



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ELAINE RODRIGUES MELLO MONFRÉ**

**Avaliação dos Níveis de Citocinas e HLA-G Solúvel em  
Linhagens Celulares Tumerais de Colo Uterino  
Tratadas com Alcalóides de *Pterogyne nitens***

**ARARAQUARA-SP**

**2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ELAINE RODRIGUES MELLO MONFRÉ

**Avaliação dos níveis de citocinas e HLA-G solúvel em  
linhagens celulares tumorais de colo uterino tratadas  
com alcalóides de *Pterogyne nitens***

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

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

**ARARAQUARA-SP**

**2011**

### **Ficha Catalográfica**

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

**M742a**

Monfré, Elaine Rodrigues Mello

Avaliação dos níveis de citocinas e HLA-G solúvel em linhagens celulares tumorais de colo uterino tratadas com alcalóides de *Pterogyne nitens* / Elaine Rodrigues Mello Monfré. – Araraquara, 2011.

197 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Christiane Pienna Soares

1. Câncer cervical. 2. HPV. 3. *Pterogyne nitens*. 4. Citotoxicidade. 5. Citocinas. 6. HLA-G. 7. Quimioprevenção. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título

**CNPq: 550098/2009-7**

## TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DA AUTORA: Elaine Rodrigues Mello Monfré

TÍTULO DO TRABALHO: “Avaliação dos níveis de citocinas e HLA-G solúvel em linhagens celulares tumorais de colo uterino tratadas com alcalóides de *Pterogyne nitens*”.

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

PRESIDENTE E ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Christiane Pienna Soares

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

SEGUNDO EXAMINADOR: Dr<sup>a</sup>. Luisa Lina Villa

INSTITUIÇÃO: Instituto Ludwig Pesquisa sobre o Câncer, ILPC – São Paulo

TERCEIRO EXAMINADOR: Dr. Luis Octávio Regasini

INSTITUIÇÃO: Instituto de Química, UNESP - Araraquara

QUARTO EXAMINADOR: Dr<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zappone Carlos

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

QUINTO EXAMINADOR: Dr<sup>a</sup>. Dulce Helena Siqueira da Silva

INSTITUIÇÃO: Instituto de Química, UNESP - Araraquara

**Araraquara, 30 de Agosto de 2011**

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CNPq (nº550098/2009-7). Parte da pesquisa foi realizada em colaboração com Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Dor, sob orientação da Dr<sup>a</sup> Renata Delallibera-Joviliano da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

*Aos meus pais Jair de Mello e Neuza Ap. R. Mello que me auxiliaram a continuar com dedicação esta pesquisa, por toda compreensão, dedicação aos filhos, por terem lutado para eu chegar à universidade e por estarem sempre comigo... Esta é a nossa mais nova conquista!*

*À minha irmã e verdadeira amiga Patrícia C. R. Mello, pelo incentivo e carinho em todas as etapas desta busca pelo conhecimento.*

*Ao meu irmão Jair H. R. Mello, obrigada pela paciência, amor e por todo respeito.*

*Ao meu querido Thiago H. Monfré, por todo amor, ajuda, paciência e total apoio nessa caminhada para realização de um sonho... Obrigada por participar de todos os momentos da minha vida!*

**DEDICO ESTE TRABALHO**

## AGRADECIMENTOS

*Foram longos momentos de desafios e provações, porém momentos de intenso aprendizado e prazer. Meu grato reconhecimento:*

*À **Deus** por todas as bênçãos que iluminam minha vida.*

*À **Profª Dra. Christiane Pienna Soares** pela confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho e ainda, pelos ensinamentos, que com sua seriedade, tranquilidade e conhecimento, me guiaram para caminhos corretos e compensadores. Agradeço por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa. Muito obrigada...*

*À **Profª Drª. Renata Dellalibera-Joviliano**, por sempre estar disposta a transmitir seus valiosos ensinamentos e por me incentivar nesta longa caminhada. Meu estimado apreço pelo exemplo de docente, pesquisador e principalmente ao exemplo relacionado ao valor da vida...*

*Ao Instituto de Química - UNESP e aos professores integrantes do Projeto Temático Biota/Bioprospecta-Fapesp **Drª. Vanderlan Bolzani** e **Drª. Dulce Silva** pelo auxílio e incentivo durante a realização desta pesquisa, e seus orientados, em especial ao **Dr. Luis Octávio Regasini**, pela contribuição direta e essencial para o desenvolvimento desse estudo.*

*À **Drª. Iracilda Z. Carlos** em especial a sua pós-doutoranda **Daniela Maia** pela presteza na realização dos ensaios imunológicos...*

*Agradeço aos professores membros da banca de qualificação e defesa **Drª. Luisa Lina Villa**, **Drª. Janaina Crispim**, **Drª. Iracilda Z. Carlos**, **Dr. Eduardo Antônio Donadi**, **Drª. Carmen Lucia Bassi**, **Drª. Dulce Silva** e **Dr. Luis O. Regasini**, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito, pela contribuição e tempo despendido...*

Ao **Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular**, um lugar onde tudo pode acontecer. Nesses seis anos de laboratório, conheci pessoas incríveis, que com certeza ficarão guardadas no meu coração por toda a vida. Foi aqui que tive a satisfação de compartilhar os meus dias, minhas preocupações, minhas frustrações e principalmente minhas alegrias com todos. Agradeço a **Maria Isabel (Bel)**, que além de ser uma grande profissional, é uma pessoa maravilhosa, engraçada e franca. Tenho certeza que todos da Citologia contam com essa grande amiga pra todas as horas; à **Daniele** por me ajudar, acolher e ouvir. Por tudo que vivemos juntas desde a graduação até hoje, amiga verdadeira que quero sempre em minha vida, mesmo longe...; à **Tarsia**, por todos os conselhos e conversas sempre me incentivando; à **Aline** pela amizade, sinceridade, conhecimento e sugestões sempre muito oportunas; à **Juliana** por toda tranquilidade, companheirismo e carinho sempre me apoiando; à **Thais** por seu entusiasmo e alegria; ao **Mauro** pela atenção, colaboração e disposição em ensinar; ao **Felipe** pela imensa dedicação em aprender e ajudar, além de sua amizade e alegria contagiante. Obrigada também, aos queridos amigos que passaram pelo laboratório, e que com certeza me deixaram grandes ensinamentos: **Belzinha, Naiara, Maísa, Roberta e Camila**; aos estagiários **Rochane** pela grande amizade e dedicação em aprender e **Letícia** pela tranquilidade e disposição. À nova geração da Citologia com a **Profª Drª. Valéria, Rodolfo, Bruna e Luis**. Enfim, agradeço a todos, porque todos participaram desse trabalho, seja diretamente ou indiretamente.

À **Pamela Alegranci e Gabriela Bettio**, pela amizade, compreensão, ensinamentos, por estarem sempre solícitas quando necessário, e principalmente pela humildade em lidar com as pessoas. Admiro pessoas como vocês...

Aos meus colegas de Departamento: **Eliana** da Secretaria, **Marisa** da Imuno, **Rô** da Mico e **Rosemira**. Obrigada pela contribuição, convivência e principalmente pelas boas risadas.

Ao pessoal da Pós-Graduação: **Cláudia, Sônia, Laura, Ângela e Márcia**, pelo apoio técnico para a realização deste trabalho e a todos os professores e funcionários desta instituição.



*Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto.*

***Muito Obrigada!!!***

***"Unir-se é um bom começo; manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é uma vitória."***

*Henry Ford*

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	I
LISTA DE TABELAS .....	III
LISTA DE FIGURAS .....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	VI
RESUMO .....	X
ABSTRACT .....	XI
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
2.1. Produtos naturais e o câncer .....	8
2.2. <i>Pterogyne nitens</i> .....	11
2.3. Câncer de colo uterino e o Papilomavirus Humano (HPV).....	13
2.4. Papilomavírus Humano (HPV) .....	15
2.5. Ciclo de vida do HPV .....	19
2.6. Sistema imunológico e o HPV .....	23
2.7. Complexo de histocompatibilidade principal (CHP).....	25
2.8. Gene e moléculas do HLA-G.....	27
2.9. HLA-G e Câncer .....	29
2.10. Produtos naturais e quimioprevenção .....	31
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1. Objetivos gerais .....	35
3.2. Objetivos específicos .....	35
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1. Extração e preparação das substâncias puras (REGASINI <i>et al.</i> , 2009) .....	38
4.2. Cultura de células.....	38
4.3. Tratamento das linhagens .....	40
4.4. Ensaio de citotoxicidade (MTT) .....	40

4.5. Determinação da aumento/diminuição das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 por ELISA.....	41
4.6. Determinação da expressão da molécula HLA-G por ELISA .....	43
4.7. Ensaio de quinona redutase.....	44
4.7.1. Reagentes .....	44
4.7.2. Quantificação da atividade de quinona redutase .....	44
4.8. Análise estatística.....	45
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1. Avaliação da viabilidade celular .....	48
5.2. Determinação do perfil de variação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 por ELISA.....	55
5.3. Avaliação do perfil de expressão da molécula sHLA-G.....	61
5.4. Quantificação da atividade de quinona-redutase .....	64
<b>VI. DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>VII. CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>124</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO 1.....</b>	<b>125</b>
“Cytotoxic assessment of alkaloids isolated of <i>Pterogyne nitens</i> in several cancer and non-cancer human cell lines”.	
<b>ARTIGO CIENTÍFICO 2.....</b>	<b>148</b>
“Alkaloids from <i>Pterogyne nitens</i> promote modulation of Th1/Th2 cytokines and antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer”.	

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Característica das regiões gênicas do Papilomavírus Humano e suas principais funções no hospedeiro .....	18
<b>Tabela 2.</b> Determinação da atividade citotóxica da substância isolada pteroginina através da técnica de MTT no tratamento de 24 horas ( $t_0$ ) e no tratamento de 24 horas, seguidos de recuperação em 24 horas ( $t_{24}$ ) .....	53
<b>Tabela 3.</b> Determinação da atividade citotóxica da substância isolada pteroginidina através da técnica de MTT no tratamento de 24 horas ( $t_0$ ) e no tratamento de 24 horas, seguidos de recuperação em 24 horas ( $t_{24}$ ).....	53
<b>Tabela 4.</b> Análise comparativa da variação de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6, após tratamento com pteroginina.....	60
<b>Tabela 5.</b> Análise comparativa da variação de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6, após tratamento com pteroginidina .....	60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta <i>Pterogyne nitens</i> em seu habitat. (A) Árvore completa. (B) Detalhe das folhas .....	12
<b>Figura 2.</b> Estrutura química dos alcalóides guanidínicos isolados de <i>Pterogyne nitens</i> . (A) pteroginina e (B) pteroginidina .....	13
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do capsídeo e do genoma viral do HPV-16 .....	16
<b>Figura 4.</b> O ciclo viral do Papilomavírus Humano (HPV).....	20
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do transcrito primário de HLA-G .....	28
<b>Figura 6.</b> Princípio do ensaio da quinona redutase.....	32
<b>Figura 7.</b> Ensaio de citotoxicidade (MTT) com substância pteroginina ( $t_0$ e $t_{24}$ ), entre as linhagens SiHa, HeLa, C33A e HaCaT.....	51
<b>Figura 8.</b> Ensaio de citotoxicidade (MTT), com substância pteroginidina ( $t_0$ e $t_{24}$ ), entre as linhagens SiHa, HeLa, C33A e HaCaT.....	52
<b>Figura 9.</b> Ensaio de ELISA. Correlação entre as citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 na linhagem HaCaT (A), HeLa (B), SiHa (C) e C33A (D) tratadas e não tratadas com pteroginina .....	58
<b>Figura 10.</b> Ensaio de ELISA Correlação entre as citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 na linhagem HaCaT (A), HeLa (B), SiHa (C) e C33A (D) tratadas e não tratadas com pteroginidina.....	59
<b>Figura 11</b> Níveis de sHLA-G pelo ensaio de ELISA com as linhagens SiHa, HeLa, C33A, HaCaT e JEG-3 tratadas com pteroginidina. Viabilidade celular pelo método de MTT utilizando tratamento com pteroginidina .....	63
<b>Figura 12.</b> Indução da enzima quinona redutase em células de hepatocarcinoma murino Hepal1c7 pelo composto pteroginidina (A) e pteroginidina (B) em relação com sobrevivência celular (%) pelo ensaio de violeta cristal tratadas por 24h.....	66

**Figura 13.** Indução da enzima quinona redutase em células de hepatocarcinoma murino mutantes TAOc1BPr1 pelo composto pteroginina (A) e pteroginidina (B) e relação com sobrevivência celular (%) pelo ensaio de violeta cristal tratadas por 24h.....67

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  - Beta

$\gamma$  - Gama

% - Porcento

°C - Grau Celsius

$\alpha$ -MEM - Alfa Modification of Eagle Medium

AhR - Receptor de Aril-hidrocarbonetos

AINE - Antiinflamatório não esteroideal.

ANOVA - Análise de Variância

ARE - Elemento de Resposta Antioxidante

APCs - Células Apresentadoras de Antígeno

ATCC- American Type Culture Collection

ATV - Associação de Tripsina e Versene

BNF -  $\beta$ -Naftoflavona

CD4 - Cluster of Differentiation 4

CD8 - Cluster of Differentiation 8

CHP - Complexo de Histocompatibilidade Principal

CI<sub>50</sub> - Concentração Inibitória para 50% de células

CN - Controle Negativo

COX-1 - Ciclooxygenase 1

COX-2 - Ciclooxygenase 2

CP - Controle Positivo

CV - Cristal Violeta



DBF - Dibenzilfluoresceína

DMEM - Dulbecco Modification of Eagle Medium

DMSO - Dimetilsufóxido

DNA - Ácido Desoxiribonucléico

DPPH - 2,2-difenil 1-picrilhidrazil

E- Early

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EP - Erro Padrão

G6PDH - Enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

HIF 1 $\alpha$  - Fator Indutor de Hipóxia 1-Alfa

HLA-G - Histocompatibility Leukocyte Antigen - G

HPV - Papilomavírus Humano

IFN  $\gamma$  - Interferon *gama*

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleuciana

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 *beta*

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

ILPC - Instituto Ludwig Pesquisa sobre o Câncer

INCA - Instituto Nacional do Câncer

L - Late

LCR - Long Control Region

M - Molar

mM - Milimolar

MHC - Major Histocompatibility Complex

MPO - Mieloperoxidase

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

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido Oxidase

NF-kB - Fator Nuclear Kappa B

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical

NK - Células Natural Killer

nm - Nanômetro

ORF - Open Reading Frame

p53 - Proteína 53

Pb - Pares de base

pRB - Proteína do Retinoblastoma

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato

PBS-T - Solução Salina Tamponada com Fosfato contendo 0,05% de Tween-20

PBS-FBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato contendo 10% Soro Fetal Bovino

