



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira

Estudo da ação de derivados semi-sintéticos de curcumina em linhagens
celulares de câncer humano

São José do Rio Preto
2016

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira

Estudo da ação de derivados semi-sintéticos de curcumina em linhagens
celulares de câncer humano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
Co-orientadora: Dr^a Marília de Freitas Calmon
Co-orientador: Prof^o Dr^o Luis Octavio Regasini

São José do Rio Preto
2016

Oliveira, Ana Beatriz Bortolozo de.

Estudo da ação de derivados semi-sintéticos de curcumina em linhagens celulares de câncer humano / Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2016

56 f. : gráfs., tabs.

Orientador: Paula Rahal

Coorientador: Marília de Freitas Calmon

Coorientador: Luis Octavio Regasini

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Câncer – Aspectos genéticos. 3. Vírus do papiloma. 4. Linhagens celulares. 5. Agentes antineoplásicos. 6. Curcumina. I. Rahal, Paula. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-006.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira

Estudo da ação de derivados semi-sintéticos de curcumina em linhagens
celulares de câncer humano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Ana Paula Girol
FIPA – Catanduva

Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
01 de março de 2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedico este trabalho aos meus grandes amores, meus pais Selma e Mario, por serem os maiores responsáveis por todas as minhas conquistas, me apoiarem, serem minha fonte inesgotável de estímulo, acreditarem em mim e, acima de tudo, me dedicarem tanto carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar o meu caminho e ser a minha base nos momentos incertos, mantendo-me firme e me proporcionando tantas experiências importantes para a minha formação.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Paula Rahal, agradeço pelas oportunidades, pelos ensinamentos, por confiar em mim, por todo o apoio desde o meu estágio básico no laboratório e pelas tantas vezes em que, pacientemente, me recebeu em sua sala. Serei sempre grata por todo o aprendizado que me proporcionou.

À minha co-orientadora, Dr^a Marília de Freitas Calmon, agradeço pela paciência, pelo conhecimento que compartilhou comigo desde a minha iniciação científica e por toda a ajuda durante todo o delineamento e a execução desse trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof^o Dr^o Luis Octavio Regasini, agradeço pela colaboração e auxílio prestado durante o desenvolvimento do projeto. Obrigada por ceder tão gentilmente os compostos e nos receber em sua sala para discussão dos experimentos.

Aos alunos do Laboratório de Química Verde e Medicinal, Carlos, Guilherme e Yuri, agradeço por sintetizarem os compostos utilizados nesse trabalho e estarem sempre disponíveis para o que fosse necessário.

À Bruna e Renata, agradeço por terem disponibilizado tanto do seu tempo para me auxiliar e pela inestimável ajuda na execução dos experimentos em diferentes fases do trabalho. Agradeço também à Mari pelas diversas vezes em que gentilmente discutiu comigo os resultados do meu projeto. Obrigada por terem se envolvido com o meu trabalho e por me auxiliarem nos momentos que precisei. Com toda certeza o apoio que encontrei em vocês foi muito importante para que eu finalizasse cada etapa.

Aos meus queridos companheiros de sala, Ana Cláudia, André, Bruna, Guilherme, Jacqueline, Mariana, Marina, Mônica, Natalia, Renata e Rodolfo, agradeço imensamente por terem, cada um de uma forma, me ajudado em algum momento. Agradeço especialmente pelas conversas e pelas tantas risadas que deixaram meus dias mais alegres e muito mais divertidos.

Aos demais companheiros do Laboratório de Estudos Genômicos, que foram tantos entre idas e vindas, agradeço pelos cinco anos de convívio e por fazerem parte do meu amadurecimento.

À Priscila Paschetto Mendonça e Marina Curado Valsechi, minhas co-orientadoras de estágio básico no Laboratório de Biologia Celular e no Laboratório de Estudos Genômicos, respectivamente, agradeço pelos valiosos ensinamentos na fase inicial da minha trajetória na pesquisa, pelos conselhos e por terem sido também grandes companheiras nos momentos de distração.

Ao IBILCE/UNESP, minha segunda casa, agradeço por todas as experiências vividas e por ter sido o cenário da caminhada que me proporcionou a realização de tantas conquistas. Agradeço também por ter me dado a oportunidade de conhecer pessoas incríveis e a construção de muitas lembranças queridas. Assim, gostaria de expressar todo o carinho que dedico à essa Instituição.

Ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas, aproveito o momento para registrar minha gratidão por todos os ensinamentos e por ser responsável não só pela minha formação profissional, mas também por grande parte do meu crescimento pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, agradeço por toda a dedicação dos docentes participantes e por estes nos estimularem ao comprometimento com a pesquisa e com os nossos objetivos.

Aos membros das bancas examinadoras de qualificação e defesa, Profa. Dra. Rejane Maira Góes, Dra. Carolina Colombelli Pacca, Profa. Dra. Ana Paula Girol e Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe, agradeço pela atenção e disponibilidade para contribuírem com nosso trabalho.

À FAPESP (Processo 2014/04395-2) e à CAPES agradeço pelo suporte financeiro concedido, o qual possibilitou a realização desse trabalho.

Às minhas grandes amigas Ana Flávia, Ayla e Lara, agradeço por serem o maior presente que a graduação me deu. Não há como descrever todo o companheirismo, carinho e confiança que compartilhamos durante todos esses anos. Obrigada por tudo que significam para mim e por se fazerem presentes mesmo quando a correria em que vivemos atrapalha nossos encontros. Agradeço imensamente pelo privilégio que é ter a amizade de vocês!

À Nat, amiga querida que também conheci na faculdade, agradeço por ter sido a primeira melhor companheira de laboratório que tive e por toda a diversão que nossa convivência e amizade nos trouxe.

Aos meus amigos Gui e Also, agradeço por todos os momentos de descontração, por compartilharem da minha forma alegre de levar a vida e por sempre me renderem muitas risadas. Obrigada pela amizade que construímos e por compreenderem a minha ausência em diversos momentos.

À Tati, minha fiel companheira, amiga e irmã de coração, agradeço por estar ao meu lado há onze anos me apoiando e se interessando por tudo que faz parte da minha vida. Obrigada também por me deixar fazer parte da sua e por me ensinar tanto, além, é claro, de toda a diversão e incontáveis boas lembranças que nossa amizade me proporciona. Como é bom ter você!

À minha família que tanto amo, obrigada por tantos momentos maravilhosos, por torcerem por mim, por ficarem felizes com as minhas conquistas e por, acima de tudo, estarmos sempre unidos. Em especial, agradeço aos meus avós maternos Marly e Walter e aos meus avós paternos Anésia e Mário por toda atenção, carinho e amor que me dedicam em cada pequeno detalhe.

Ao meu namorado Talis, agradeço por estar sempre se preocupando comigo, me apoiando diariamente e se empenhando em me ajudar nos momentos difíceis. Obrigada por toda a compreensão, paciência, amizade, carinho, amor e cuidado que dedica a mim. Com você tudo fica mais leve e meus dias muito mais divertidos. Agradeço por ser meu maior companheiro e por significar tanto para mim. Amo você!

Aos meus amados pais, Selma e Mario, o meu eterno agradecimento por me amarem incondicionalmente, serem meus maiores incentivadores e me darem toda a estrutura e apoio para que eu realizasse cada conquista. Agradeço por tudo que me ensinaram, por me mostrarem que eu tenho muito mais a agradecer do que a pedir, por todos os conselhos, por serem o meu porto seguro, por me corrigirem, por me darem o melhor de si e por garantirem que a minha vida seja regada de carinho e repleta de amor. Obrigada por fazerem de tudo e mais um pouco para me verem feliz, embora a benção de ter vocês já seja a minha maior alegria. Amo muito vocês.

*"Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã.
Portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e
principalmente viver".*

Dalai Lama.

RESUMO

Os Papilomavírus humanos (HPVs) são vírus de DNA divididos em dois grupos. O de baixo risco, associado a lesões benignas, e o de alto risco, associado a diversos tipos de câncer. As oncoproteínas E6 e E7 são as principais proteínas envolvidas no processo de carcinogênese decorrente da infecção por esses vírus, de forma que compostos naturais têm sido utilizados na busca por drogas que inibam a expressão viral. Paralelamente, devido aos diversos efeitos colaterais e alto índice de reincidência dos tratamentos tradicionais contra o câncer, a procura por agentes antitumorais é intensa. Nesse contexto, diversas pesquisas estão sendo realizadas afim de explorar as inúmeras propriedades da curcumina, uma substância que apresenta atividade antiinflamatória, imuno-modulatória, antioxidante, anti-angiogênica, quimioprotetora, antiproliferativa, antitumoral e antimicrobiana. Assim, uma estratégia promissora utilizada é a busca por análogos de curcumina que consigam aumentar a eficácia terapêutica desse fitoterápico. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é analisar *in vitro* a ação de diferentes derivados semi-sintéticos de curcumina (AC1, AC2, AC7, AC10 E AC13) sobre a expressão dos oncogenes virais E6 e E7 em linhagem de carcinoma cervical HPV-16 positiva (CasKi) e a atividade antitumoral do composto AC13 em diferentes linhagens tumorais (CasKi, HeLa, MDA-MB- 231, MCF-7 e 786-O). Para isso, após a incubação com os compostos em diferentes concentrações, a viabilidade das células foi analisada por ensaio MTT e uma linhagem imortal transformada de queratinócito humano (HaCaT) foi utilizada como controle para análise da citotoxicidade. Posteriormente, a avaliação da expressão do RNAm de E6 e E7 foi realizada por *PCR em tempo real*, a determinação da expressão da proteína p53 por Western Blotting e a detecção da atividade das caspases 3 e 7 foi analisada por meio de ensaio luminescente de apoptose. Embora nenhum composto tenha inibido a expressão de E6 e E7 na linhagem CasKi, as análises de citotoxicidade do composto AC13 sugerem que ele apresente vantagens em relação à curcumina nessa linhagem celular, pois foi menos citotóxico do que a curcumina para as células não tumorais (HaCaT) e causou queda de viabilidade um pouco maior para a linhagem CasKi do que para a HaCaT nas concentrações de 50, 75 e 100 μ M. Além disso, o AC13 induz aumento da atividade das caspases, o que indica que as células são levadas a morte por apoptose. Dessa forma, os dados obtidos sugerem que o derivado de curcumina AC13 apresenta interessante atividade antitumoral nas células CasKi

Palavras-chave: HPV, câncer, curcumina, derivado semi-sintético, antitumoral

ABSTRACT

High risk Human Papillomavirus (HPVs) are DNA virus divided in two groups. Low risk, associated with benign lesions, and high risk, associated with several types of cancer. Oncoproteins HPV E6 and E7 are the main proteins involved in the carcinogenesis process due to infection by this virus, so that natural compounds have been used in the search for drugs that inhibit viral expression. At the same time, due to various side effects and high relapse rate of traditional cancer treatments, the search for antitumor agents is intense. In this context, several studies are being conducted in order to explore the numerous properties of curcumin, a substance that has anti-inflammatory, immune-modulatory, anti-oxidant, anti-angiogenic, chemoprotective, anti-proliferative, anti-tumor and anti-microbial properties. Thus, a promising strategy used is the search for curcumin analogues which are able to increase the therapeutic efficacy of phytotherapy. Thus, the aim of this study is to analyze the action of different semi-synthetic derivatives of curcumin (AC1, AC2, AC7, AC10 and AC13) on the E6 and E7 viral oncogenes expression in positive HPV-16 cervical carcinoma cell line (CasKi) and the antitumor activity of AC13 compound in different tumor cell lines (CasKi, HeLa, MDA 231, MCF-7 and 786-O). For this, after incubation with the compounds at different concentrations, cell viability was analyzed by MTT assay and a spontaneously transformed immortal keratinocyte cell line (HaCaT) was used as a control to analyze the cytotoxicity. Subsequently, E6 and E7 mRNA expression evaluation was performed by real-time PCR, p53 protein expression determination was analyzed by Western Blotting, and detecting the caspases 3 and 7 activity was analyzed using the luminescent assay of apoptosis. Although no compound has inhibited E6 and E7 expression in the CasKi cell line, AC13 cytotoxicity analyzes suggest that it has advantages in relation to curcumin in this cell line, because it was more cytotoxic than curcumin to non-tumoral cells (HaCaT) and caused viability decrease less pronounced for CasKi line than for HaCaT at 50, 75 e 100 μ M. Furthermore, AC13 induces increased caspases activity, suggesting cell death by apoptosis. Thus, our data suggest that AC13 derivative of curcumin presents interesting antitumor activity in CasKi cells.

Keywords: HPV, cancer, curcumin, semi-synthetic derivatives, antitumoral

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL: microlitro

μM: micromolar

cDNA: DNA complementar, do inglês complementary DNA

CUR: curcumina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico, do inglês Deoxyribonucleic Acid

dNTP: Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados

DOXO: doxorrubicina

FBS: soro fetal bovino, do inglês fetal bovine serum

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HPV: Papilomavírus humano, do inglês Human Papillomavirus

nm: nanômetro

PCR: Reação em cadeia da polymerase, do inglês polymerase chain reaction

pRBB: proteína do retinoblastoma, do inglês retinoblastoma protein

Primer: Cadeia de ácidos nucleicos iniciadora da replicação

PVDF: do inglês polyvinylidene difluoride

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RPM: rotações por minuto

SDS: Dodecilsulfato de sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulphate

UL: unidade relativa de luz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer.....	15
1.2 HPV e câncer	16
1.3 Curcumina e derivados semi-sintéticos	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Síntese dos derivados semi-sintéticos de curcumina	22
3.2 Linhagens celulares (CasKi, HeLa, MDA 231, MCF-7, 786-O e HaCaT).....	22
3.3 Análise da citotoxicidade (Ensaio MTT)	23
3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA	24
3.5 Análise da expressão de RNAm dos oncogenes virais E6 e E7 de HPV 16 por PCR em tempo real	24
3.6 Avaliação da expressão da proteínas p53 por Western Blotting	26
3.7 Detecção da atividade enzimática da caspase 3/7 por meio de ensaio de apoptose	27
3.8 Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Análise da citotoxicidade (Ensaio MTT) em linhagem CasKi com o primeiro lote de curcuminóides sintetizados.....	29
4.2 MTT do AC13 em linhagens celulares derivadas de carcinomas	32
4.3 Análise da expressão do oncogenes virais E6 e E7 por PCR em tempo real (qPCR)	37
4.4 Avaliação da expressão da proteína p53 por Western Blotting.....	38
4.5 Detecção da atividade enzimática da caspase 3/7 por meio de ensaio de apoptose	39
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença que se inicia com o surgimento de eventos que conferem a uma célula a condição de malignidade que permite que ela se prolifere mais rapidamente, originando uma população de células que vão acumulando alterações que as tornam fenotipicamente diferentes do tecido normal (CURRY et al., 2015; NOWELL, 1976). Assim, o câncer origina-se por meio da transformação de uma única célula normal em tumoral e esse processo é resultado de uma interação entre causas genéticas, epigenéticas e ambientais. Dentre as causas ambientais estão os raios ultravioletas, a exposição a produtos químicos cancerígenos como o tabaco e o contato com agentes biológicos como os vírus. Além disso, o próprio envelhecimento configura um fator de risco (WHO, 2015). Dessa forma, a carcinogênese é um processo que envolve o acúmulo de anormalidades genéticas e epigenéticas que levam à disfunção celular, resultando na proliferação descontrolada e organização atípica das células (COOPER, 2000).

