JM, Weghorst CM. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells. Gynecol Onc. 2011;974170:6.