PKA - proteína Quinase A

QR - Quinona Redutase

RNAm - Ácido Ribonucleico mensageiro

SFB - Soro Fetal Bovino

STAT - Transductor de Sinal e Ativador da Transcrição

Th1 - Linfócitos T auxiliares tipo 1

Th2 - Linfócitos T auxiliares tipo 2

TNF  $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral *alfa*

TPCK - *N*-tosil-fenilalaninil-clorometilcetona

UV - Ultravioleta

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{M}$  - Micromolar

WHO - World Human Organization

## RESUMO

O câncer cervical é um problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento representando 12% de todos os tipos de neoplasias malignas que acometem as mulheres, configurando a segunda neoplasia ginecológica mais freqüente no mundo. Estudos epidemiológicos e moleculares demonstram a forte associação entre a etiologia do câncer cervical associado à infecção pelo HPV, especialmente para os tipos de alto risco oncogênico (HP-V16 e HPV-18). A cancerologia experimental, utilizando cultura de células, é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos cervicais. Alguns fármacos usados na quimioterapia são oriundas de espécies vegetais ou derivadas de um protótipo natural. Os produtos naturais têm contribuído intensamente para o desenvolvimento da terapêutica moderna. A quimioprevenção envolve o uso de substâncias naturais ou sintéticas para reduzir o risco de desenvolvimento de câncer. Por esta razão, o presente estudo foi inserido no Projeto de Bioprospecção BIOTA-FAPESP para a avaliação de dois compostos isolados da planta *Pterogyne nitens*, uma planta com conhecida atividade citotóxica, antioxidante e antifúngica que está distribuída do sudeste ao sul do Brasil, principalmente na Mata Atlântica e no Cerrado. No presente estudo, o potencial inflamatório, antitumoral e quimiopreventor de pteroginina e pteroginidina foram estudados em cultura de células normais e tumorais de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A), queratinócito normal de pele (HaCaT), corioncarcinoma (JEG-3), hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) e hepatocarcinoma murino mutado (TAOc1BPr1). Portanto foram realizados ensaios de citotoxicidade por MTT, de determinação de citocinas: IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por ELISA, da atividade antitumoral com molécula sHLA-G por ELISA e de quimioprevenção com quinona redutase (QR). Os resultados demonstraram que ambos os alcalóides exibem atividade citotóxica concentração-dependente em linhagens de carcinoma cervical (HeLa e SiHa e C33A), bem como em células normais de epitélio humano (HaCaT) com valores de  $CI_{50}$  na faixa de 0,612 a 2,5 mM. Os resultados ainda demonstraram significativa atividade de resposta inflamatória estimulando IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Th1) associado à inibição dos níveis de IL-4 (Th2) e ainda IL-6. Além disso, após o tratamento com pteroginidina observou-se significativa redução ( $p < 0,001$ ) da concentração de sHLA-G em condições não citotóxicas (0,312 e 0,625 mM) na linhagem JEG-3, em relação ao controle não-tratado. Ainda, foi observada duplicação da atividade da enzima quinona redutase após tratamento com pteroginina, com  $IR = 2,9 \pm 0,7$  ( $p < 0,001$ ) e para pteroginidina com  $IR = 2,5 \pm 0,8$  ( $p < 0,001$ ) sem, contudo causar toxicidade celular. Nenhuma indução foi observada nas maiores concentrações, uma vez que houve baixa viabilidade celular. Resultados semelhantes foram obtidos após o ensaio de quinona redutase para a linhagem mutante, sugerindo que ambos compostos possuem característica enzimática monofuncional. Os alcalóides isolados de *P. nitens* demonstram-se promissores, uma vez que em doses não citotóxicas foi capaz de imunomodular citocinas e HLA-G promovendo quimioprevenção, balanço este essencial para sua potencial aplicabilidade como agente imunomodulador e quimiopreventor.

**Palavras-chave:** câncer cervical, HPV, alcalóides, citotoxicidade, citocinas, HLA-G, quimioprevenção.

## ABSTRACT

Cervical cancer is a public health problem worldwide, mainly in developing countries, representing 12% of all types of malignancies that affect women, and the second common gynecologic malignancy in the world. Molecular and epidemiological research showed a strong association between infection, with HPV, especially high-risk HPV, and the etiology and progression of cervical cancer. Cell culture based on experimental oncology is valuable for study of various features of neoplastic processes. Several drugs used in chemotherapy were isolated from plants species or derived from a natural prototype. Natural products have contributed to the development of modern therapeutics. Chemoprevention involves the use of natural or synthetic substances to reduce the risk of developing cancer. Thus, this study, Bioprospecting Project BIOTA-FAPESP was aimed at assessing two compounds from *Pterogyne nitens*, a plant with known antiinflammatory and antioxidant activities, is distributed from southeast to southern Brazil, mainly in the Forest Atlantic and Cerrado biomes. The anti-inflammatory, antitumor and quimiopreventor potentials of the compounds pterogynine and pterogynidine was studied in normal and tumor cell lines: cervical cancer (HeLa, SiHa and C33A), normal skin keratinocytes (HaCaT), chorioncarcinoma (JEG-3), murine hepatocellular carcinoma (Hepa 1c1c7) and mutated murine hepatocellular carcinoma (TAOc1BPr1). These compounds were assesmet for of cytotoxicity (MTT), determination of inflammatory cytokines IL1- $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (ELISA), antitumor activity with sHLA-G molecule (ELISA) and chemoprevention with quinone reductase (QR). The results showed that both tested compounds exhibited high concentration-dependent cytotoxicity to the three cervical carcinoma cell lines infected with HPV, as well as to normal human epithelium cells with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.612 to 2.5 mM. The results also show significant inflammatory activity in inhibit levels of cytokines Th2 eg.: IL-4, and also IL-6, while stimulated levels of cytokines Th1 eg.: IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  concentration-dependent. Furthermore, in the sHLA-G test, there was a dose-dependent in pterogynidine the JEG-3 cell line, whereas lower concentrations (0.312 and 0.625 mM) decreased the concentration of sHLA-G relative to untreated cells ( $p < 0.001$ ). QR activity was enhanced after treatment with pterogynine  $2.9 \pm 0.7$  ( $p < 0.001$ ), and pterogynidine  $2.5 \pm 0.8$  ( $p < 0.001$ ), at non cytotoxic levels. Induction was not observed at higher concentrations, since there was low cell viability. Similar results were obtained after the assay of quinone reductase in the mutant cell line, suggesting that both compounds have a characteristic monofunctional effect on the enzyme. From these intracellular responses, the alkaloids from *P. nitens* have been to be promising, since in non-cytotoxic concentrations they were was able to stimulated the immune system and promote chemoprevention, an essential balance for their immunomodulatory and chemoprevention drugs.

**Keywords:** cervical cancer, HPV, alkaloids, cytotoxicity, cytokines, HLA-G, chemoprevention.

# CAPÍTULO I

---

## I. INTRODUÇÃO

---

O Brasil tem quase um terço da flora mundial com uma biodiversidade exuberante, estimada em cerca de 20% do número total de plantas do planeta. Essa grande biodiversidade se distribui em diferentes regiões como a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. O Cerrado compreende 25% do território brasileiro e se caracteriza pela baixa fertilidade do solo e predomínio de uma longa estação seca, que condicionam o desenvolvimento de um tipo peculiar de vegetação, muito atraente pela riqueza em espécies medicinais e pela beleza dos aspectos estéticos que apresenta (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997). A grande diversidade de espécies presentes nesse ecossistema fornece material para a realização de estudos especializados na procura de novas drogas para diferentes doenças, entre elas o câncer.

Os produtos naturais possuem um papel altamente significativo no desenvolvimento de novos fármacos. Especificamente no caso de doenças infecciosas e do câncer, estima-se que mais de 50% dos fármacos atualmente empregados no tratamento são derivados de fontes naturais (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; CRAGG; NEWMAN, 2005). No geral, foi estimado que mais de um terço dos fármacos atualmente comercializados estão relacionadas a produtos naturais e os princípios ativos provêm de uma ampla variedade de fontes naturais, incluindo: vegetais, o produtos marinhos e microrganismos (VAN ELSWIJK & IRTH, 2003).

Esse imenso patrimônio genético de fontes naturais, já escasso em países desenvolvidos tem na atualidade valor econômico estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade. A razão dessa afirmação é facilmente comprovada quando se analisa o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997). Por outro lado, estudos prévios



demonstram que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em ensaios biológicos. Aproximadamente 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais e tóxicas (POTTERAT & HOSTETTMANN, 1995).

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos a partir de extratos vegetais ainda é considerado pouco explorado. Atualmente, estima-se que das 300 mil espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos. Estima-se também que 70% das plantas existentes no planeta estão presentes em apenas 11 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Peru e Congo (NOGUEIRA; CERQUEIRA; SOARES, 2010). O Instituto Nacional do Câncer dos EUA estudou cerca de 30 mil amostras entre 1960 e 1982, resultando em 23 substâncias ativas, porém ainda existem cerca de 20 mil extratos que deverão ser submetidos a testes de avaliação da atividade antitumoral (HAMBURGUER; MARSTON; HOSTETTMANN, 1991; CRAAG *et al.*, 1994).

O uso da Fitoterapia na prática médica continua crescendo visivelmente ao longo dos anos para tratar diversas enfermidades, inclusive o câncer. Frente a esse crescimento, é perceptível em nosso país que não somente a população, mas também profissionais da saúde carecem de informações seguras sobre os recursos fitoterápicos. Baseada apenas na chamada sabedoria popular sobre os benefícios dos fitoterápicos, inúmeras pessoas utilizam as plantas para o tratamento de doenças desconhecendo seus riscos, o que torna os estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos indispensáveis para a proteção à saúde da população, bem como para comprovar cientificamente a eficácia terapêutica desses produtos. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial, entretanto se apresenta como um

problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos, as possíveis adulterações e toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas), dos fitomedicamentos ocorrem comumente (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Considerando a diversidade vegetal do Brasil e a pequena porcentagem de espécies de plantas investigada, tanto do ponto de vista fitoquímico, como farmacológico e toxicológico, o reino vegetal apresenta um enorme reservatório de substâncias farmacologicamente ativas a serem descobertas (HAMBURGUER; MARSTON; HOSTETTMANN, 1991; POTTERAT *et al.*, 1995; (NOGUEIRA; CERQUEIRA; SOARES, 2010). A quantidade de estudos utilizando produtos naturais na área da quimioterapia do câncer é intenso, uma vez que 74% dos compostos antitumorais são originados de produtos naturais ou derivados (TAN *et al.*, 2006). Muitos desses produtos naturais são capazes de alterar o metabolismo de carcinógenos através da indução de enzimas microssomais envolvidas na detoxificação do organismo. A carcinogênese, portanto, pode ser evitada por uma série de compostos de diferentes classes como flavonóides, alcalóides, cumarinas, tiocarbamatos, fenólicos e isotiocianatos que podem agir como agentes quimiopreventivos do câncer, uma vez que podem prevenir, suprimir ou reverter o processo de carcinogênese através da ingestão de compostos na dieta ou fármacos (SONG *et al.*, 1999).