É estimado que o número de casos anuais de câncer aumente de 14 milhões em 2012 para 22 milhões nas próximas duas décadas e, dentre as mortes causadas pelo câncer, os tipos tumorais mais comumente envolvidos são o de pulmão, fígado e estômago (WCR, 2014). O câncer de mama é o tipo tumoral que mais acomete mulheres em todo o mundo, sendo também a maior causa de morte feminina por câncer. Ainda entre as mulheres o câncer de colo de útero é o quarto tipo mais comum, sendo sua incidência maior em países em desenvolvimento e a infecção pelo HPV o principal fator de risco para o surgimento dessa neoplasia (INCA, 2014).

Assim, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e, portanto, pesquisas que visem prevenção, detecção precoce e tratamentos eficazes para essa doença são de extrema importância (VISVADER, 2011). Os tratamentos tradicionais para o câncer disponíveis atualmente, além da cirurgia, são a quimioterapia e a radioterapia. Embora a quimioterapia, quando comparada com a radioterapia, apresente a vantagem de danificar menos os órgãos (ROBOVA, 2008), ambos procedimentos desencadeiam diversos efeitos colaterais, incluindo neutropenia, leucopenia, náuseas, vômitos, alopecia, diarreia e complicações intestinais e urinárias (LI, 2013). Além disso, cerca de 30% dos pacientes com câncer renal submetidos à nefrectomia desenvolvem metástase após o tratamento e apresentam tempo médio de sobrevivência de um ano (GIRGIS et al., 2012).

Dessa forma, considerando a situação de dor e estresse fisiológico e a forte vulnerabilidade emocional pela qual o paciente é exposto durante o tratamento (BROWN, RAMIREZ, FARQUHAR-SMITH, 2014), a fim de superar as desvantagens dos tratamentos convencionais para o câncer, a pesquisa por tratamentos utilizando fitoterápicos tem ganhado intensa atenção e, nesse contexto, compostos naturais estão sendo amplamente estudados contra diversos tipos tumorais por apresentarem diferentes propriedades terapêuticas (YALLAPU, JAGGI, CHAUHAN, 2013). Nesse contexto, a atividade antiproliferativa e proapoptótica já foi relatada em diferentes estudos utilizando, por exemplo, a berberina (LI et al., 2015; BARZEGAR et al., 2015). Também já foi observada a indução de autofagia em células tumorais por meio do uso de compostos polifenólicos naturais (HASIMA, OZPOLAT, 2014). Ainda, foi identificada atividade antiangiogênica e antimetastática no uso de flavonoides (WANG et al., 2014). Portanto, é de grande interesse explorar o potencial terapêutico dos compostos naturais para o tratamento do câncer (SULTANA et al., 2014).

1.2 HPV e câncer

Os Papilomavírus humanos (HPVs) pertencem à família de vírus de DNA *Papillomaviridae* e começaram a ser isolados e clonados na década de 1980 com auxílio de técnicas moleculares. Hoje são conhecidos mais de 180 tipos numerados sequencialmente (NEVES et al., 2002; zur HAUSEN, 2002; BERNARD et al., 2010), sendo a sua diversidade um aspecto importante para a epidemiologia, uma vez que as variantes diferem em sua história natural e patogenicidade, influenciando nos aspectos clínicos resultantes da infecção (BERNARD, CALLEJA-MACIAS, DUNN, 2006; MAMMAS, SPANDIDOS, SOURVINOS, 2014).

Os HPVs medem aproximadamente 55 nm de diâmetro, são vírus não envelopados e apresentam um genoma de aproximadamente 8000 pares de bases. Possuem oito genes organizados em um DNA dupla fita circular envolto por um capsídeo proteico icosaédrico (SCHWARTZ, 2008; ZANDBERG et al., 2013). Os HPVs são divididos em dois grupos de acordo com seu potencial oncogênico: os de baixo risco, cujos principais genótipos são o 6 e 11, e os de alto risco, representados principalmente pelos tipos 16 e 18. Infecções por genótipos de baixo risco causam lesões benignas, enquanto infecções pelos tipos de alto risco são associadas ao desenvolvimento de doenças malignas (ZUR HAUSEN, 2002; BURD, 2003; GOLDSTEIN et al., 2009).

De modo geral, é estimado que 5,2% dos casos de câncer estejam associados à infecções por HPV e isto, somado às verrugas e demais lesões intra-epiteliais desencadeadas por HPVs de baixo risco, atribui ao HPV uma relação importante com a saúde (STANLEY, 2012). Os Papilomavírus humanos têm mostrado exercer um importante papel no desenvolvimento de diversos tipos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, os quais compõem o sexto tipo de câncer mais prevalente no mundo e incluem, por exemplo, tumores malignos localizados na cavidade oral, laringe e cavidade nasal (SYRJANEN, 2005; FAKHRY et al., 2008). Estima-se que 26% dos casos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço sejam positivos para HPV, sendo que em 90% destes é encontrado o DNA do HPV 16 (ALIBEK, KAKPENOVA, BAIKEN, 2013).

Os HPVs de alto risco também representam fator de risco importante para o desenvolvimento de cânceres de vulva, vagina, pênis e ânus (DUNNE, PARK 2013). Entretanto, o tipo tumoral para o qual é considerado agente etiológico mais importante é o câncer cervical, pois a integração do seu DNA em células hospedeiras é um evento crítico no desenvolvimento desse tipo tumoral (LI et al., 2008; BADULESCU et al., 2010), de forma que mais de 96% dos casos são positivos para HPV de alto risco (KIM et al., 2010). Dentre os tipos de HPV associados ao câncer de colo de útero, os principais genótipos são o HPV 16, que é o mais prevalente, e o HPV 18, que é o segundo mais comum (LI et al., 2011). Juntos esses dois genótipos são responsáveis pela causa de mais de 70% dos carcinomas cervicais (MAMMAS, SPANDIDOS, SOURVINOS, 2014).

Nos HPVs de baixo risco as proteínas E6 e E7 desempenham, *in vitro*, baixa ou nenhuma atividade transformante (VILLA, 2006), diferentemente, nos HPVs de alto essas proteínas atuam na proliferação das células basais e parabasais do epitélio, contribuindo para o crescimento da lesão e desempenhando, assim, um importante papel transformante (DOORBAR, 2006; VILLA, 2006; DOORBAR et al., 2012).

A E6 é uma oncoproteína que tem como principal alvo o gene supressor de tumor p53 que, na presença de estresse ou dano celular, leva à parada do ciclo celular ou apoptose. A E6 liga-se à proteína E6AP, que atua como uma ubiquitina ligase, e à proteína p53 levando à ubiquitinação e consequente degradação de p53. Dessa forma, a função de p53 é inibida e a célula infectada não sofre os processos de parada de ciclo e apoptose (SCHEFFNER et al., 1990; HUIBREGTSE, SCHEFFNER, HOWLEY, 1991), permitindo proliferação celular descontrolada (NARISAWA-SAITO, KIYONO, 2007). A oncoproteína E7 leva à desregulação do ciclo celular ao interagir com a proteína supressora de tumor pRb e promovendo, assim, a liberação de proteínas da família E2F, as quais atuam como fatores de

transcrição que ativam genes necessários para que a célula entre na fase S do ciclo celular e, em condições normais, têm sua função inibida pela ligação direta com a proteína pRb (STEVAUX, DYSON, 2002; FERA et al., 2000).

O tratamento cirúrgico, embora seja delicado para cânceres de cabeça e pescoço, é uma técnica bastante empregada em pacientes com câncer cervical. No entanto, a reincidência após a cirurgia é frequente para os cânceres associados ao HPV (YUAN, FILIPPOVA, DUERKSEN-HUGHES, 2012). Drogas que inibem a expressão viral apresentam a vantagem de tratar concomitantemente a infecção e a doença por ela desencadeada (STANLEY, 2012). Na busca por um composto eficaz, têm sido realizados estudos que visam estratégias moleculares que sejam capazes de inibir a expressão do HPV, principalmente focando as oncoproteínas E6 e E7, seja essa inibição realizada de forma direta ou indireta (VICI et al., 2014). O foco a essas proteínas se dá pelo fato de que a expressão destas aumenta durante a transformação maligna das células infectadas, enquanto a expressão de E1 e E2, por exemplo, diminui durante esse processo (HEBNER, BEGLIN, LAIMINS, 2007).

1.3 Curcumina e derivados semi-sintéticos

A curcumina é uma substância presente em quantidades elevadas no rizoma da planta neotropical *Curcuma longa* de onde é extraída (SHISHODIA, SETHI, AGGARWAL, 2005), o qual é utilizado há milênios em países asiáticos como especiaria e para tratamento de infecções, inflamações, queimaduras e distúrbios digestivos. Assim, embora a curcumina tenha sido inicialmente isolada em 1870 (CHATTOPADHYAY et al., 2004), o seu uso na medicina indiana e chinesa e seu emprego na dieta são práticas tradicionais na cultura asiática (CHEN, XU, JOHNSON, 2006). A curcumina possui coloração amarela e é o curcuminóide mais abundante dentre os três principais encontrados no rizoma da *C. longa*, sendo os outros dois a desmetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina. Por ser uma substância natural oriunda de um alimento e que apresenta propriedades medicinais, a curcumina é considerada um composto nutracêutico (GUPTA et al., 2010; ZLOTOGORSKI et al., 2013).

A curcumina exibe intensa atividade anti-inflamatória, imuno-modulatória, antioxidante, anti-angiogênica, quimioprotetora, anti-proliferativa e antimicrobiana (LIN, 2007; MENON, SUDHEER, 2007; LIU et al., 2008; DULBECCO, SAVARINO, 2013). Ainda, a curcumina é termoestável e pouco sensível às variações de pH (SIMÕES,

MARIOT, 2003) e, dessa forma, a administração da curcumina pode inibir potencialmente diversas fases do processo carcinogênico, incluindo a transformação, a angiogênese e a metástase (AGGARWAL, KUMAR, BHARTI, 2003). Esse fitoterápico pode atuar em diversos níveis moleculares, interagindo diretamente com o alvo ou regulando, por exemplo, fatores de transcrição (YAN et al., 2005). Dessa forma, as propriedades farmacológicas da curcumina conferem a esse composto alto potencial terapêutico (DULBECCO, SAVARINO, 2013).

Em decorrência de suas inúmeras propriedades terapêuticas, a curcumina vem sendo intensivamente estudada contra diversos tipos de câncer, apresentando atividade promissora em diversas fases do processo de carcinogênese (SHANMUGAM et al., 2015). Koothpar e colaboradores (2015), por exemplo, observaram que em células de câncer de mama da linhagem MCF-7 a curcumina induziu queda de viabilidade de maneira dose e tempo dependente. Da mesma forma, esse composto exerceu citotoxicidade significativa em células A549 de câncer de pulmão (LIAO et al., 2015) e, em outro estudo, foi relatada atividade antiproliferativa e proapoptótica da curcumina em células de melanoma humano A375 (ZHANG et al., 2015).

Nas linhagens de carcinoma cervical HeLa, SiHa e CasKi a proliferação celular foi reduzida de modo dose dependente, sendo observado aumento na porcentagem de células mortas conforme a elevação da concentração de curcumina (DIVYA, PILLAI, 2006; MAHER et al., 2011). Ainda, a citotoxicidade da curcumina foi seletiva às linhagens HPV positivas, sendo pouco expressiva nas células HPV negativas C33A (DIVYA, PILLAI, 2006). Também foi relatada a diminuição nos níveis de RNAm de E6 após a incubação com a curcumina (DIVYA, PILLAI, 2006; MAHER et al., 2011), sendo que, nas linhagens CasKi e SiHa foi possível observar uma queda significativa de expressão de E6 com apenas 6 horas de tratamento. Esse resultado refletiu na restauração dos níveis da proteína p53 (MAHER et al., 2011).

Entretanto, embora apresente diversas características de interesse para estudos na área biomédica, principalmente contra o câncer, a farmacocinética da curcumina confere a esse composto algumas limitações, como a baixa biodisponibilidade e rápido metabolismo (PADHYE et al., 2009; PADHYE et al., 2010). Essas limitações são resultado da baixa solubilidade, rápido metabolismo de primeira passagem, baixa absorção e rápida eliminação sistêmica (ANAND et al., 2007). Embora esse fitoterápico seja lipossolúvel e, assim, capaz de atravessar livremente a membrana celular (FUJISAWA et al., 2004), a baixa

biodisponibilidade faz com que a sua concentração no sangue prejudique seus efeitos terapêuticos (ANAND et al., 2007).

Várias abordagens vêm sendo aplicadas na tentativa de driblar essas características desvantajosas, tais como modificação química e encapsulação (MA et al., 2008; GANTA, AMIJI, 2009; SHAIKH et al., 2009). Ainda, devido ao fato de que os diversos tipos celulares respondem de forma diferente a um composto, tem-se buscado compostos mais eficazes (SANDUR et al., 2009). Já foi relatado que os metabólitos da curcumina também apresentam grande potencial terapêutico (SANDUR et al., 2007) e, assim, diversos estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de inúmeros derivados e análogos de curcumina (BEEVERS, HUANG, 2011). Portanto, a busca por compostos sintéticos torna-se uma estratégia interessante para aumentar a eficácia terapêutica desse fitoterápico (PADHYE et al., 2009; PADHYE et al., 2010).

