

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2018.



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).

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.; SÜLTMANN, 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.; FIMOGNARI, 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.