A inflamação excessiva é considerada um fator crítico em muitas doenças humanas, incluindo o câncer, a obesidade, o diabetes tipo II, as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e até mesmo o envelhecimento (AGGARWAL *et al.*, 2006; SANTAGELO, 2007; KUNDU; SURH, 2008; SGAMBATO; CITTADINI, 2010). Estudos prévios apontam para um potencial uso de compostos de origem natural no tratamento da inflamação. Gossiau *et al.* (2011) acreditam que a utilização de compostos obtidos de planta, seria uma estratégia na modulação da expressão de

importantes mediadores inflamatórios. Esses compostos imunomoduladores de origem vegetal poderiam oferecer abordagem moderna no tratamento de diversas doenças, possibilitando a regulação de moléculas mensageiras, alterando mecanismos intrínsecos celulares (SPELMAN *et al.*, 2006; PAUL; GOHIL; BUTHANI, 2006). Nesse sentido, é importante observar que a modulação de moléculas e citocinas antiinflamatórias podem garantir uma resposta imunológica eficiente contra diversas doenças, incluindo o câncer (SPELMAN 2006; AGGARWAL *et al.*, 2006; GOSSLAU *et al.*, 2011).

Há uma correlação direta entre resposta imunológica e inflamação. Uma atividade inflamatória de curta duração geralmente traz benefícios para organismo do hospedeiro na presença de agentes agressores, contudo a persistência do processo inflamatório frequentemente resulta em dano tecidual e de DNA, contribuindo para acionar diversos mecanismos celulares, que desregularão a homeostase, podendo ocasionar o desenvolvimento do câncer (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006). Uma vez que a inflamação crônica promove e potencializa o desenvolvimento, crescimento e progressão tumoral, estudos são direcionados ao desenvolvimento de compostos terapêuticos moduladores e antitumorais de origem natural na tentativa de controlar o microambiente inflamatório (GOSSLAU *et al.*, 2011).

---

## **II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2.1. Produtos naturais e o câncer

O câncer é uma doença, cujas células possuem um acúmulo progressivo de mutações de seu genoma, resultando na proliferação desordenada. As mutações fazem com que as células que antes executavam um programa de ciclo celular bem definido, associado às suas funções em seu tecido de origem, cresçam de maneira descontrolada. Esse crescimento alterado é consequência não só da duplicação celular desordenada, mas também da progressiva resistência à morte celular (SGAMBATO; CITTADINI, 2010). Além disso, as células cancerosas desrespeitam fronteiras dos tecidos de origem, adquirem a capacidade de modificar o ambiente que as cerca, podendo migrar pelos diversos tecidos do corpo e estabelecer tumores secundários à distância, processo denominado de metástase. A capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de formar as metástases é responsável em última análise, pela morte de dois a cada três pacientes com diagnóstico de câncer (OTAKE; CHAMMAS; ZATS, 2006).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo mundo, estimando-se que 84 milhões de pessoas irão morrer de câncer entre 2005 e 2015 (WHO, 2011). No Brasil, as doenças tumorais vêm sendo indicadas como a terceira causa *mortis* mais freqüente. Assim as doenças cardiovasculares e o câncer, são conjuntamente responsáveis por 73% dos óbitos (MACHADO; MELLO-JUNIOR, 2009).

As células tumorais na maioria das vezes são refratárias ao tratamento convencional (quimioterapia e radioterapia) e diversos estudos têm procurado identificar novos fármacos antitumorais sintéticos ou oriundos de produtos naturais (SGAMBATO; CITTADINI, 2010; GOSSLAU *et al.*, 2011). *Revisão Bibliográfica*

Os produtos naturais são amplamente utilizados no tratamento do câncer (HARTWELL 1982). A mais antiga terapia antitumoral que se tem conhecimento foi

realizada com alcalóides Vinca, incluindo vimblastina e vincristina isoladas da planta *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), cujo isolamento introduziu uma nova era de uso de plantas medicinais contra o câncer. A descoberta do paclitaxel das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) é outra evidencia de sucesso de fármacos originados de produtos naturais ativos contra câncer de ovário, câncer avançado de mama e pulmão (ROWINSKY *et al*, 1992; CRAGG; NEWMAM, 2005).

Em 1996, Wall e colaboradores relataram, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata* (OBERLIES & KROLL 2004). Quase 15 anos depois, o único mecanismo de ação para este potente agente citotóxico foi a inibição da topoisomerase I. Apesar disso, essa substância não se mostrou adequada para o desenvolvimento de um produto farmacêutico, principalmente por sua reduzida hidrossolubilidade. Estudos envolvendo triagem clínica não foram bem sucedidos, evidenciando inativação da substância por uma abertura do anel lactônico do seu sal sódico. Esta descoberta abriu caminho para a primeira geração de fármacos análogos da camptotecina, como o topotecano e o irinotecano, ambos solúveis em água, na forma de sais, preservando a subunidade iridídica farmacofórica, representado pelo anel lactônico hidrolizado, devido à introdução de grupos básicos em suas estruturas (MONTANARI & BOLZANI 2001; OBERLIES & KROLL 2004). Estas duas substâncias baseadas na estrutura da camptotecina foram aprovadas pelo “Food na Drug Administration” (FDA) dos EUA, em 1996, e atualmente são comercializadas GlaxoSmithKline e Pfizer respectivamente para câncer cólon e ovário (OBERLIES & KROLL 2004).

Epipodofilotoxina é um isômero da podofilotoxina, a qual foi isolada como agente antitumoral das raízes das espécies do gênero *Podophyllum*, incluindo *Podophyllum pelatum* e *Podophyllum emodi* (Berberidaceae) (STAHELIN 1973). Etoposídeo e teniposídeo são dois derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina e são usados nos tratamentos de linfomas, câncer brônquico e testicular (CRAGG & NEWMAM 2005; SHOEB 2006; HARVEY 2008). Considerando esses aspectos é obvio o espaço e a importância que os produtos naturais ocupam na indústria farmacêutica, seja pela sua própria natureza ou como fonte inspiradora de novos padrões estruturais bioativos para o tratamento do câncer. Atualmente, diversos estudos experimentais utilizando cultura celular (*in vitro*) e animais (*in vivo*), têm sido conduzidos para a avaliação de compostos potencialmente antitumorais. (OLIVEIRA-JUNIOR 2008).

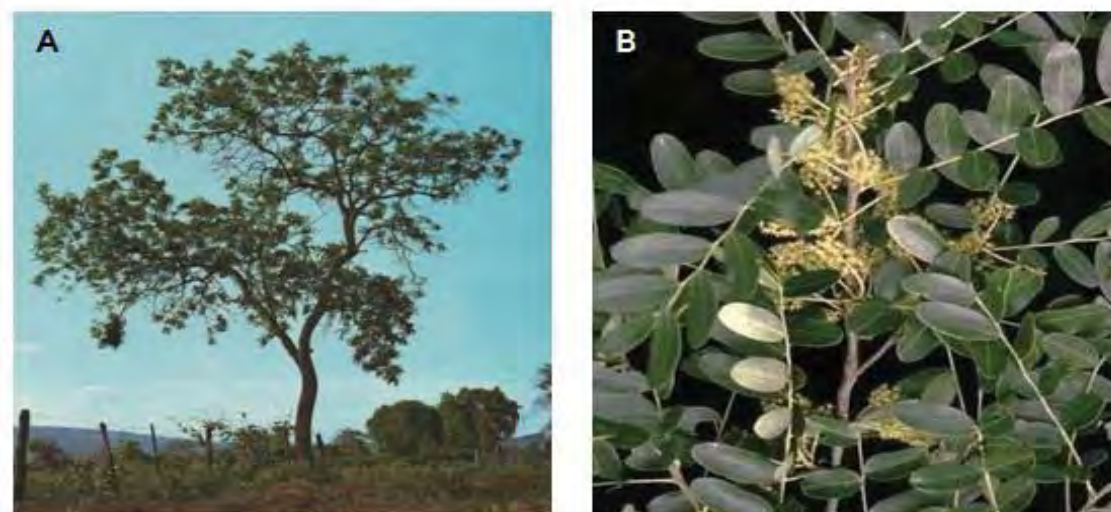
A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. Atualmente as linhagens de células tumorais podem ser obtidas pela “American Type Culture Collection” (ATCC). As células tumorais podem ser mantidas por meio de cultura celular (suspensão celular *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais este tumor pode ser implantado de duas maneiras: (1) células inoculadas na cavidade intraperitoneal, formando um tumor ascítico (“líquido”) enquanto (2) células neoplásicas inoculadas subcutaneamente formam tumores sólidos (OLIVEIRA-JUNIOR 2008). O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI & XU, 2006).