Dessa forma, considerando que o câncer é uma das maiores causas de mortalidade e que os efeitos colaterais da radioterapia e da quimioterapia são intensos, diversos estudos buscam por novas estratégias terapêuticas. Da mesma forma, os tratamentos tradicionais para as doenças malignas desencadeadas por HPV de alto risco envolvem cirurgia, quimioterapia e radioterapia. No entanto, essas técnicas resultam em fortes efeitos colaterais e frequentemente apresentam reincidência do tumor, visto que são direcionadas para as manifestações clínicas e não para a infecção em si (DUNNE, PARK, 2013). Assim, o interesse por drogas derivadas de plantas com potencial de inibir a expressão viral tem crescido. Nesse sentido, inúmeras pesquisas com diversos compostos naturais descrevem atividade anticâncer sobre diferentes processos envolvidos na carcinogênese, tais como a proliferação celular, apoptose, angiogênese e metástase (HOSSEINI, GHORBANI, 2015).

Esse é o caso da curcumina, uma substância que apresenta inúmeras propriedades terapêuticas e vem sendo alvo de muitos estudos (DULBECCO, SAVARINO, 2013). Nesse contexto, uma estratégia alternativa para melhorar a atividade farmacológica da curcumina assim como de outros fitoterápicos, é a produção de sintéticos análogos (PADHYE et al., 2010). Dentre as outras vantagens da síntese de compostos está a diminuição do custo de alguns produtos. Assim, a biologia sintética, dentre suas inúmeras aplicações, é considerada uma fonte inovadora para melhorar intervenções terapêuticas tradicionais (ROOKE, 2013) e, portanto, é promissora na busca de derivados de curcumina que superem as limitações do composto original e apresentem maior eficácia (VYAS et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista o exposto e utilizando a curcumina em todos os experimentos como controle para comparação, o objetivo deste projeto foi analisar *in vitro* a ação de diferentes derivados semi-sintéticos de curcumina sobre a expressão dos oncogenes virais E6 e E7 em linhagem celular HPV-16 positiva (CasKi) e a atividade antitumoral desses compostos em diferentes linhagens tumorais (CasKi, HeLa, MDA 231, MCF-7 e 786-O).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese dos derivados semi-sintéticos de curcumina

Os derivados semi-sintéticos de curcumina (Tabela 1) foram preparados no Laboratório de Química Verde e Medicinal, sob supervisão do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE). A síntese foi realizada a partir da curcumina comercial (Sigma-Aldrich) cuja fórmula molecular é $C_{21}H_{20}O_6$. A mesma foi utilizada como controle dos experimentos.

Tabela 1. Derivados semi-sintéticos de curcumina sintetizados e suas respectivas fórmulas moleculares.

Derivado semi – sintético de curcumina	Fórmula molecular
AC1	$C_{17}H_{14}O$
AC2	$C_{17}H_{12}F_2O$
AC7	$C_{19}H_{18}O$
AC10	$C_{19}H_{18}O_3$
AC13	$C_{17}H_{12}Br_2O$

3.2 Linhagens celulares (CasKi, HeLa, MDA 231, MCF-7, 786-O e HaCaT)

As linhagens celulares de carcinoma cervical contendo o genoma de HPV 16 (CasKi) e HPV 18 (HeLa), de câncer de mama metastático (MDA-MB-231 e MCF7), de carcinoma renal (786-O) e a linhagem não tumoral de queratinócito humano imortalizado (HaCaT) foram descongeladas e mantidas em meio de cultivo celular (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) RPMI (linhagem 786-O) ou DMEM (demais linhagens celulares) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 mg/L streptomomicina/penicilina e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

3.3 Análise da citotoxicidade (Ensaio MTT)

Para a triagem inicial de citotoxicidade dos diferentes compostos, células da linhagem de carcinoma cervical HPV 16 positiva (CasKi) foram cultivadas na quantidade de $0,75 \times 10^4$ células por poço em placas de 96 orifícios. No dia seguinte, o meio de cultura DMEM foi trocado por meio novo contendo as diferentes concentrações (10, 20, 40 e 80 μM) de curcumina e dos compostos semi-sintéticos (curcuminóides) em um volume total de 100 μL por poço. Após 24, 48 e 72 h de incubação a citotoxicidade foi avaliada por meio de ensaio MTT de viabilidade celular. As células incubadas com a curcumina (CUR) foram utilizadas para comparação dos resultados obtidos com os curcuminóides. Além disso, como controle experimental foram utilizadas células incubadas com meio de cultura livre de compostos.

Ao fim de cada tempo experimental, o volume contido em cada orifício foi substituído por 100 μL de solução de MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) previamente dissolvido em meio DMEM (SIGMA) e a placa foi incubada por 30 minutos em estufa úmida enriquecida com CO_2 a 37°C . Ao fim da incubação, toda a solução de MTT foi retirada de cada poço e substituída por 100 μL de DMSO. A placa foi agitada por 5 minutos com rotação de 100 RPM para a dissolução dos cristais de formazan e a leitura foi realizada em leitor de placas em comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas em dois eventos independentes e o limite mínimo de viabilidade celular aceito para prosseguir para a próxima etapa foi de 80%. Posteriormente, foi feito o ajuste fino. Para isso, foram avaliadas concentrações situadas entre a concentração não tóxica e a que apresentou o início de toxicidade acima do valor estabelecido, utilizando os dados obtidos na triagem inicial para estabelecer esse intervalo. Essa etapa também foi feita em triplicatas e em dois eventos independentes.

Além de avaliar a citotoxicidade na linhagem celular de carcinoma cervical (CasKi), a linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foi utilizada como controle a fim de avaliar a citotoxicidade desses compostos em células não tumorais. Essa linhagem tem sido utilizada como controle em outros estudos realizados com as linhagens de carcinoma cervical Hela, SiHa e Caski (BRAVO-CUELLAR et al., 2010; LIU et al. 2012).

Posteriormente, a viabilidade celular de outras linhagens tumorais (HeLa, MDA 231, MCF-7 e 786-O) também foi avaliada para o composto semi-sintético AC13. Nessa etapa, células dessas linhagens foram incubadas por 24 e 48 h com a curcumina e o composto AC13 nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160 μM . Por fim, foram selecionadas apenas as linhagens CasKi e HaCaT para dar continuidade ao estudo, tendo sido necessária a

realização de um novo ensaio de MTT para analisar a viabilidade celular mais detalhadamente, sendo avaliadas as concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 75; 100 e 125 μM nos tempos experimentais de 24 e 48 h. Além disso, como controle de morte celular, foi incluída a doxorubicina (DOXO) nas concentrações de 2,5; 5 e 10 μM .

Os dados de viabilidade celular foram medidos por absorvância utilizando comprimento de onda de 570 nm e obtidos a partir de quantificação em espectrofotômetro. A viabilidade celular é proporcional à formação de cristais de formazan no interior das células, os quais são formados de acordo com a atividade metabólica celular. A absorvância das amostras tratadas com curcumina e seus derivados semi-sintéticos foi normalizada com absorvância das amostras sem tratamento do seu respectivo evento. A viabilidade foi expressa em porcentagem e foram consideradas concentrações não tóxicas aquelas em que a viabilidade celular obtida foi superior a 80%.

3.4 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total, $1,5 \times 10^5$ células CasKi foram semeadas em placas de 6 orifícios e, no dia seguinte, o meio de cultivo foi substituído por meio novo contendo os diferentes compostos (CUR, AC7, AC10 E AC13) nas concentrações estabelecidas por meio do MTT no ajuste fino (10; 12,5; 15,0 e 17,5 μM , respectivamente). Após 24 h de exposição aos diferentes derivados semi-sintéticos de curcumina, as células foram coletadas e o RNA total foi extraído conforme a técnica descrita por Sambrook com modificações (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Após a quantificação, cada amostra foi submetida a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% para análise da integridade do RNA. Posteriormente, os RNAs totais foram utilizados para síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit High-Capacity cDNA Archive [®] (Applied Biosystems- USA) conforme as instruções do fabricante para ser utilizado na análise de expressão gênica por PCR em tempo real.

3.5 Análise da expressão de RNAs dos oncogenes virais E6 e E7 de HPV 16 por PCR em tempo real

Para análise da expressão gênica dos oncogenes virais E6 e E7 de HPV 16, o cDNA das amostras foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores para HPV16 E6, E7 e para

o gene endógeno *GAPDH* utilizado como normalizador (Tabela 2). Para as reações dos genes *E6* e *E7* foram utilizados 7 µL de água, 0,5 µM de primer forward, 0,5 µM de primer reverse, 10,0 µL de SYBR Green e 25,0 ng de amostra. Para o gene *GAPDH* foram utilizados 7,4 µL de água, 0,4 µM de primer forward, 0,4 µM de primer reverse, 10,0 µL de SYBR Green e 25,0 ng de amostra.

Em seguida, as reações foram submetidas ao equipamento para PCR em tempo real ABI Prism® 7300 (Applied Biosystem), sendo que a ciclagem compreendeu uma etapa inicial de 2 minutos a 50 °C para a ativação da enzima UNG, seguido de 10 minutos a 95 °C para inativação da UNG, evitando que a enzima degrade os produtos da amplificação, iniciada em seguida, e também para a ativação da enzima AmpliTaq Gold®. Posteriormente, seguiu 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60°C para extensão. O anelamento dos iniciadores ocorreu durante a rampa de descida de 95°C para 60°C. A coleta do sinal ocorreu nos 30 segundos finais da etapa de extensão. Ao final, foi acrescentado um passo de dissociação que compreende duas etapas de 15 segundos a 95°C intercaladas por uma etapa de 30 segundos a 60°C. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de dímeros de iniciadores, produtos inespecíficos e de contaminações. O experimento foi realizado em triplicatas e em dois eventos independentes.

O valor da expressão relativa dos oncogenes *E6* e *E7* após tratamento das células CasKi com curcumina e seus derivados semi-sintéticos foi medido por meio da técnica de qPCR, e determinado em relação à expressão do gene endógeno *GAPDH* usado como controle (normalizador). Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001). Esse modelo leva em consideração a eficiência de amplificação dos iniciadores no cálculo da expressão relativa, permitindo a quantificação relativa da expressão quando as eficiências de amplificação dos iniciadores são diferentes entre si. Foi considerado que houve uma redução ou aumento significativo da expressão gênica dos oncogenes selecionados quando o valor da expressão gênica foi maior que 2 ou menor que -2, quando usado a expressão de log₂.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise da expressão dos oncogenes E6 e E7 de HPV16 por meio da técnica de Real Time.

Gene	Sequência
<i>E6</i>	F: 5'- GACCCAGAAAGTTACCCACAG - 3' R: 5'- CATAAATCCCGAAAAGCAAAG - 3'
<i>E7</i>	F: 5'- ACAAGCAGAACCGGACAGAG - 3' R: 5'- TGCCCATTAACAGGTCTTCC - 3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'- ACCCACTCCTCCACCTTTGA - 3' R: 5'- CTGTTGCTGTAGCAAATTCGT - 3'

3.6 Avaliação da expressão das proteínas p53 por Western Blotting

Nessa etapa, foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ células CasKi por poço em placas de 6 orifícios para extração de proteínas e, no dia seguinte, o meio foi aspirado e meio fresco contendo os diferentes compostos (CUR, AC7, AC10 e AC13) nas concentrações selecionadas de 10 e 20 μM foi adicionado. Decorridas 24 h de incubação, as células aderentes foram coletadas em tampão de lise MCell Lysis gelado e incubadas por 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação do lisado celular a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, 50 μL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo gelado, misturado com tampão 4x NuPage LDS (Invitrogen), fervido por 10 minutos e estocado em freezer -80 °C para análise por Western Blotting para avaliação da expressão da proteína p53. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada com gel SDS poliacrilamida 12% e as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF.

Nesse experimento, devido à dificuldade no uso dos anticorpos comerciais disponíveis para E6, a análise da expressão dessa oncoproteína foi feita de forma indireta através da expressão de seu principal alvo celular, a proteína p53. Para isso foi utilizado o anticorpo p53 (Abcam) na diluição 1:500. O anticorpo para GAPDH (Life) na diluição 1:2000 foi utilizado como controle endógeno. Os anticorpos primários foram detectados por um anticorpo secundário-HRP com imunoreatividade a espécie apropriada de cada anticorpo primário seguida de incubação com Pierce ECL Western

Blotting Substrate (Thermo Scientific, SA). Para determinação do nível de expressão da proteína p53, a intensidade das bandas foi normalizada com o GAPDH. Nesse experimento foi utilizada uma amostra de células de carcinoma cervical negativas para HPV (C33) como um controle positivo, visto que nessas células a proteína p53 é expressa.

A análise da expressão da oncoproteína E6 foi realizada por meio da técnica de western blotting e obtida indiretamente utilizando anticorpos para seu principal alvo celular, a proteína p53. A visualização das bandas proteicas foi realizada no equipamento Molecular Imager Chemi- Doc MP System (BioRad) e, para normalização dos dados, foi utilizado anticorpo para o controle endógeno GAPDH.

3.7 Detecção da atividade enzimática da caspase 3/7 por meio de ensaio de apoptose

Afim de avaliar se o composto AC13 atua sobre a atividade enzimática da caspase 3/7 em células CasKi e HaCaT, foi realizado o ensaio de apoptose utilizando o kit Caspase-Glo 3/7 (Promega). Para isso, foram plaqueadas $0,75 \times 10^4$ células por poço em placas de 96 orifícios de fundo branco. O experimento incluiu células submetidas à incubação com o tratamento (AC13 ou CUR), controle negativo (células incubadas com meio de cultura sem tratamento) e um branco da reação (meio de cultura sem tratamento na ausência de células). Para a execução dessa etapa foi selecionado o tempo experimental de 24 h e a concentração de 50 μ M, visto que foi a que apresentou resultados que atendiam melhor as condições para a utilização do kit.

Dessa forma, decorrido o tempo de incubação, foram adicionados 100 μ L do Reagente Caspase-Glo (Promega) em cada poço e a placa foi submetida à agitação por 30 segundos a 4000 RPM. Em seguida, a placa foi incubada durante 1 h em temperatura ambiente e, posteriormente, seguiu para a leitura luminescente cujo sinal é emitido proporcionalmente à atividade da caspase 3/7 da amostra. O Reagente Caspase-Glo 3/7, além de promover a lise celular, contém um substrato luminescente que inclui a sequência tetrapeptídica DEVD que é reconhecida pelas caspases 3 e 7. Nas células em que as caspases estão ativas ocorre a clivagem do substrato e a consequente liberação da aminoluciferina que é, então, consumida pela luciferase produzindo um sinal luminescente.

A atividade enzimática da caspase 3/7 foi determinada a partir da normalização dos valores obtidos para as amostras de células tratadas em relação às amostras controles (células

incubadas com meio de cultura livre de tratamento), sendo o percentual de atividade da caspase calculado da seguinte maneira: $UL \text{ amostra} / UL \text{ controle} \times 100\%$.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA), utilizando Análise de Variância (Two-way ANOVA) seguida de Teste de Bonferroni, sendo que as diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da citotoxicidade (Ensaio MTT) em linhagem CasKi com o primeiro lote de curcuminóides sintetizados.

Para avaliar a viabilidade de células CasKi foi feito o ensaio MTT utilizando os tempos experimentais de 24, 48 e 72 h de incubação com os derivados semi-sintéticos de curcumina. Primeiramente, foi realizada a triagem inicial utilizando a curcumina (CUR) e os compostos AC1, AC2, AC7, AC10 e AC13 nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 μM (Figura 1). Foi observado que a viabilidade celular diminuiu de maneira dose e tempo dependente. No entanto, os compostos AC1 e AC2 foram altamente citotóxicos desde o primeiro tempo experimental (24 h) em todas as concentrações testadas, apresentando uma queda de mais de 60% da viabilidade celular já a partir da concentração mais baixa (10 μM). Em decorrência do caráter citotóxico, o AC1 e o AC2 foram, então, excluídos das etapas seguintes: PCR em tempo real e Western Blotting. Por outro lado, a viabilidade das células incubadas com a CUR e com os compostos AC7, AC10 e AC13 manteve-se acima dos 80% na menor concentração utilizada (10 μM) e esses quatro compostos seguiram para o ajuste fino de concentração e posteriormente para PCR em tempo real e Western Blotting.

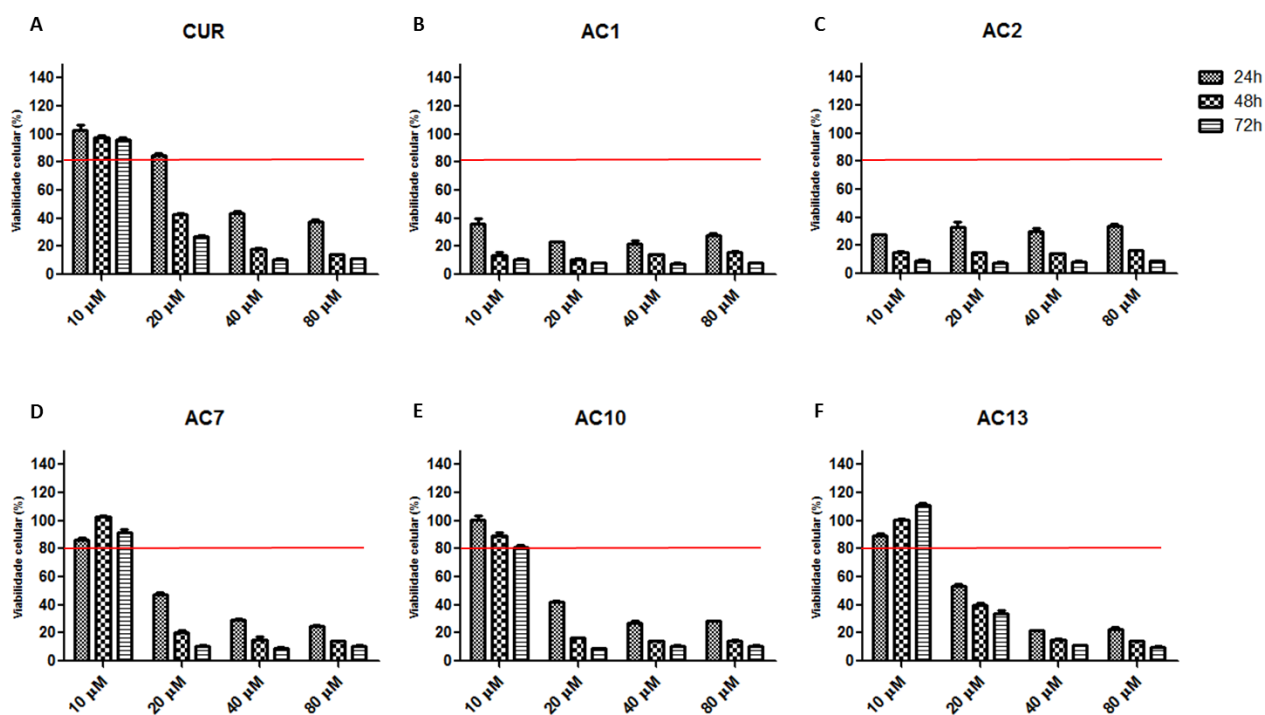


Figura 1. Ensaio MTT para análise de citotoxicidade em células CasKi após 24, 48 e 72h de incubação com os compostos nas concentrações de 10; 20; 40 e 80 µM. Porcentagem de viabilidade celular após a incubação com (A) CUR, (B) AC1, (C) AC2, (D) AC7, (E) AC10 e (F) AC13.

Dessa forma, os compostos AC7, AC10 E AC13 foram selecionados para passar por ajuste fino (Figura 2) entre a concentração não tóxica (10 µM) e a que começa a causar queda da viabilidade celular acima do limite estabelecido (20 µM). Nessa etapa, para cada composto foi selecionada a concentração máxima em que a viabilidade das células manteve-se acima de 80% até o tempo experimental de 72 h. Essas concentrações foram de 12,5; 15,0 e 17,5 µM, respectivamente, para AC7, AC10 e AC13. Com relação a CUR utilizada como controle, o ajuste fino mostrou não ser possível utilizar uma concentração acima de 10 µM. Assim, nessas concentrações estabelecidas, os compostos seguiram para a análise de expressão gênica por PCR em tempo real.

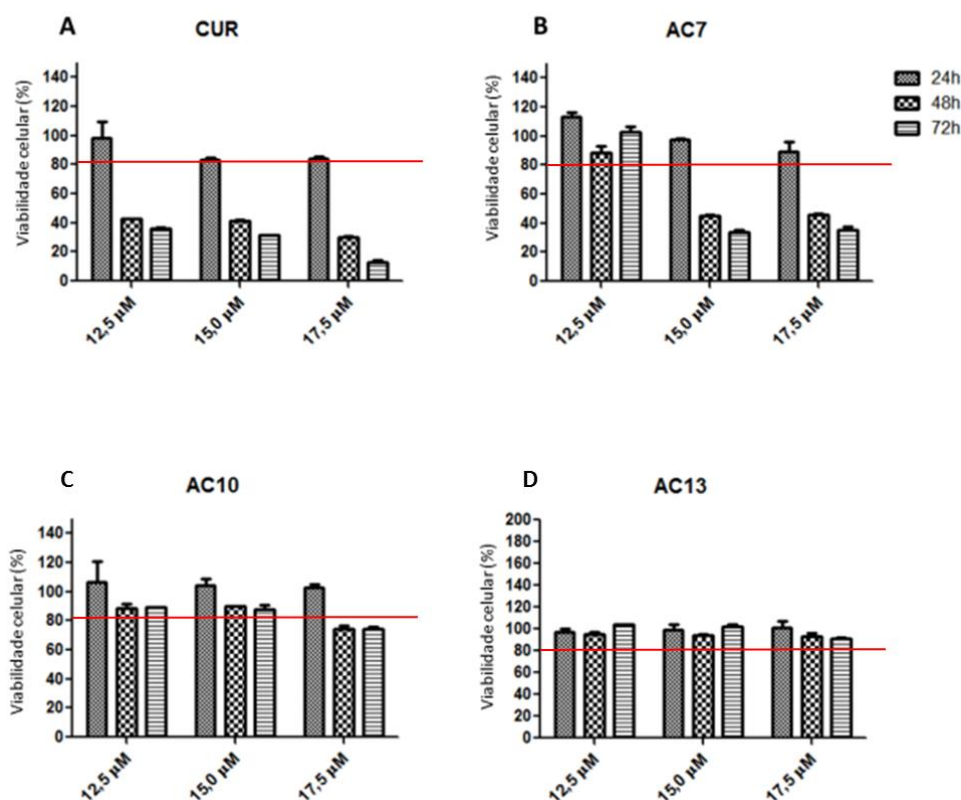


Figura 2. Ensaio de MTT para análise de citotoxicidade em células CasKi após 24, 48 e 72h de incubação com os compostos nas concentrações de 12,5; 15 e 17,5 μM . Porcentagem de viabilidade celular após a incubação com (A) CUR, (B) AC7, (C) AC10 e (D) AC13.

Para controle de citotoxicidade testamos os mesmos compostos (AC1, AC2, AC7, AC10, AC13) em uma linhagem celular não tumoral de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) (Figura 3). Os dados revelaram dose e tempo dependência na queda da viabilidade celular. Ainda, em comparação à linhagem tumoral (CasKi), os compostos AC1 e AC2 mostraram-se mais citotóxicos para as células HaCaT, enquanto AC7, AC10 e AC13 exerceram menor citotoxicidade, especialmente nas concentrações mais baixas (10 e 20 μM). A viabilidade das células HaCaT incubadas com a CUR manteve-se abaixo dos 80% já na menor concentração utilizada (10 μM), sendo que esse composto mostrou-se mais citotóxico para essa linhagem do que para a linhagem CasKi.

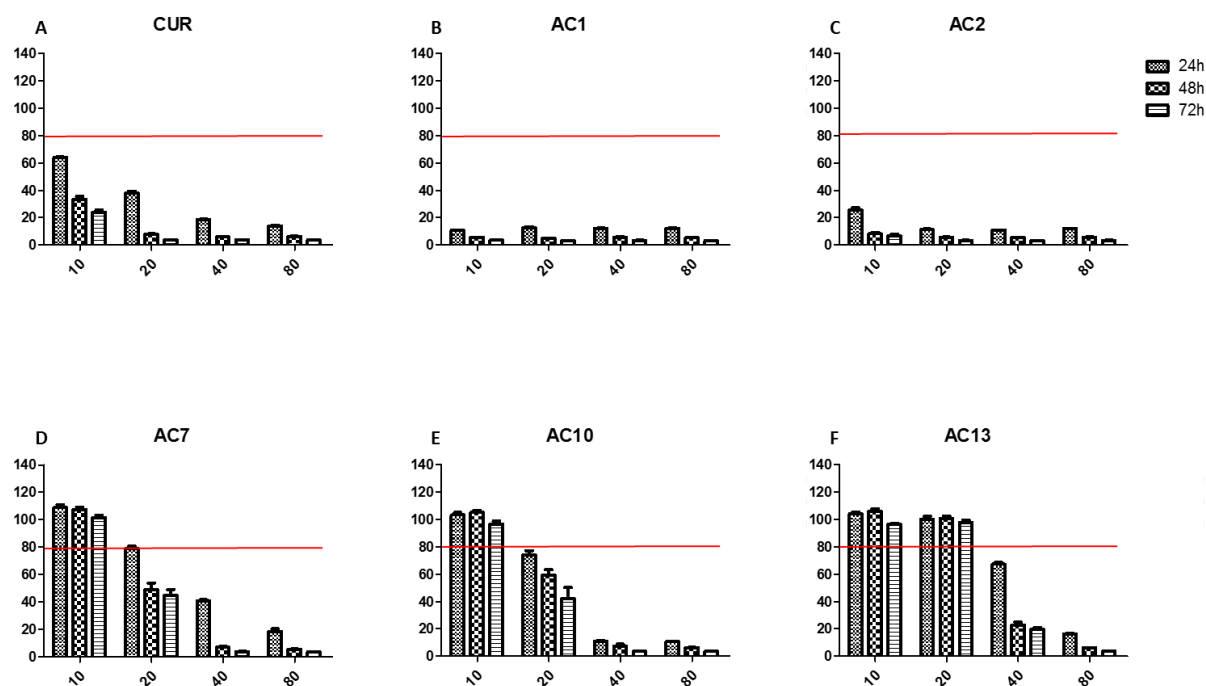


Figura 3. Ensaio MTT para análise de citotoxicidade em células HaCaT após 24, 48 e 72h de incubação com os compostos nas concentrações de 10; 20; 40 e 80 μM . Porcentagem de viabilidade celular após a incubação com (A) CUR, (B) AC1, (C) AC2, (D) AC7, (E) AC10 e (F) AC13.

Considerando que na concentração de 20 μM a incubação com o derivado semi-sintético AC13 levou à queda acentuada de viabilidade celular na linhagem CasKi enquanto não exerceu citotoxicidade significativa sobre células HaCaT, esse composto mostrou-se um potencial candidato a ter sua atividade antitumoral estudada.

4.2 MTT do AC13 em linhagens celulares derivadas de carcinomas

Dessa maneira, o AC13 foi selecionado para ser testado em mais quatro linhagens tumorais (HeLa, MDA 231, MCF-7 e 786-O) nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160 μM pelos tempos experimentais de 24 e 48h. As células também foram incubadas com a curcumina nas mesmas concentrações.

No entanto, para as demais células tumorais (HeLa, MDA 231, MCF-7 e 786-O) o composto AC13 apresentou citotoxicidade significativa apenas em concentrações acima de 20

μM (Figura 4). A incubação com CUR resultou em queda dose e tempo dependente para todas as linhagens celulares e apresentou maior citotoxicidade do que a exposição das células ao semi-sintético AC13 (Figura 5).

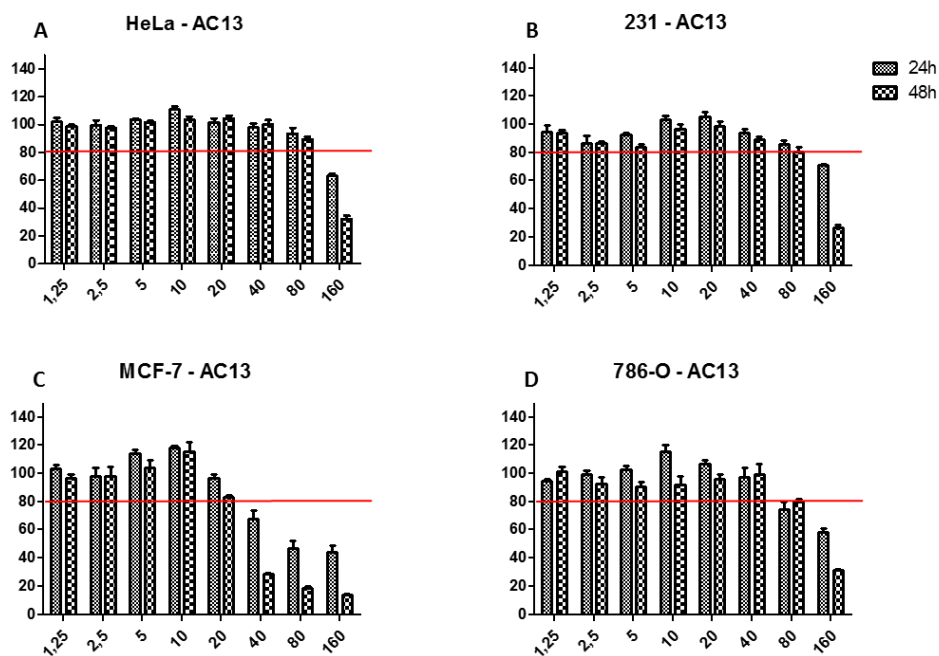


Figura 4. Ensaio MTT para análise de citotoxicidade em células (A) HeLa, (B) MDA-231, (C) MCF-7 e (D) 786-O após 24 e 48 h de incubação com o composto AC13 nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160 μM .