## 2.2. *Pterogyne nitens*

Entre as plantas brasileiras, *Pterogyne nitens* (Figura 1) pertence à família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae, sendo a única espécie do gênero e representa uma fonte de inúmeros flavonóides e alcalóides guanidínicos citotóxicos (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON 1995). Popularmente, é conhecida como amendoim, amendoim-bravo, viraró, madeira nova, pau-amendoim, óleo-branco e pau-de-fava (FERNANDES *et al.*, 2008). Apresenta-se como uma planta perene ereta, arbórea de folhas glabras, de 10-15 m de altura, nativa do Brasil, bem como de outros países na América Latina, incluindo Argentina, Bolívia e Paraguai. Propaga-se por sementes, contudo expande-se no local através de brotações de suas raízes, formando grandes reboleiras (REGASINI *et al.*, 2008a).

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





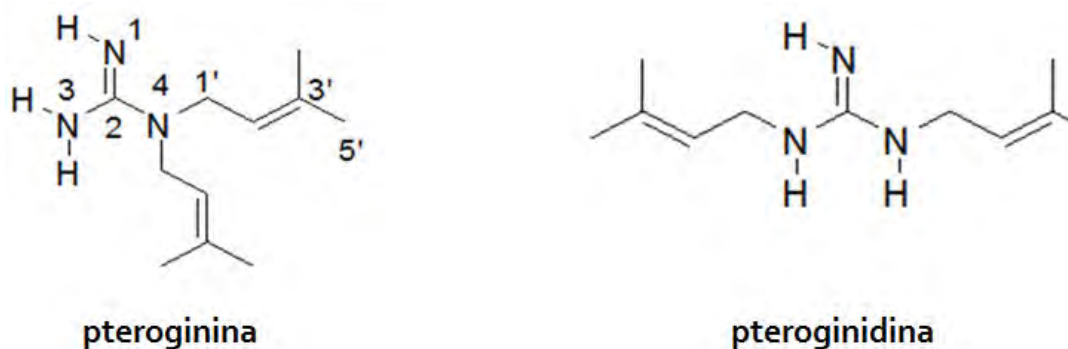
**Figura 1.** Planta *Pterogyne nitens* em seu habitat. (A) Árvore completa. (B) Detalhe das folhas e flores (LORENZI 2000).

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

Em trabalhos fitoquímicos anteriores, foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, os quais mostraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo uma potencial ação antitumoral dessas substâncias (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON 1995). Ainda, frações obtidas do extrato etanólico de *P. nitens* apresentaram atividade antioxidante (VELLOSA 2005) e antifúngica (REGASINI *et al.*, 2010).

Os alcalóides de *P. nitens* possuem estruturas muito similares apresentando um núcleo guanidínico central substituído por unidades hemiterpenoídicas.

A estrutura química dos alcalóides guanidínicos, pteroginidina e pteroginina (Figura 2) possuem grupamentos amina e imina. A pteroginidina apresenta padrão de substituição isoprenílica do tipo *N,N'*-diisoprenil o que confere menor polaridade e menor hidrossolubilidade em relação a pteroginina, cujo padrão de substituição é do tipo *N,N*-diisoprenil. (REGASINI *et al.*, 2008c)



**Figura 2.** Estrutura química dos alcalóides guanidínicos pteroginina e pteroginidina isolados de *Pterogyne nitens* (REGASINI *et al.*, 2009).

### 2.3. Câncer de colo uterino e o Papilomavírus Humano (HPV)

No Brasil, estima-se que o câncer do colo do útero seja a segunda neoplasia mais comum na população feminina, de acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer divulgada pelo INCA- Instituto Nacional de Câncer (INCA 2011). Segundo dados do Ministério da Saúde o número de casos novos de câncer de colo do útero esperados para o Brasil em 2010 são de 18.430, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. A incidência por câncer de colo de útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste, o câncer de colo do útero é a segunda neoplasia mais incidente com 21/100.000 mulheres, 20/100.000 mulheres e 18/100.000 mulheres, respectivamente. Já

na região sudeste, esse tipo de câncer representa o terceiro tipo de tumor maligno mais freqüente, com 16/100.000 mulheres. Nessa mesma previsão, desconsiderando o câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama e de colo do útero foram as neoplasias malignas de maior incidência na população feminina. (INCA 2011).

O câncer do colo uterino é uma doença causada por diversos fatores genéticos, ambientais e infecciosos, no qual o Papilomavírus Humano (HPV), esta implicado em 90% dos casos entre a população mundial. Aproximadamente 500.000 novos casos de câncer cervical são diagnosticados a cada ano, nos quais, 274.000 casos resultam em morte. Desses 500.000 casos, aproximadamente 80% ocorrem em países em desenvolvimento e estimativas atuais revelam que são esperados aumento de 90% dos casos até 2020 (MACIAS *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2001; BOSCH 2003; STANLEY 2003; ZUR HAUSEN 2009; D'ANDRILLI; BOVICELLI; GIORDANO 2010).

O HPV é um problema de saúde pública que afeta cerca de 10% da população mundial. A infecção pelo vírus é mais prevalente em países do Hemisfério Sul: Latino Americano, África e Índia, em que a população carece de recursos e atenção à saúde, tornando-se o principal foco da infecção viral que evolui para malignidade principalmente entre as mulheres (INCA 2011). A infecção por subtipos de alto risco oncogênico do papilomavírus humano (HPV-16, 18, 31, 33, 45, 58) está etiológicamente associado com a prospecção e o desenvolvimento de lesões malignas no colo uterino (ZUR HAUSEN 2009).

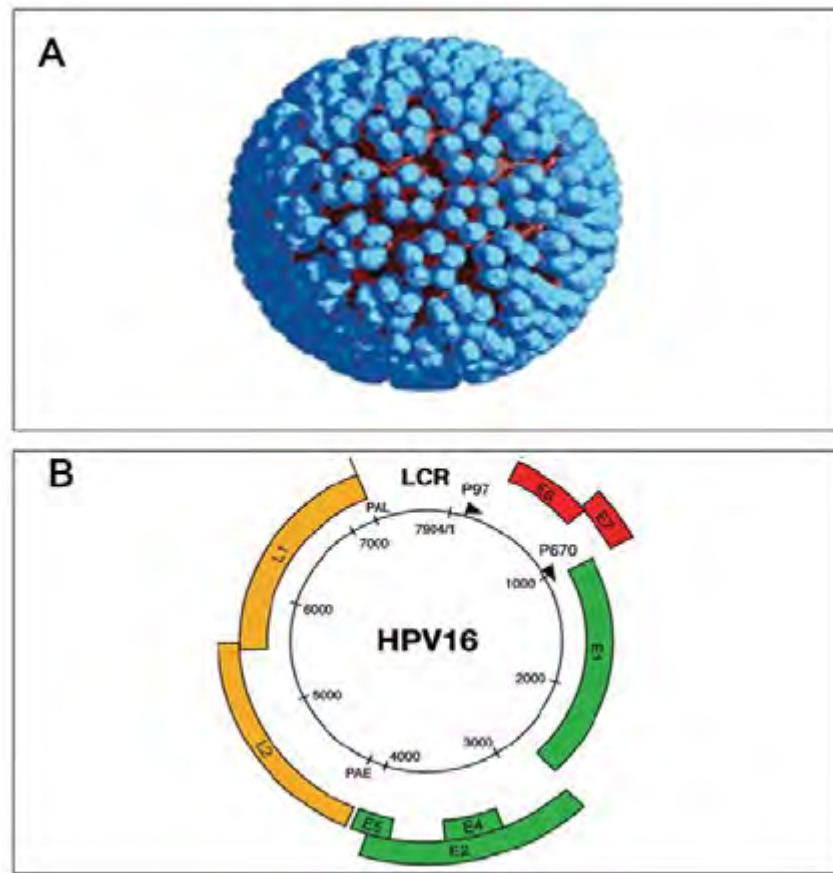
## 2.4. Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* do gênero *Papovavirus* identificado primeiramente por Strauss em 1949, sendo que desde então, este vem sendo isolado em inúmeras espécies animais. As partículas virais completas não são envelopadas, estas são envolvidas por um capsídeo composto por duas proteínas estruturais que se organizam em 72 subunidades (capsômeros), num arranjo icosaédrico. Este pequeno vírus com 55 nanômetros (nm) de diâmetro possui um genoma circular em dupla fita de DNA contendo aproximadamente 8.000 pares de base (pb) e peso molecular de  $5,2 \times 10^6$  Daltons (DELIGEOROGLOU *et al.*, 2009; ZUR HAUSEN 2009; HORVATH 2010).