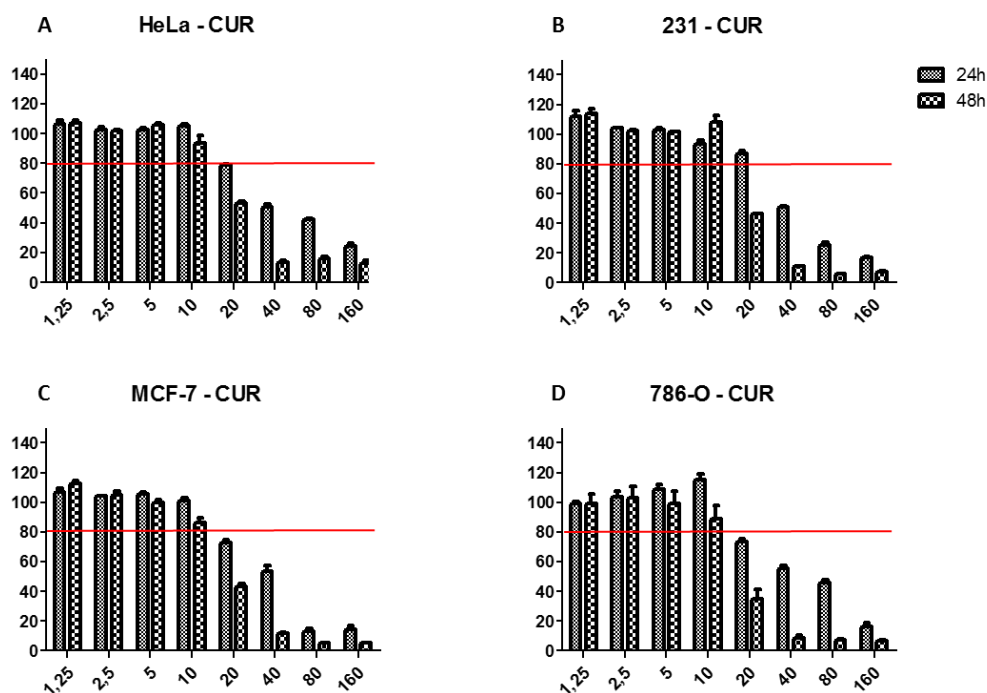


Figura 5. Ensaio MTT para análise de citotoxicidade em células (A) HeLa, (B) MDA-231, (C) MCF-7 e (D) 786-O após 24 e 48 h de incubação com a CUR nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160 μM .

Considerando os resultados acima, foram selecionadas apenas as linhagens CasKi e HaCaT para dar continuidade aos experimentos, visto que para as demais linhagens não foi possível observar vantagem do AC13 em relação à CUR em nenhuma das concentrações testadas. Assim, foi feito um ensaio de citotoxicidade para essas duas linhagens utilizando o AC13 e a CUR nas concentrações de 1,25 a 160 μM . No entanto, os dados obtidos foram discordantes dos resultados iniciais para essas linhagens, de modo que a viabilidade permaneceu muito alta, sugerindo que o composto tenha perdido a atividade, o que provavelmente ocorreu devido ao processo de congelamento e descongelamento ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Dessa forma, um novo lote de AC13 foi sintetizado no Laboratório de Química Verde e Medicinal do IBILCE/UNESP sob supervisão do Prof. Dr. Luís Octávio Regasini. Nesse momento, como nas menores concentrações a viabilidade celular se mantinha em 100%, foi decidido descartar as menores de 5 μM e aumentar os pontos dentro do screening de concentrações acima de 5 μM para analisar de forma mais detalhada a ação do composto. Assim, foram usadas as concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 75; 100 e 125 μM .

Além disso, como um controle de morte celular, foi feito também um ensaio de citotoxicidade da doxorubicina (DOXO) nessas linhagens usando as concentrações de 2,5; 5 e 10 μM .

Analisando os dados obtidos foi possível observar que a atividade do novo lote de AC13 não foi totalmente compatível com a do primeiro lote e isso provavelmente é decorrente da possível diferença de pureza entre os lotes. Embora ambos estejam no mínimo 95% puros, durante o processo de purificação não é possível garantir que lotes diferentes atinjam o mesmo grau de pureza, o que pode refletir na ação do composto.

De modo geral ocorre queda dose dependente na viabilidade das duas linhagens após a incubação com AC13, embora a citotoxicidade só comece a ser mais expressiva nas maiores concentrações. Ainda, podemos observar que nas concentrações de 50; 75 e 100 μM a viabilidade da linhagem HaCaT permanece um pouco acima do que a da linhagem CasKi. Enquanto a linhagem CasKi tem sua viabilidade diminuída para 60% em 50 μM , para a linhagem HaCaT isso acontece em 75 μM (Figura 6).

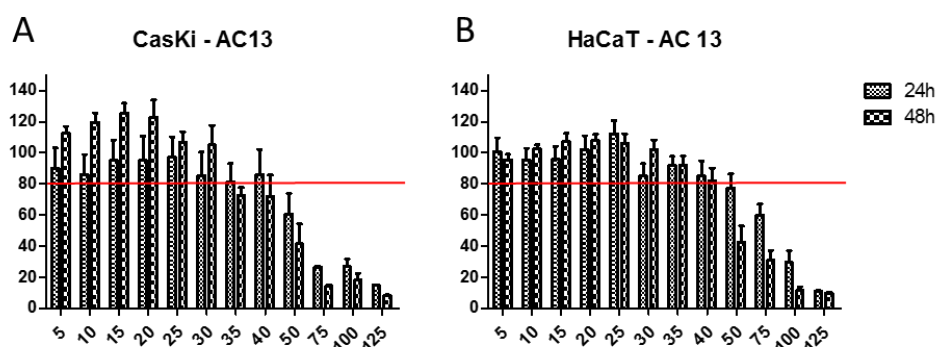


Figura 6. Ensaio MTT para análise de citotoxicidade em células CasKi (A) e HaCaT (B) após 24 e 48 de incubação com o composto AC13 nas concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 75; 100 e 125 μM .

Com relação à CUR, a citotoxicidade também foi dose dependente, mas foi mais elevada que a do composto AC13 para as duas linhagens. Além disso, a CUR apresentou maior citotoxicidade para células HaCaT, levando a uma queda de viabilidade em 24h de mais de 50% já na concentração de 15 μM , enquanto a viabilidade das células CasKi é mantida acima de 90% nessa mesma concentração (Figura 7).

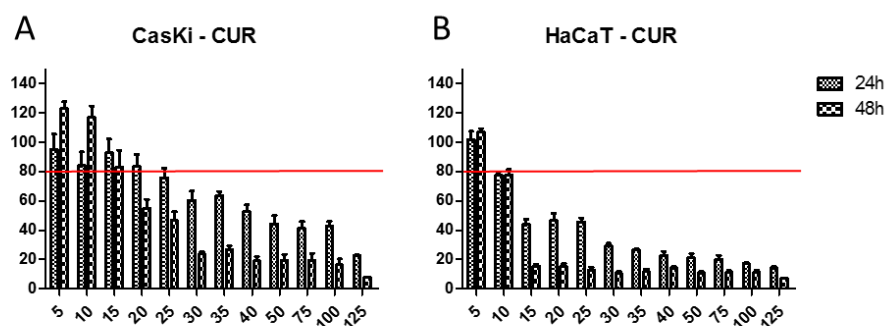


Figura 7. Ensaio MTT para análise de citotoxicidade em células CasKi (A) e HaCaT (B) após 24 e 48 de incubação com a CUR nas concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 75; 100 e 125 µM.

Por fim, a DOXO utilizada como controle de morte apresentou citotoxicidade significativa já na menor concentração utilizada (2,5 µM), levando a uma queda de viabilidade de mais de 50% para as células CasKi e mais de 80% para células HaCaT no primeiro tempo experimental (24h). Assim, em uma concentração bem mais baixa a DOXO já exerce maior citotoxicidade que o AC13 e a CUR (Figura 8).

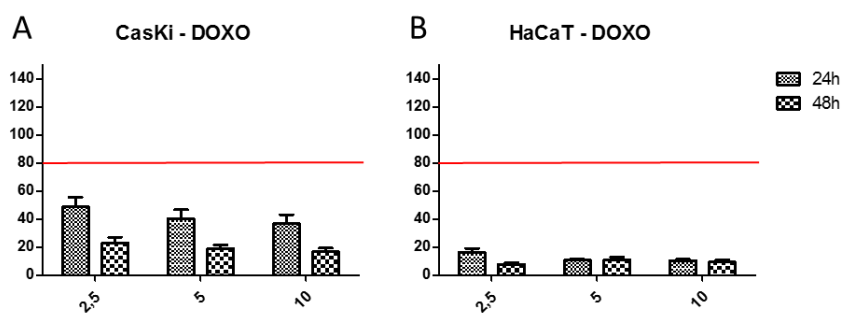


Figura 8. Ensaio MTT para análise de citotoxicidade em células CasKi (A) e HaCaT (B) após 24 e 48 de incubação com a DOXO nas concentrações de 2,5; 5 e 10 µM.

4.3 Análise da expressão do oncogenes virais E6 e E7 por PCR em tempo real (qPCR)

Para analisar se os compostos semi-sintéticos do primeiro lote que foram selecionados levam à diminuição dos níveis de RNAm de E6 e E7, amostras de células CasKi incubadas 24h com AC7, AC10, AC13 e CUR nas concentrações determinadas pelo ajuste fino (12,5; 15,0; 17,5 e 10,0 μ M, respectivamente) foram avaliadas por PCR em tempo real após extração de RNA e síntese de cDNA. No entanto, os dados obtidos mostraram que nenhum dos compostos resultou em uma diminuição significativa da expressão dos oncogenes E6 e E7 (Figura 9).

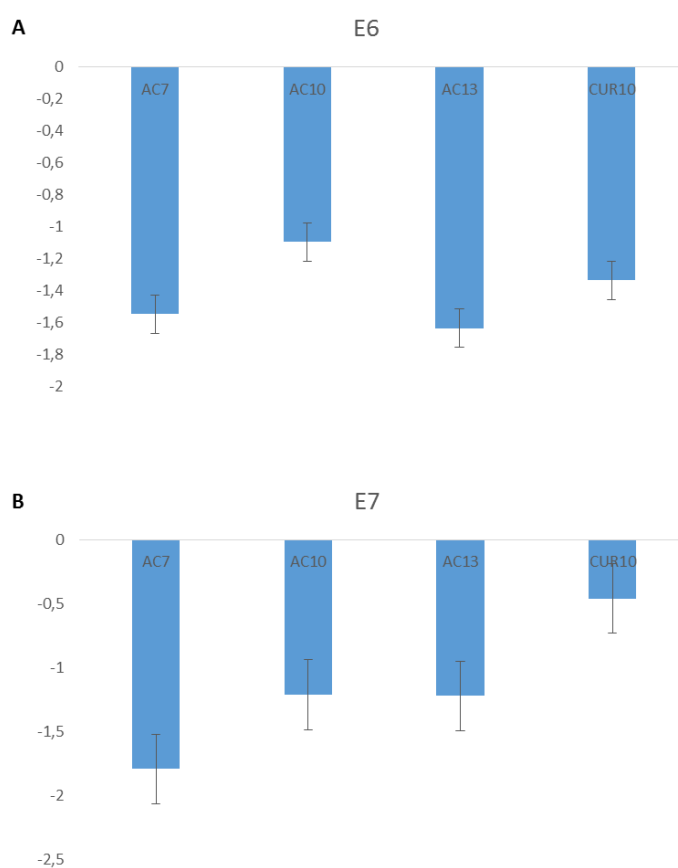


Figura 9. Análise da expressão dos oncogenes virais (A) E6 e (B) E7 de HPV de alto risco em células CasKi após 24 h de incubação com a CUR e os compostos semi-sintéticos de curcumina AC7, AC10 e AC13 nas concentrações de, respectivamente, 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 μ M.

4.4 Avaliação da expressão da proteína p53 por Western Blotting

Para confirmação dos resultados obtidos no *Real Time*, foi feito Western Blotting para analisar o nível de expressão da proteína p53 após a incubação de células CasKi com os compostos do primeiro lote. Com isso, podemos analisar indiretamente a expressão da proteína E6, visto que E6 liga-se à p53 degradando-a. Dessa forma, se o nível de p53 fosse restaurado significaria indiretamente que a expressão da oncoproteína E6 estaria diminuída. No entanto, corroborando com os dados obtidos no *Real Time*, não foi possível observar expressão da proteína p53 em nenhuma amostra, o que nos indica que a expressão de E6 não foi alterada após a incubação das células com os compostos AC7, AC10, AC13 e CUR. Isso é confirmado pela amostra controle (C33) visto que esta é uma linhagem HPV negativa e nos permite observar a expressão proteica de p53 (Figura 10).

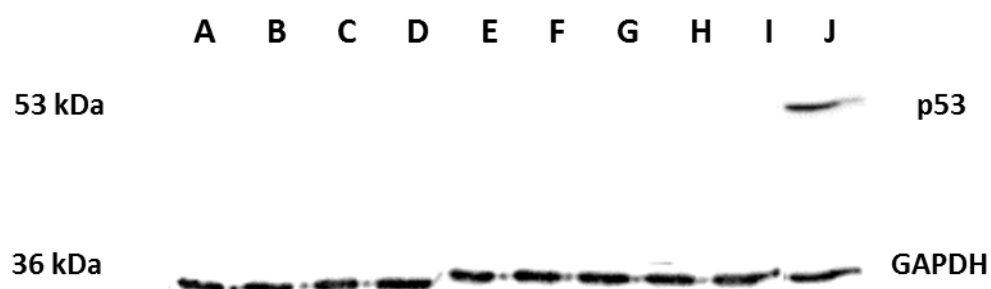


Figura 10. Análise da expressão da proteína celular p53 em células CasKi após 24 h de incubação com (A) CUR 10 μ M (B) CUR 20 μ M e os compostos semi-sintéticos de curcumina (C) AC7 10 μ M (D) AC7 20 μ M (E) AC10 10 μ M (F) AC10 20 μ M (G) AC13 10 μ M (H) AC13 20 μ M (I) células CasKi sem tratamento e (J) células C33.