O genoma do HPV (Figura 3) pode ser organizado em oito *Open Reading Frames* (ORFs) e pode ser dividido em dois domínios. A região não codificadora denominada *Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR) (KANODIA *et al.*, 2007; PSYRRI *et al.*, 2008) possui aproximadamente 1.000 pb e está localizada entre os genes L1 e o início da região E6 (Figura 3). Esta região não tem qualquer função codificadora protéica, mas ostenta a origem de replicação e região na quais importantes fatores de transcrição atuam na regulação da expressão de RNA polimerase II (ZHENG; BAKER 2006). Assim, a região LCR representa 15% do genoma viral e contém genes responsáveis pelo controle de replicação do HPV (SOUSA *et al.*, 1990; CHEAH & LOOI, 1998).

Um segundo domínio da partícula viral codifica as proteínas virais da região E (*early*) ou região precoce com aproximadamente 4.000 pb e a região L (*late*) ou região tardia com aproximadamente 3.000 pb que representam 45% e 40%, respectivamente,

do seu genoma (ZUR HAUSEN 2002; PSYRRI & DIMAIO 2008; ZUR HAUSEN 2009; HORVATH 2010).



**Figura 3.** Representação esquemática do capsídeo e do genoma viral do HPV-16. (A) Figura icosaédrica não envelopada de simetria pentagonal composta por 72 capsômeros (SPPV, 2011). (B) Representação esquemática do genoma do HPV-16, genes da região precoce (E), genes da região tardia (L) e a LCR, correspondente a região regulatória. As setas correspondem aos promotores responsáveis pela regulação da transcrição dos genes da região E e L (modificado de DOORBAR 2006).

Na Tabela 1 estão demonstrados os genes do HPV e a característica dessas regiões regulatórias. A região E (*early*) é constituída por oito genes (E1- E8), sendo que E3 e E8 ainda não têm função conhecida. Essa região codifica seis proteínas virais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, onde as proteínas E1, E2, E4 e E5 são recrutadas para replicação

de DNA e as proteínas E6 e E7 nos HPVs de alto risco são responsáveis pelo processo de transformação e imortalização celular. A região L (*late*) codifica duas proteínas estruturais (L1 e L2) necessárias para a formação do capsídeo viral, conseqüentemente para a produção de partículas virais. Além desta, existe uma região regulatória, contendo a origem de replicação viral que controla a transcrição dos genes da região E (TUNGTEAKKHUN & DUERKSEN-HUGHES 2008). Os genes L1 (proteína principal de 54 KDa) e L2 (proteína secundária L2 52 KDa) possuem sequência altamente conservada entre todos os tipos de HPV sendo responsáveis pela codificação de proteínas constituintes do capsídeo viral. (MUNGER & HOWLEY 2002; ZUR HAUSEN 2002; ZHENG; BAKER 2006; ZUR HAUSEN 2009; HORVATH 2010).

**Tabela 1.** Característica das regiões gênicas do Papilomavírus Humano e suas principais funções no hospedeiro.

Genes	Função Principal
<b>E6</b>	Ligação e degradação de p53, transformação celular.
<b>E7</b>	Ligação a retinoblastoma (pRB), desregulação da checagem do ciclo em G1/S, transformação celular; coopera com E6 para imortalização.
<b>E1</b>	Helicase, ATPase, essencial para replicação do DNA viral.
<b>E2</b>	Regulação da transcrição viral liga-se a E1 para facilitar início da replicação do DNA.
<b>E3/E8</b>	Função desconhecida.
<b>E4</b>	Ligação e desarranjo da citoqueratina.
<b>E5</b>	Transformação celular, interação com receptores do fator de crescimento.
<b>L1</b>	Proteína do capsídio viral.
<b>L2</b>	Proteína secundária do capsídeo viral.

Fonte: Adaptado STANLEY *et al.*, 2007.

Os HPVs são vírus epiteliotrópicos presentes na pele (cutaneotrófico) e mucosa (mucosotrófico) e nos seres humanos mais de 100 tipos já foram descritos (TUNGTEAKKHUN & DUERKSEN-HUGHES 2008). Os tipos de HPV encontrados com maior frequência no trato anogenital, aproximadamente 40 tipos virais, foram classificados por Muñoz *et al.*, (2003) segundo seu risco de malignidade na cérvix em: HPV de baixo risco, tipos virais que apresentam baixo potencial oncogênico (HPV 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 72, 74, e 81) e HPV de alto risco, com elevado potencial oncogênico (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68,73 e 82) (ZUR HAUSEN 2000; STANLEY 2002; MUÑOZ *et al.*, 2003; DOORBAR 2006; MADKAN *et al.*, 2007; ZUR HAUSEN 2009).



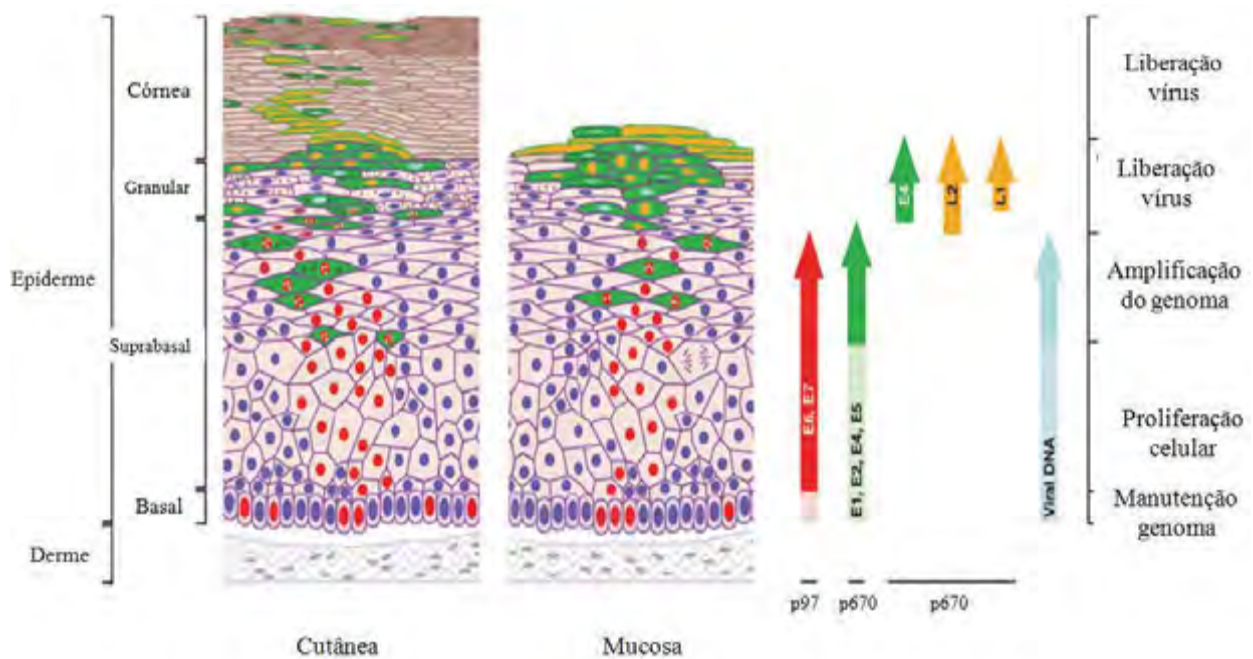
## 2.5. Ciclo de vida do HPV

A infecção pelo papilomavírus humano (Figura 4) exige a disponibilidade de células epiteliais da epiderme ou da mucosa que são capazes de proliferação, onde o ciclo de vida produtivo do vírus ocorre juntamente ao ciclo de diferenciação das células do hospedeiro infectado. A infecção inicial pelo HPV ocorre em células basais, uma única camada de células proliferativas indiferenciadas (STANLEY 2008).

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

O acesso às células basais acontece através de microlesões (Figura 2) causadas por diversas formas de trauma físico e pela interação com certos receptores como  $\alpha 6\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 4$  integrina (YOON *et al.*, 2001; PSYRRI *et al.*, 2008). Nas células infectadas da camada basal são sintetizados baixos níveis de DNA viral, formando aproximadamente 50 a 100 cópias episomais do genoma viral por célula (PETT & COLEMAN 2007). A infecção das células basais pelo HPV leva à ativação de uma cascata de expressão de genes virais que resulta na replicação de seu genoma, no entanto, a expressão destes genes é amplamente reprimida, existindo apenas uma limitada expressão de genes virais específicos da região precoce. Os primeiros genes virais a serem expressos são os fatores de replicação, E1 e E2 (Figura 4), que formam um complexo que se liga à origem de replicação e atua no sentido de recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias que mediam a replicação de DNA (CONGER *et al.*, 1999; STANLEY 2008).





**Figura 4.** O ciclo viral do Papilomavírus Humano (HPV). Através de microlesões o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio. Ao migrar para as camadas suprabasais os genes virais são ativados, o DNA do vírus é replicado e as proteínas do capsômero são sintetizadas. As partículas virais formadas são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outras células (modificado de DOORBAR 2006).

As proteínas E5, E6 e E7 possuem atividade estimulante de proliferação. A proteína E5 estimula o crescimento celular, que forma complexo com três tipos de receptores, sendo esses complexos com o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), o receptor de fator- $\beta$  de crescimento derivado de plaquetas ou o receptor de fator estimulante de colônia (HWANG *et al.*, 1995; KANODIA *et al.*, 2007). A E5 também foi indicada como uma proteína capaz de impedir a apoptose por danos no DNA (ZHENG & BAKER 2006).

As proteínas E6 e E7, independentemente, são capazes de imortalizar tipos celulares humanos em cultura de tecido, porém a eficiência é aumentada quando ambas

são expressas simultaneamente (McDOUGALL *et al.*, 1994; KANODIA *et al.*, 2007). Juntas, as expressões destas proteínas virais resultam no bloqueio de saída do ciclo de diferenciação celular e na proliferação reforçada das células infectadas contendo centenas de cópias do genoma do HPV pela célula (STANLEY 2008).

A segregação dos genes precoces permite a infecção das células da camada basal e estes genes podem ser mantidos na lesão durante um longo período. Juntamente com a cinética de migração das células-filhas infectadas para as camadas superiores do epitélio, os produtos virais dos genes tardios são produzidos para iniciar a fase epissomal ou fase vegetativa do ciclo de vida do HPV, resultando em um alto nível de amplificação do genoma viral (NARISAWA-SAITO & KIYONO 2007; STANLEY *et al.*, 2007). O período entre a infecção e o aparecimento da lesão pode variar de semana a meses, demonstrando a capacidade que o vírus tem de evadir-se do sistema imune (STANLEY 2008).

Tal como a replicação do DNA viral depende quase totalmente dos fatores de replicação do hospedeiro, exceto pela helicase E1, outros genes precoces (E5, E6 e E7) são responsáveis por coordenar um ambiente adequado na célula hospedeira para a replicação do DNA viral, o que por vezes induz a síntese de DNA celular e impede a apoptose (STANLEY 2008). As funções de E4 e E5 no processo de replicação não são inteiramente compreendidas, sabe-se que o gene E4 é expresso relativamente tarde no vírus e está envolvido na replicação, maturação e liberação das partículas virais e também tem relação íntima com a expressão de produtos associados ao colapso dos filamentos de citoqueratina celular, um efeito citopático conhecido como coilocitose (ZHENG & BAKER 2006; TORRENTE *et al.*, 2007).

Na sequência da entrada para a camada superficial das células, a expressão de genes virais tardios (L1 e L2) é iniciada e as proteínas estruturais são expressas (Figura 4). As proteínas tardias permitem a montagem dos capsídeos icosaédricos, que contêm o genoma viral e partículas virais maduras. Estas partículas virais são liberadas das camadas superficial epitélio quando as células já estão diferenciadas para infectar outra célula suscetível (LEDWABA *et al.*, 2004; ZHENG & BAKER 2006).

Devido à alta imunogenicidade dos vírions estas partículas são sintetizadas apenas nas camadas superficiais do epitélio escamoso estratificado, sendo então submetidas a uma imunovigilância relativamente limitada. Além disso, E6 e E7 inativam *interferons* (IFNs) e fatores regulatórios (IRF), a fim de que o vírus HPV permaneça no hospedeiro assintomaticamente (McCANCE 2005; DOORBAR 2006).

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

Nas lesões benignas (por exemplo, verrugas) o genoma do HPV está presente na sua forma epissomal, enquanto que em lesões malignas o genoma é tipicamente

integrado. Sugere-se que a integração do DNA pode alterar a expressão gênica viral (MADKAN *et al.*, 2007).

## 2.6. Sistema imunológico e HPV

A resposta imune do hospedeiro é fator determinante no processo de evolução da infecção viral e no desenvolvimento neoplásico. A frequência da infecção genital pelo HPV, bem como, a progressão para lesões displásicas ou mesmo o câncer é mais comumente observada em mulheres imunodeficientes, quando comparadas a mulheres imunocompetentes (PANTANOWITZ & MICHELOW 2010).

De que maneira a maioria dos indivíduos fica livre da infecção e outros persistem, ainda não estão bem explicados, porém o aumento e a persistência das lesões HPV induzidas em pacientes imunossuprimidos aponta para o envolvimento da imunidade celular do hospedeiro em resposta a infecção viral. A resposta imune inata e adquirida tem importante papel na defesa natural contra o HPV. A resposta inata é rapidamente induzida e não-específica, não gerando memória. Monócitos, macrófagos, células natural killers (NK) e células apresentadoras de antígenos (APCs) são os imunomoduladores operantes nesta resposta. As citocinas chaves para regulação da infecção são: interleucina 1 (IL-1), interferon (IFN) e fator de necrose tumoral (TNF). Estas moléculas ativam as células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas, que são sentinelas do hospedeiro e responsável pela inicio da imunidade adquirida. A resposta imune adquirida gera células efetoras antígeno-específicas, como as CD4 T-helper, as CD8 T-killer e as células B, que secretam anticorpo. O resultado final é que o patógeno ou a célula infectada pelo patógeno se torna marcada e células de

memória são formadas para prevenir ou limitar infecção subsequente pelo mesmo organismo (ROSENBLATT *et al.*, 2006)

Dentre os indivíduos infectados por HPV genital, cerca de 80 a 90% conseguem eliminar o vírus, e de 10 a 20% tornam HPV-DNA positivo e desenvolvem infecção persistente (STANLEY, 2008). A persistência viral está relacionada à resposta imune do hospedeiro, especialmente na ausência de resposta linfoproliferativa em resposta à infecção (UNG *et al.*, 1999). A resposta imune à infecção pelo HPV é pouco entendida, sendo assim postula-se que a resposta imune celular (Th1) seja prioritária em relação à resposta imune humoral (Th2). Ainda, a resposta imune do tipo Th1 pode gerar resposta específica dos linfócitos T citotóxicos, contribuindo para a eliminação da infecção e regressão das lesões infectadas pelos tipos de HPV de baixo risco (GONÇALVES *et al.*, 2004). Embora a resposta linfocitária específica possa ser encontrada no sangue periférico, a presença e a retenção de grande quantidade de linfócitos T citotóxicos são observadas, preferencialmente, no tumor cervical. Entretanto, não está definida a relação entre a resposta imune e a fisiopatologia da doença, nem mesmo o papel das oncoproteínas E7 com a persistência da infecção ou eliminação do HPV relacionado à regressão das neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) (UNG *et al.*, 1999).