4.5 Detecção da atividade enzimática da caspase 3/7 por meio de ensaio de apoptose

Afim de avaliar a ocorrência de apoptose em células CasKi e HaCaT após a incubação com AC13 do segundo lote e CUR, foi realizado um ensaio luminescente de apoptose (utilizando a concentração de 50 μ M) que analisa a atividade enzimática das caspases 3 e 7 utilizando um reagente que contém um substrato luminogênico que é clivado pelas caspases. Dessa forma, o sinal luminescente gerado é proporcional à atividade das caspases na amostra.

Na linhagem CasKi os dados revelam que a incubação com AC13 induziu um aumento de 401,8 % na atividade das caspases 3/7 em relação as células controle e de 268,9 % em relação às células incubadas com a CUR. Para a linhagem HaCaT foi observado que o AC13 aumentou em 339,9 % a atividade das caspases 3/7 em relação às células controle e 55,2 % em relação às células tratadas com a CUR. Dessa maneira, esses resultados indicam que com 24 h o composto AC13 desencadeia morte celular por apoptose nas linhagens CasKi e HaCaT e que a indução de aumento da atividade das caspases é maior após a incubação com o AC13 do que com a CUR (Figura 11).

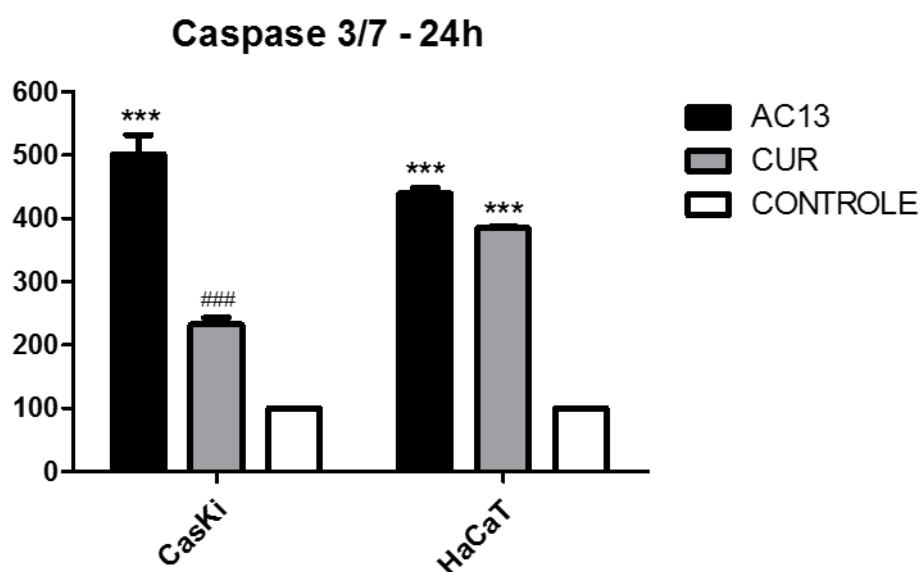


Figura 11. Análise da atividade das caspases 3 e 7 em células CasKi e HaCaT após 24 h de incubação com o composto AC13 e a CUR na concentração de 50 μ M. CasKi: *** $p < 0,001$ vs CUR e CONTROLE; ### $p < 0,001$ vs CONTROLE. HaCaT: *** $p < 0,001$ vs CONTROLE.

5. DISCUSSÃO

A curcumina é uma substância amarela oriunda do rizoma da planta *Curcuma longa* (HATCHER et al., 2008) que vem sendo largamente estudada em pesquisas sobre câncer (LIU, CHEN, 2013) por apresentar diversas propriedades terapêuticas interessantes, tais como atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, anti-angiogênica e anti-metastática (MIMEAULT, BATRA, 2011). No entanto, existem algumas limitações no uso dessa substância, tais como o seu rápido metabolismo e baixa biodisponibilidade. Estudos como o de Zhao e colaboradores (2014) descrevem derivados sintéticos que apresentam maior efeito antiviral do que seus precursores naturais. Assim, afim de superar essas desvantagens algumas pesquisas têm se dedicado à modificação química da curcumina (OHORI et al., 2006).

Infecções por HPV de alto risco estão relacionadas com diversos cânceres das regiões orofaríngea e anogenital, estando estritamente relacionadas com o tipo cervical (ZUR HAUSEN, 2002). O potencial oncogênico dos HPVs de alto risco necessita de uma infecção permanente e está relacionado com a expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 (MOODY, LAIMINS, 2010). A proteína E6 liga-se à proteína celular p53 formando um complexo estável e resultando em sua degradação, desregulando assim o ciclo celular, visto que, em situações normais, p53 leva a parada de ciclo ou apoptose na presença de estresse ou dano celular (TALIS, et al., 1998). A proteína E7 liga-se a proteínas supressoras de tumor da família retinoblastoma (pRb) levando à inibição da função dessas proteínas (DYSON et al., 1989). Assim, em conjunto, essas duas oncoproteínas virais desempenham importante papel transformante, desregulando processos como apoptose e a proliferação celular e, dessa forma, a inibição de E6 e E7 pode levar à recuperação funcional das vias de supressão tumoral (HONEGGER et al., 2015).

Mishra e colaboradores (2015) relataram que a curcumina diminui a expressão de E6 e restaura os níveis de p53 em células de câncer oral positivas para HPV 16. A inibição das oncoproteínas E6 e E7 e o aumento da expressão proteica de p53 e pRb após tratamento com a curcumina também já foi observada em estudos com células de carcinoma cervical. Além disso, foi relatado que a curcumina também levou a uma diminuição dos níveis de RNAm de E6 e E7 (DIVYA, PILLAI, 2006; MAHER et al., 2011). Nesse estudo, determinamos por meio de ensaio de citotoxicidade em células CasKi as concentrações de três derivados semi-sintéticos de curcumina (AC7, AC10 e AC13) e avaliamos por meio de PCR em tempo real a ação desses compostos sobre a expressão dos oncogenes E6 e E7 de HPV de alto risco. No entanto, os dados obtidos mostraram que nenhum dos derivados resultou em uma diminuição

significativa nos níveis de RNAm de E6 e E7. Ainda, corroborando com os dados do PCR em tempo real, não foi identificada expressão proteica de p53 em nenhuma das amostras tratadas, o que indiretamente indica que não houve inibição de E6.

Comparando os resultados obtidos por meio dos primeiros ensaios de MTT entre as linhagens celulares CasKi e HaCaT, foi observado que a citotoxicidade do composto AC13 foi bem mais expressiva nas células tumorais (CasKi) do que nas não tumorais (HaCaT). Isso também foi observado por Selvendiran e colaboradores (2010) ao investigar o efeito de um análogo de curcumina denominado HO-3867 em diversas linhagens tumorais e não tumorais. No presente trabalho, na concentração de 20 μM a viabilidade das células HaCaT manteve-se próximo a 100% até o último tempo experimental (72 h), enquanto as células CasKi tiveram sua viabilidade diminuída para menos de 60% após 24 h de incubação, chegando a menos de 40% no tempo de 72 h.

Além disso, observamos outra característica interessante do composto AC13 na linhagem não tumoral ao compará-lo com a curcumina. Na concentração de 20 μM , enquanto a incubação com a curcumina resulta na queda da viabilidade das células HaCaT para cerca de 40% já no primeiro tempo experimental (24 h) e 10% no último (72 h), a viabilidade dessas células permanece próximo de 100% em todos os tempos experimentais após a incubação com AC13. Samaan e colaboradores (2014) também relataram como potentes agentes antitumorais quatro análogos de curcumina que tiveram resultados mais promissores que a curcumina em células tumorais de diferentes linhagens metastáticas e que não exerceram citotoxicidade em células epiteliais mamárias não tumorais.

Assim, considerando a conhecida atividade antitumoral da curcumina (WILKEN et al., 2011) e comparando os resultados obtidos na análise de citotoxicidade dos compostos nas linhagens HaCaT e CasKi, o composto AC13 apresentou importantes vantagens em relação à curcumina, visto que o potencial terapêutico de substâncias que apresentam maior atividade citotóxica em células tumorais do que em células não tumorais vem sendo destacado em estudos como o de Martins e colaboradores (2014) no qual o composto arborescin, oriundo da planta *Artemisia gorgonum*, é relatado como uma molécula antitumoral promissora após ser observado que a citotoxicidade por ele desencadeada em uma linhagem não tumoral de estroma de medula óssea é significativamente mais baixa do que em linhagens de neuroblastoma e hepatocarcinoma.

Nesse contexto, considerando que a proliferação celular descontrolada é um processo necessário para a carcinogênese (FANTINI, et al., 2015), há um grande interesse em pesquisas que busquem por agentes antitumorais que sejam seletivamente citotóxicos e

diversos análogos de curcumina tem sido sintetizados para essa finalidade (FADDA, BADRIA, EL-ATTAR, 2010). O análogo de curcumina B19 foi relatado como um potente agente anti-angiogênico por inibir a migração de células endoteliais humanas de veia umbilical e, conseqüentemente, a formação de novos vasos sanguíneos (SUN et al., 2014). Zhou e colaboradores (2014) relataram a atividade anti-proliferativa do análogo de curcumina IHCH sobre células de câncer de pulmão. Em outro estudo foi detectada atividade anti-inflamatória no uso de análogos manocarbonilos assimétricos de curcumina (ZHANG et al., 2014). Em um estudo de Paulraj e colaboradores (2015) quatro derivados de curcumina foram avaliados e percebeu-se que a citotoxicidade dos mesmos era superior à da curcumina e maior em células de carcinoma cervical (CasKi e HeLa) do que em uma linhagem não tumoral de fibroblastos de pulmão (MRC9). Ainda, o composto MS17, por ter sido o composto mais citotóxico, foi selecionado para estudos mais abrangentes que revelaram atividade anti-proliferativa e indutora de apoptose (PAULRAJ et al., 2015).

Dessa forma, com base nas análises de viabilidade celular, podemos sugerir que o derivado semi-sintético de curcumina AC13 é um possível composto interessante para estudos de tratamentos antitumorais, de modo que se torna válido avaliar a sua citotoxicidade em outras linhagens tumorais. Para isso foi adotado um screening maior de concentrações que permitisse analisar de forma mais completa a citotoxicidade da droga, mas, diferente do que observamos em células CasKi, em nenhuma das concentrações estudadas a citotoxicidade desencadeada pelo AC13 foi menor na linhagem não tumoral (HaCaT) do que nas demais linhagens tumorais HeLa, MDA 231, MCF-7 e 786-O.

A seletividade de drogas por determinados tipos de câncer é descrita em trabalhos como o de Wei e Malhotra (2012) em que uma série de compostos sintéticos foram testados em um painel de linhagens tumorais humanas de diferentes histologias e apresentaram citotoxicidade seletiva por células de câncer de rim e mama. Da mesma forma, em um estudo realizado utilizando o mesmo painel de linhagens tumorais, foi relatado que a pró-droga CLO exerceu citotoxicidade seletiva por células de melanoma, apresentando caráter citotóxico para três das seis linhagens de melanoma utilizadas. (WEBSTER et al., 2014).

Nesse contexto, apenas as linhagens CasKi e HaCaT foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho e, para isso, foi necessário repetir o ensaio de MTT para essas linhagens afim de adicionar as concentrações de 1,25; 2,5; 5 e 160 μ M. No entanto, os resultados obtidos mostraram que mesmo nas maiores concentrações o composto AC13 manteve a viabilidade celular em torno de 100%, sugerindo perda de atividade devido, provavelmente, ao frequente processo de congelamento e descongelamento. Então, um lote

novo foi sintetizado e, junto a isso, algumas alterações no screening de concentrações foram feitas para ajustar o ensaio de modo a ter uma análise mais detalhada do composto.

Dessa forma, nesse ensaio foram utilizadas as concentrações de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50; 75; 100 e 125 μM . No entanto, os resultados obtidos mostraram que o novo lote de AC13 foi menos citotóxico do que o lote inicial, apresentando queda de viabilidade significativa apenas nas concentrações mais altas. No entanto, ainda é possível observar concentrações em que a citotoxicidade exercida pelo composto é ligeiramente maior em CasKi do que em HaCaT (50, 75 e 100 μM). Com relação à CUR, para ambas as linhagens, a CUR resultou em queda de viabilidade dose dependente, tendo exercido maior citotoxicidade em células HaCaT do que em células CasKi. Além disso, a CUR foi mais citotóxica do que o AC13 para a linhagem não tumoral. Dessa forma, o composto AC13 permaneceu apresentando vantagens que o tornam um possível antitumoral e, assim, foi feita uma análise mais aprofundada sobre a ação desse derivado semi-sintético sobre a viabilidade das células das linhagens utilizadas.

Existem diferentes mecanismos pelos quais a morte de uma célula pode ser desencadeada, tais como a necrose, a autofagia e a apoptose (GALLUZZI et al., 2007). A apoptose é um processo altamente conservado que, além de desempenhar importante papel no desenvolvimento embrionário, proporciona a manutenção da homeostase tecidual (HANAHAN, WEINBERG, 2011; MOHAMMAD et al., 2015), tornando-se um evento fundamental para manter o equilíbrio entre a morte e a sobrevivência celular, além de auxiliar na manutenção da integridade do genoma (PLATI, BUCUR, KHOSRAVI-FAR, 2011).

Dessa forma, a indução da apoptose configura uma estratégia para a inibição da progressão tumoral e diversos produtos naturais como os flavonoides apresentam essa propriedade, como é o caso do composto TFC isolado da planta *Herba oxytropis* que suprime o crescimento de células de câncer de próstata por meio da indução de apoptose (SHENG et al., 2015). A indução da apoptose pela curcumina também já foi relatada, por exemplo, em estudos como o de Lv e colaboradores (2014) utilizando células de câncer de mama, tendo sido observada a inibição do crescimento tumoral devido a indução de apoptose tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Da mesma maneira, o potencial terapêutico de análogos de curcumina que induzem a apoptose também já foi observado, como em um trabalho de Bill e colaboradores (2010) com células de melanoma.

O processo apoptótico é caracterizado pelo arredondamento celular, condensação da cromatina, redução do volume celular, gradual perda da integridade da membrana plasmática (levando à perda da sua identidade morfológica), fragmentação celular (incluindo o núcleo) e

o seu engolfamento por células adjacentes (fagocitose). (KROEMER et al., 2009; GALLUZZI et al., 2012).

A apoptose configura o principal tipo de morte celular (GOLDAR et al., 2015) e pode ocorrer por dois mecanismos, a via intrínseca e a via extrínseca, embora ambas sejam reguladas por diferentes caspases e culminem na ativação da caspase-3, a qual conduz a célula a processos como a fragmentação do DNA, formação de bolhas na membrana e consequente fagocitose (SUN, et al., 2015). As caspases são produzidas nas células e permanecem como zimogênios inativos até que seja recebido um estímulo específico de morte que leve à ativação da sua atividade de protease (EARNSHAW, MARTINS, KAUFMANN, 1999; PARRISH, FREEL, KORNBLUTH, 2013).

As caspases 3 e 7 são consideradas caspases executoras e, embora a caspase 3 atue sobre uma maior gama de substratos enquanto a caspase 7 é mais seletiva, as duas são enzimas intimamente relacionadas que são ativadas durante a fase de demolição da apoptose apresentando funções importantes durante o processo de morte celular (WALSH et al., 2008). Assim, considerando que já existem estudos que fornecem evidências de que a curcumina induz morte celular por apoptose através da ativação de caspases (GOGADA et al., 2011), células CasKi e HaCaT incubadas com AC13 foram avaliadas, por meio de ensaio luminescente, quanto à atividade das caspases 3 e 7 para averiguar se a queda de viabilidade celular observada no presente estudo era decorrente de morte por apoptose em função da ativação dessas proteases, visto que o aumento da atividade de caspases em linhagens celulares de carcinoma cervical já foi relatado em estudos utilizando a curcumina (SINGH, SINGH, 2009) e análogos de curcumina (PAULRAJ et al., 2015).

Embora o ensaio de viabilidade realizado revele que na concentração de 50 μM a citotoxicidade da curcumina seja maior que a do AC13 para ambas as linhagens, a indução da atividade das caspases pelo composto AC13 foi 268,9 e 55,2 % maior em relação à CUR para as linhagens CasKi e HaCaT, respectivamente. Essa diferença pode ser decorrente do fato de que o ensaio de detecção de atividade das caspases 3 e 7 indicar a ocorrência de apoptose, enquanto a queda de viabilidade pode ser resultado de mais de um tipo de morte celular. Já foi relatado, por exemplo, que na presença de luz a curcumina pode levar células à apoptose e necrose devido à formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (BRUZELL, MORISBAK, TONNESEN, 2005). Além disso, já foi descrita a ocorrência de morte celular autofágica em células de glioma maligno humano expostas à curcumina (THAYYULLATHIL et al., 2014).

Além disso, similarmente a um estudo de Lee e colaboradores (2010) em que foi observado que o análogo de curcumina DMC não só induziu a ativação da caspase 3 e, conseqüentemente, a apoptose em células de carcinoma renal humano, como também apresentou um resultado mais potente do que a curcumina, de acordo com os dados obtidos no presente estudo, células CasKi e HaCaT expostas por 24 h à incubação com o AC13 tiveram um aumento na atividade das caspases de, respectivamente, 401,8 e 339,9 % em relação às células que receberam apenas meio de cultura. Portanto, o ensaio sugere que o derivado semi-sintético AC13 apresenta vantagens interessantes em relação à curcumina na ativação das caspases 3 e 7 e, conseqüentemente, na indução de apoptose.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir que, na linhagem celular de carcinoma cervical humano HPV-16 positiva (CasKi), nenhum dos compostos semi-sintéticos de curcumina testados levaram à diminuição da expressão dos oncogenes E6 e E7 de HPV de alto risco. Corroborando com esse dado, não foi possível observar restauração do principal alvo de E6, a proteína celular p53, indicando de maneira indireta que a proteína viral não foi afetada pela exposição aos compostos. No entanto, embora para as linhagens de carcinoma cervical HPV 18 positiva (HeLa), de câncer de mama metastático (MDA 231), câncer de mama não metastático (MCF-7) e de carcinoma renal (786-O) o composto AC13 não tenha exercido atividade antitumoral interessante, as análises sugerem que esse composto possa exercer uma possível atividade antitumoral na linhagem CasKi.

Nesse contexto, apesar dos dados de viabilidade celular obtidos terem sido diferentes entre os dois lotes de composto, ambos apresentaram concentrações em que a citotoxicidade foi maior na linhagem tumoral (CasKi) do que na linhagem não tumoral de queratinócito humano imortalizado (HaCaT). Além disso, nessas mesmas concentrações, os dois lotes de AC13 apresentaram menor citotoxicidade que a CUR para a linhagem HaCaT.

Ainda, foi possível observar por meio de ensaio luminescente de apoptose que a incubação com o segundo lote de AC13 aumentou consideravelmente a atividade das caspases 3 e 7 em relação ao controle e também levou a um aumento em relação à CUR. Assim, os dados indicam que a morte celular desencadeada pelo AC13 nessas linhagens ocorre por meio do processo de apoptose.

Portanto, os resultados obtidos da exposição de células CasKi e HaCaT ao derivado semi-sintético AC13 sugerem que o composto apresenta vantagens interessantes em relação à curcumina, como ser menos citotóxico para a linhagem não tumoral utilizada e levar a uma maior ativação das caspases 3 e 7 e, conseqüentemente, a uma maior indução de apoptose.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res**, v. 23, p. 363–98, 2003.
- ALIBEK, K.; KAKPENOVA, A.; BAIKEN, Y. Role of infectious agents in the carcinogenesis of brain and head and neck cancers. **Infect Agent Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**, v. 4, n. 6, p. 807-18, 2007.
- BADULESCU, F.; CRISAN, A.; BADULESCU, A.; SCHENKER, M. Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of head and neck cancer. **Rom J Morphol Embryol**, v. 51, n. 3, p. 437- 440, 2010.
- BARZEGAR, E.; FOULADDEL, S.; MOVAHHED, T. K.; ATASHPOUR, S.; GHAHREMANI, M. H.; OSTAD, S. N.; AZIZI, E. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. **Iran J Basic Med Sci**, v. 18, n.4, p. 334-342, 2015.
- BEEVERS, C. S.; HUANG, S. Pharmacological and clinical properties of curcumin. **Botanics: Targets and Therapy**, p. 5-18, 2011.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; van DOORSLAER, K.; zur HAUSEN, H.; de VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, 2010.
- BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **Int J Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-6, 2006.
- BILL, M. A.; FUCHS, J. R.; LI, C.; YUI, J.; BAKAN, C.; BENSON, D. M. Jr.; SCHWARTZ, E. B.; ABDELHAMID, D.; LIN, J.; HOYT, D. G.; FOSSEY, S. L.; YOUNG, G. S.; CARSON, W. E. 3rd.; LI, P. K.; LESINSKI, G. B. The small molecule curcumin analog FLLL32 induces apoptosis in melanoma cells via STAT3 inhibition and retains the cellular response to cytokines with anti-tumor activity. **Mol Cancer**, v. 25, 2010.
- BRAVO-CUELLAR, A.; ORTIZ-LAZARENO, P. C.; LERMA-DIAZ, J. M.; DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, J. R.; JAVE-SUAREZ, L. F.; AGUILAR-LEMARROY, A.; DEL TORO-ARREOLA, S.; DE CELIS-CARRILO, R.; SAHAGUN-FLORES, J. E.; DE ALBA-GARCIA, J. E.; HERNANDEZ-FLORES, G. Sensitization of cervix cancer cells to Adriamycin by Pentoxifylline induces an increase in apoptosis and decrease senescence. **Mol Cancer**, v. 9, n. 114, p. 1-14, 2010.
- BROWN, M. R.; RAMIREZ, J. D.; FARQUHAR-SMITH, P. Pain in cancer survivors. **Br J Pain**, v. 8, n. 4, p. 139-153, 2014.

BRUZELL, E. M.; MORISBAK, E.; TONNESEN, H. H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. **Photochem Photobiol Sci**, v. 4, n. 7, p. 523-530, 2005.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

CHATTOPADHYAY, I.; BISWAS, K.; BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, R. K. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **Curr. Sci**, v. 87, n. 1, p. 44-53, 2004.

CHEN, A.; XU, J.; JOHNSON, A. C. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 278-87, 2006.

COOPER, G. M. **The molecular cell approach**. Ed. Sinauer. 2. ed., 2000.

CURRY, E. L.; MOAD, M.; ROBSON, C. N.; HEER, R. Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. **World J. Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 461-469, 2015.

DIVYA, C. S.; PILLAI, M. R.. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. **Mol Carcinog**, v. 45, n. 5, p. 320-32, 2006.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**, v. 110, n. 5, p. 525-41, 2006.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55-70, 2012.

DULBECCO, P.; SAVARINO, V. Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 48, p. 9256-70, 2013.

DUNNE, E. F.; PARK, I. U. HPV and HPV-associated diseases. **Infect Dis Clin North Am**, v. 27, n. 4, p. 765-78, 2013.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, v. 243, n. 4893, p. 934-7, Feb 17 1989.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p. 383-424, 1999.

FADDA, A. A.; BADRIA, F. A.; EL-ATTAR, K. M. Synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. **Med Chem Res**, v. 19, n. 5, p. 413-430, 2010.

FAKHRY C.; WESTRA W. H.; CMELAK S. L. A.; RIDGE, J. A.; PINTO, H.; FORASTIERE, A.; GILLISON, M. L. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, n. 4, p. 261-269, 2008.

FANTINI, M.; BENVENUTO, M.; MASUELLI, L.; FRAJESE, G. V.; TRESOLDI, I.; MODESTI, A.; BEI, R. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 5, p. 9236-9282, 2015.

FERA, D.; SCHULTZ, D. C.; HODAWADEKAR, S.; REICHMAN, M.; DONOVER, P. S.; MELVIN, J.; TROUTMAN, S.; KISSIL, J. L.; HURYN, D. M.; MARMORSTEIN, R. Identification and Characterization of Small Molecule Antagonists of pRb Inactivation by Viral Oncoproteins. **Chem Biol**, v. 19, n. 4, p. 518-528, 2012.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; ISHIHARA, M.; KADOMA, Y. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. **Anticancer Res**, v. 24, p. 563-9, 2004.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1237-1243, 2007.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.

GANTA, S.; AMIJI, M. Coadministration of Paclitaxel and Curcumin in Nanoemulsion Formulations To Overcome Multidrug Resistance in Tumor Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 928-939, 2009.

GIRGIS, A. H.; IAKOVLEV, V. V.; BEHESHTI, B.; BAYANI, J.; SQUIRE, J. A.; BUI, A.; MANKARUOS, M.; YOUSSEF, Y.; KHALIL, B.; KHELLA, H.; PASIC, M.; YOUSEF, G. M. Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 72, n. 20, p. 5273-5284, 2012.

GOGADA, R.; AMADORI, M.; ZHANG, H.; JONES, A.; VERONE, A.; PITARRESI, J.; JANDHYAM, S.; PRABHU, V.; BLACK, J. D.; CHANDRA, D. Curcumin induces Apaf-1-dependent, p21-mediated caspase activation and apoptosis. **Cell cycle**, v. 10, n. 23, p. 4128-4137, 2011.

GOLDAR, S.; KHANIANI, M. S.; DERAKHSHAN, S. M.; BARADARAN, B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2129-2144, 2015.

GOLDSTEIN, M.A.; GOODMAN, A.; DEL CARMEN, M.G.; WILBUR, D.C. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 10–2009. A 23-year-old woman with an abnormal Papanicolaou smear. **N. Engl. J. Med**, v. 360, n. 13, p. 1337–1344, 2009.

GUPTA, S. C.; KIM, J. H.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B.B. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 3, p. 405-34, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HASIMA, N.; OZPOLAT, B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. **Cell Death Dis**, v. 5, p. 1-13, 2014.

HATCHER, H.; PLANALP, R.; CHO, J.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n.11, p. 1631-1652, 2008.

HEBNER, C.; BEGLIN, M.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus E6 proteins mediate resistance to interferon-induced growth arrest through inhibition of p53 acetylation. **J. Virol**, v. 81, n. 23, p. 12740–12747, 2007.

HONEGGER, A.; SCHILLING, D.; BASTIAN, S.; SPONAGEL, J.; KURYSHEV, V.; SÜLTSMANN, H.; SCHEFFNER, M.; HOPPE-SEYLER, K.; HOPPE-SEYLER, F. Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. **Plos Pathog**, v. 11, n. 3, 2015.

HOSSEINI, A.; GHORBANI, A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. **Avicenna J Phytomed**, v. 5, n. 2, p. 84-97, 2015.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **Embo. J**, v. 10, n. 13, p. 4129–4135, 1991.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em <http://www.inca.org.br>. Acesso em 09/11/2015.

KHAZAEI KOOHPAR, Z.; ENTEZARI, M.; MOVAFAGH, A.; HASHEMI, M. Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of Mcl-1 Gene. **Iran J Cancer Prev**, v. 8, n. 3, p. 1-4, 2015.

KIM, M. K.; KIM, H. S.; KIM, S. H.; OH, J. M.; HAN, J. Y.; LIM, J. M.; JUHNN, Y. S.; SONG, Y. S. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 12, p. 1930-5, 2010.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LEE, J. W.; HONG, H. M.; KWON, D. D.; PAE, H. O.; JEONG, H. J. Dimethoxycurcumin, a structural analogue of curcumin, induces apoptosis in human renal carcinoma caki cells through the production of reactive oxygen species, the release of cytochrome C, and the activation of caspase-3. **Korean J Urol**, v. 51, n. 12, p. 870-878, 2010.

LI, N.; FRANCESCHI, S.; HOWELL-JONES, R.; SNIJDERS, P. J.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **Int J Cancer**, v. 128, n. 4, p. 927-35, 2011.

LI, S.; HU, T.; CHEN, Y.; ZHOU, H.; LI, X.; CHENG, X.; YANG, R.; WANG, S.; XIE, X.; MA, D. Adjuvant chemotherapy, a valuable alternative option in selected patients with cervical cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-9, 2013.

LI, W.; WANG, W.; SI, M.; HAN, L.; GAO, Q.; LUO, A.; LI, Y.; LU, Y.; WANG, S.; MA, D. The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, n. 12, p. 1355–1361, 2008.

LI, D. X.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; ZHAO, P. W.; YANG, L. M. Inhibitory effect of berberine on human skin squamous cell carcinoma A431 cells. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 10553-10568, 2015.

LIAO, H.; WANG, Z.; DENG, Z.; REN, H.; LI, X. Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP2 pathway. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 6, p. 8948-8957, 2015.

LIN, J. K. Molecular targets of curcumin. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 595, p. 227–243, 2007.

LIU, D.; SCHWIMMER, J.; LIU, Z.; WOLTERING, E. A.; GREENWAY, L. Antiangiogenic Effect of Curcumin in Pure Versus in Extract Forms. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 10-11, p. 677-682, 2008.

LIU, D.; CHEN, Z. The effect of curcumin on breast cancer cells. **J Breast Cancer**, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2013.

LIU, N.; ZHAO, L. J.; LI, X. P.; WANG, J. L.; CHAI, G. L.; WEI, L. H. Histone deacetylase inhibitors inducing human cervical cancer cell apoptosis by decreasing DNA-methyltransferase 3B. **Chin Med J**, v. 125, n. 18, p. 3273-8, 2012.

LV, Z. D.; LIU, X. P.; ZHAO, W. J.; DONG, Q.; LI, F. N.; WANG, H. B.; KONG, B. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 6, p. 2818-2824, 2014.

- MA, Z.; HADDADI, A.; MOLAVI, O.; LAVASANIFAR, A.; LAI, R.; SAMUEL, J. Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization, stabilization, and controlled delivery of curcumin. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 86, n. 2, p. 300-310, 2008.
- MAHER, D. M.; BELL, M. C.; O'DONNELL, E. A.; GUPTA, B. K.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C.. Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, Rb, and PTPN13 proteins and inhibits benzo[a]pyrene-induced upregulation of HPV E7. **Mol Carcinog**, v. 50, n. 1, p. 47-57, 2011.
- MAMMAS, I. N.; SPANDIDOS, D. A.; SOURVINOS, G. Genomic diversity of human papillomaviruses (HPV) and clinical implications: An overview in adulthood and childhood. **Infect Genet Evol**, v. 21C, p. 220-226, 2014.
- MARTINS, A.; MIGNON, R.; BASTOS, M.; BATISTA, D.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M.; VIZETTO-DUARTE, C.; CUSTÓDIO, L.; VARELA, J.; RAUTER, A. P. In vitro antitumoral activity of compounds isolated from *Artemisia gorgonum* Webb. **Phytother Res**, v. 28, n. 9, p. 1329-1334, 2014.
- MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 595, p. 105-125, 2007.
- MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. Potential applications of curcumin and its novel synthetic analogs and nanotechnology-based formulations in cancer prevention and therapy. **Chin Med**, v. 6, n. 31, 2011.
- MISHRA, A.; KUMAR, R.; TYAGI, A.; KOHAAR, I.; HEDAU, S.; BHARTI, A. C.; SARKER, S.; DEY, D.; SALUJA, D.; DAS, B. Curcumin modulates cellular AP-1, NF-kB, and HPV16 E6 proteins in oral cancer. **Ecancermedicalsecience**, p. 1-12, 2015.
- MOHAMMAD, R. M.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.; HSU, H. Y.; LIN, L. T.; SIEGELIN, M. D.; FIMOIGNARI, C.; KUMAR, N. B.; DOU, Q. P.; YANG, H.; SAMADI, A. K.; RUSSO, G. L.; SPAGNUOLO, C.; RAY, S. K.; CHAKRABARTI, M.; MORRE, J. D.; COLEY, H. M.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S. S.; HELFERICH, W. G.; YANG, X.; BOOSANI, C. S.; GUHA, G.; BHAKTA, D.; CIRIOLO, M. R.; AQUILANO, K.; CHEN, S.; MOHAMMED, S. I.; KEITH, W. N.; BILSLAND, A.; HALICKA, D.; NOWSHEEN, S.; AZMI, A. S. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Semin Cancer Biol**, suppl. S78-S103, 2015.
- MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-60, 2010.
- NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci**, v. 98, n. 10, p.1505-1511, 2007.
- NEVES, D.; CAMARA, G. N. L.; ALENCAR, T. R.; CRUZ, M. R.; MARTINS, C. R. F.; CARVALHO, L. G. S. Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. **Clinical Urology**, v. 28, n. 3, p. 221-226, 2002.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23-28, 1976.

OHORI, H.; YAMAKOSHI, H.; TOMIZAWA, M.; SHIBUYA, M.; KAKUDO, Y.; TAKAHASHI, A.; TAKAHASHI, S.; KATO, S.; SUZUKI, T.; ISHIOKA, C.; IWABUCHI, Y.; SHIBATA, H. Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 10, p. 2563-2571, 2006.

PADHYE, S.; BANERJEE, S.; CHAVAN, D.; PANDYE, S.; SWAMY, K. V.; ALI, S.; LI, J.; DOU, Q. P.; SARKAR, F. H. Fluorocurcumins as cyclooxygenase-2 inhibitor: molecular docking, pharmacokinetics and tissue distribution in mice. **Pharm Res**, v. 26, n. 11, p. 2438-45, 2009.

PADHYE, S.; CHAVAN, D.; PANDEY, S.; DESHPANDE, J.; SWAMY, K. V.; SARKAR, F. H. Perspectives on chemopreventive and therapeutic potential of curcumin analogs in medicinal chemistry. **Mini Rev Med Chem**, v.10, n.5, p. 372-87, 2010.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 6, 2013.

PAULRAJ, F.; ABAS, F.; LAJIS, N. H.; OTHMAN, I.; HASSAN, S. S.; NAIDU, R.; The Curcumin Analogue 1,5-Bis(2-hydroxyphenyl) - 1, 4 - pentadiene - 3 - one Induces Apoptosis and Downregulates E6 and E7 Oncogene Expression in HPV16 and HPV18-Infected Cervical Cancer Cells. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11830-11860, 2015.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integr Biol (Camb)**, v. 3, n. 4, p. 279-296, 2011.

ROBOVA, H.; PLUTA, M.; HREHORCAK, M.; SKAPA, P.; ROB, L. High-dose density chemotherapy followed by simple trachelectomy: full-term pregnancy. **Int J Gynecol Cancer**, v. 18, n. 6, p. 1367-71, 2008.

ROOKE, J. Synthetic biology as a source of global health innovation. **Syst. Synth. Biol**, v. 7, n. 3, p. 67-72, 2013.

SAMAAN, N.; ZHONG, Q.; FERNANDEZ, J.; CHEN, G.; HUSSAIN, A. M.; ZHENG, S.; WANG, G.; CHEN, Q. H. Design, synthesis, and evaluation of novel heteroaromatic analogs of curcumin as anti-cancer agents. **Eur J Med Chem**, p. 123-131, 2014.

SANDUR, S. K.; DEORUKHKAR, A.; PANDEY, M. K.; PABÓN, A. M.; SHENTU, S.; GUHA, S.; AGGARWAL, B. B.; KRISHNAN, S. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible nf-kappab activity. **Int J of Radiat Oncol Biol Phys**, v. 75, n. 2, p. 534-542, 2009.

SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SUNG, B.; AHN, K. S.; MURAKAMI, A.; SETHI, G.; LIMTRAKUL, P.; BADMAEV, V.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-

inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8, p. 1765–1773, 2007.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–1136, 1990.

SCHWARTZ, S. HPV-16 RNA processing. **Front Biosci**, v. 13, p. 5880-91, 2008.

SELVENDIRAN, K.; AHMED, S.; DAYTON, A.; KUPPUSAMY, M. L.; TAZI, M.; BRATASZ, A.; TONG, L.; RIVERA, B. K.; KÁLAI, T.; K.; KUPPUSAMY, P. Safe and targeted anticancer efficacy of a novel class of antioxidant-conjugated difluorodiarlylidenyl piperidones: differential cytotoxicity in healthy and cancer cells. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 9, p. 1228-1235, 2010.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D. D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; KUMAR, M. N. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3-4, p. 223-230, 2009.

SHANMUGAM, M. K.; RANE, G.; KANCHI, M. M.; ARFUSO, F.; CHINNATHAMBI, A.; ZAYED, M. E.; ALHARBI, S. A.; TAN, B. K.; KUMAR, A. P.; SETHI, G. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2728-2769, 2015.

SHENG, Y.; ZOU, M.; WANG, Y.; LI, Q. 2',4'-dihydroxychalcone, a flavonoid isolated from *Herba oxytropis*, suppresses PC-3 human prostate cancer cell growth by induction of apoptosis. **Oncol Lett**, v. 10, n. 6, p. 3737-3741, 2015.

SHISHODIA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin: getting back to the roots. **Ann. N Y Acad. Sci**, n. 1056, p. 206–217, 2005.

SIMÕES; MARIOT. **Farmacognosia : da planta ao medicamento**. Florianópolis, SC; Rio Grande do Sul, RS.: Editora da UFSC ; Editora da UFRGS, p. 1102, 2003.

SINGH, M.; SINGH, N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. **Mol Cell Biochem**, v. 325, n. 1-2, p. 107-119, 2009.

STANLEY, M. A. Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 4, p. 681-91, 2012.

STEVAUX, O.; DYSON, N. J. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 684-691, 2002.

SULTANA, S.; ASIF, H. M.; NAZAR, H. M.; AKHTAR, N.; REHMAN, J. U.; REHMAN, R. U. Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 11, p. 4385-4394, 2014.

SUN, L.; LIU, J.; LIN, S. S.; SHI, W. T.; ZHU, J.; LIANG, G.; YUAN, S. T. Potent anti-angiogenic activity of B19--a mono-carbonyl analogue of curcumin. 2014.

SUN, M. Y.; CUI, K. J.; YU, M. M.; ZHANG, H.; PENG, X. L.; JIANG, H. Bax inhibiting peptide reduces apoptosis in neonatal rat hypoxic-ischemic brain damage. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 11, p. 14701-14708, 2015.

SYRJANEN S: Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol**, v. 32, S59-S66, 2005.

TALIS; HUIBREGTSE; HOWLEY. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. **J Biol Chem**, v. 273, n. 11, p. 6439-45, Mar 13 1998.

THAYYULLATHIL, F.; RAHMAN, A.; PALLICHANKANDY, S.; PATEL, M.; GALADARI, S. ROS-dependent prostate apoptosis response-4 (Par-4) up-regulation and ceramide generation are the prime signaling events associated with curcumin-induced autophagic cell death in human malignant glioma. **FEBS Open Bio**, v. 30, p. 763-776, 2014.

VICI, P.; MARIANI, L.; PIZZUTI, L.; SERGI, D.; DI LAURO, L.; VIZZA, E.; TOMAO, S.; MANCINI, E.; VINCENZONI, C.; BARBA, M.; MAUGERI-SACCÀ, M.; GIOVINAZZO, G.; VENUTI, A. Emerging Biological Treatments for Uterine Cervical Carcinoma. **J Cancer**, v. 5, n. 2, p. 86-97, 2014.

VILLA, L. L. Biology of genital human papillomaviruses. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, p. S3-S7, 2006.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314-322, 2011.

VYAS, A.; DANDAWATE, P.; PADHYE, S.; AHMAD, A.; SARKAR, F. Perspectives on new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 11, p. 2047-69, 2013.

WALSH, J. G.; CULLEN, S. P.; SHERIDAN, C.; LUTHI, A. U.; GERNER, C.; MARTIN, S. J. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n. 35, p. 12815–12819, 2008.

WANG, L.; WANG, J.; FANG, L.; ZHENG, Z.; ZHI, D.; WANG, S.; LI, S.; HO, C, T.; ZHAO, H. Anticancer activities of citrus peel polymethoxyflavones related to angiogenesis and others. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

WCR. World Cancer Report. International Agency for Research on Cancer. IARC, 2014. Disponível em <http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/index.php>. Acesso em 09/11/2015.

WEBSTER, M. R.; KAMAT, C.; CONNIS, N.; ZHAO, M.; WEERARATNA, A. T.; RUDEK, M. A.; HANN, C. L.; FREEL MEYERS, C. L. Bisphosphonamidate Clodronate Prodrug Exhibits Selective Cytotoxic Activity Against Melanoma Cell Lines. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 2, p. 297-306, 2014.

WEI, L.; MALHOTRA, S. V. Synthesis and cytotoxicity evaluation of novel pyrido[3,4-d]pyrimidine derivatives as potential anticancer agents. **Medchemcomm**, v. 3, n. 10, p. 1250-1257, 2012.

WHO. World Health Organization. Fact Sheet, nº 297, updated February 2015. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 09/11/2015.

WILKEN, R.; VEENA, M. S.; WANG, M. B.; SRIVATSAN, E. S. Curcumin: A review of anticancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Mol Cancer**, v. 10, n. 12, 2011.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Curcumin nanomedicine: a road to cancer therapeutics. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 11, p. 1994-2010, 2013.

YAN, C.; JAMALUDDIN, M. S.; AGGARWAL, B.; MYERS, J.; BOYD, D. D. Gene expression profiling identifies activating transcription factor 3 as a novel contributor to the proapoptotic effect of curcumin. **Mol. Cancer Ther**, v. 4, n. 2, p. 233-241, 2005.

YUAN, C. H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of Apoptotic Pathways by Human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and Implications for Therapy. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3831-50, 2012.

ZANDBERG D. P., BHARGAVA R., BADIN S.; CULLEN K. J. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 1, p. 57-81, 2013.

ZHANG, Y.; ZHAO, C.; HE, W.; WANG, Z.; FANG, Q.; XIAO, B.; LIU, Z.; LIANG, G.; YANG, S.
Discovery and evaluation of asymmetrical monocarbonyl analogs of curcumin as anti-inflammatory agents. **Drug Des Devel Ther**, v. 8, p. 373-382, 2014.

ZHANG, Y. P.; LI, Y. Q.; LV, Y. T.; WANG, J. M. Effect of curcumin on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of human melanoma A375 cells. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 1056-1067, 2015.

ZHAO, C. H.; XU, J.; ZHANG, Y. Q.; ZHAO, L. X.; FENG, B. Inhibition of Human Enterovirus 71 Replication by Pentacyclic Triterpenes and Their Novel Synthetic Derivatives. **Chem Pharm Bull**, v. 62, n. 8, p. 764-771, 2014.

ZHOU, G. Z.; XU, S. L.; SUN, G. C.; CHEN, X. B. Novel curcumin analogue IHCH exhibits potent anti-proliferative effects by inducing autophagy in A549 lung cancer cells. **Mol Med Rep**, v. 10, n. 1, p. 441-446, 2014.

ZLOTOGORSKI, A.; DAYAN, A.; DAYAN, D.; CHAUSHU, G.; SALO, T.; VERED, M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer - I: Curcumin. **Oral Oncol**, v. 49, n. 3, p. 187-91, 2013.

zur HAUSEN, H., Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura da autora