A resposta imune contra o HPV de uma forma geral é mediada pela resposta imune celular a despeito de anticorpos da classe IgG e IgA contra frações antigênicas encontrados no muco cervical de pacientes com neoplasia cervical (GONÇALVES *et al.*, 2004). Infiltrado inflamatório composto de macrófagos e células CD4+ é observado em condilomas que regredem espontaneamente, e a resposta linfoproliferativa de células T CD4+ específica para o antígeno E2 demonstrou-se associada à eliminação do HPV. Por outro lado, células CD8+ específicas para os antígenos E6 e E7 são encontradas em

pacientes com grandes lesões ou com tumor cervical. Além disso, diminuição da resposta tipo Th1 com baixa produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é observada em pacientes com lesão intraepitelial de alto grau. Essas alterações configuram um mecanismo de evasão viral contra a célula T mediadora da resposta imune (KIM *et al.*, 1995). A expressão de IL-2 e IFN- $\gamma$  é freqüentemente observada nos estágios recentes dos tumores cervicais. Lesões pouco diferenciadas e aquelas com potencial metastático expressam mais IL-4 e IL10 e suprimem a expressão de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Aparentemente, nos estágios precoces do desenvolvimento do carcinoma de células escamosas ocorre uma polarização da expressão de citocinas do perfil Th1, enquanto que nos estágios avançados do tumor com acentuada capacidade metastática, a polarização se desvia para o perfil Th2 (AGARWAL *et al.*, 2003).

Recentes estudos na literatura demonstram a forte associação dos fatores imunológicos do hospedeiro e a progressão neoplásica relacionada à infecção pelo HPV. Entretanto, os mecanismos exatos responsáveis por essa resposta imune ineficiente contra lesões relacionadas aos diferentes tipos de HPV ainda não são totalmente conhecidos. Estes mecanismos podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico ou à composição genética do hospedeiro (FERNANDES *et al.*, 2005).

## **2.7. Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP)**

A família do Complexo de Histocompatibilidade Principal, (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) caracteriza-se por genes situados no braço curto do cromossomo 6, na região 6p21.3, com mais de 4 Mb de DNA. O *locus* foi identificado e nomeado pelo seu papel na rejeição de tecidos em transplantes alogênicos e também pelo fato de muitos dos genes contidos nessa região (> 10%) desempenharem

importantes funções imunológicas. Assim, o CHP consiste de antígenos de classe I (A, B, C, E, F e G), de classe II (DR, DQ e DP) e de classe III, estes últimos também desempenham importantes funções imunológicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER 1994). Os genes do CHP classe Ib estão intimamente relacionados com os genes do grupo Ia. Entre estes genes incluem-se os genes do antígeno leucocitário humano (HLA): HLA-E, HLA-F e HLA-G (VEIT & CHIES 2009). Tanto a resposta medida por células B (humoral), quanto a resposta mediada por células T (celular) são iniciadas por meio da interação dessas células com os produtos dos genes do CHP, motivo pelo qual essa molécula representa a linha de frente da resposta imune adaptativa contra doenças e patógenos invasores (RHODS & TROWSDALE 1999).

Os genes do CHP de classe I tiveram sua função originalmente descrita como a de apresentação de peptídeos antigênicos derivados de proteínas intracelulares para linfócitos T citotóxicos. De fato, esta função é desempenhada por alguns genes desta família de CHPs, como os HLAs A, B e C, chamados “clássicos” ou do grupo Ia. Tais genes têm a característica comum de serem altamente polimórficos amplamente expressos dentro do organismo humano e por direcionarem os linfócitos T citotóxicos para a eliminação de células infectadas por vírus ou outros patógenos intracelulares (RHODS & TROWSDALE 1999; RODGERS & COOK 2005).

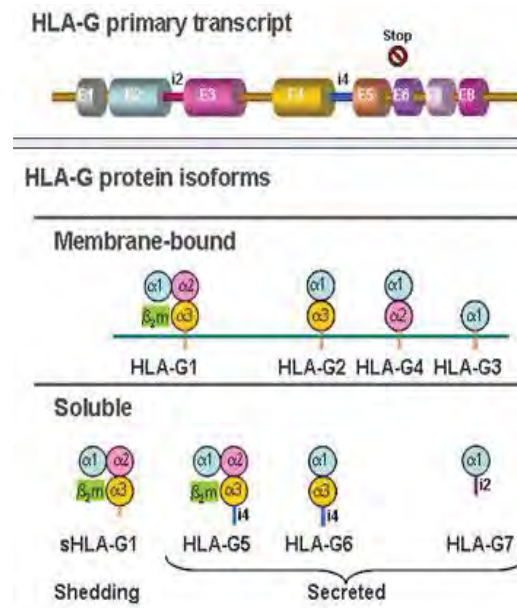
Estudos prévios demonstram que genes chamados CHPs “não-clássicos” ou do grupo Ib (moléculas de HLA-G ou HLA-E) parecem não desempenhar esta função contra a infecção pelo HPV (GONÇALVES *et al.*, 2008). Entretanto, em estudos com pacientes infectados pelo vírus da Hepatite B, foi observada resposta imunológica mediada por moléculas HLA-G e/ou HLA-E (SOUTO *et al.*, 2010). Esses CHPs possuem poucos alelos, que são oligomórficos, em comparação com os genes do grupo Ia e têm sua expressão limitada a poucos tipos de células.

## 2.8. Gene e moléculas do HLA-G

HLA-G é uma molécula de classe Ib, cuja estrutura se assemelha às clássicas moléculas do HLA de classe I, constituído por três domínios alfa não covalentemente associados à uma cadeia de  $\alpha 2$ -microglobulina (Figura 5). No entanto, os genes de HLA-G apresentam baixo polimorfismo na sua região codificadora, com um padrão de expressão limitado em indivíduos saudáveis e possui uma característica única entre as moléculas de HLA, que é formar multímeros de HLA-G. Além disso, por meio de *splicing* alternativo, os genes de HLA-G podem dar origem a sete isoformas de proteínas diferentes. Todas estas características contribuem para o crescente interesse científico nessa molécula, e algumas destas são de vital importância nas funções biológicas associadas ao HLA-G (VEIT; VIANNA; CHIES 2010).

O gene do HLA-G possui 36 alelos descritos até o momento, que codificam 14 proteínas diferentes, em comparação, respectivamente, com 673, 1077 e 360 alelos de HLA A, B e C (VEIT; VIANNA; CHIES 2010). Esse baixo polimorfismo é distribuído ao longo dos três domínios alfa, enquanto que em moléculas clássicas Ia de HLA está concentrado em torno do sítio de ligação com peptídeos. Este último situa-se mais profundamente na fenda entre os domínios alfa 1 e 2 em comparação com as moléculas do HLA clássico (CLEMENTS 2007). Estas características especiais do HLA-G tornam improvável que estas moléculas desempenhem um papel importante na apresentação de antígenos (CLEMENTS 2007).





**Figura 5.** Representação esquemática do transcrito primário de HLA-G e das múltiplas isoformas. O transcrito primário de HLA-G é homólogo ao da molécula HLA de classe I, porém contém um códon prematuro de término de leitura presente no éxon 6, logo após a seqüência codificadora do domínio transmembrana. O *splicing* alternativo do transcrito primário leva a sete isoformas da proteína: as isoformastruncadas são geradas pela exclusão de um ou dois éxons codificadores de domínios globulares, enquanto a translação do íntron 4 ou do íntron 2 leva à isoforma solúvel, que perde o domínio transmembrana (modificado de CAROSELLA 2008).

As proteínas do HLA-G podem ocorrer em diferentes isoformas: quatro ligadas à membrana (G1-G4) e três formas solúveis (G5-G7), e são geradas por *splicing* alternativo (CAROSELLA *et al.*, 2003) (Figura 5). Dependendo do tipo de células e condição fisiopatológica, diferentes isoformas de HLA-G são produzidas (LILA 2000). Todas as isoformas contêm pelo menos um domínio alfa-1 e a HLA-G1 é a isoforma completa. Nas isoformas G5-G7, os domínios transmembrânicos não são traduzidos, resultando em formas solúveis, presentes no citoplasma (PAUL *et al.*, 2000; CAROSELLA 2010). Devido a uma mutação, o HLA-G possui uma cauda citoplasmática que é menor do que as existentes nos HLA-A, B e C. (GERAGHTY;

KOLLER; ORR 1987). Esta característica tem implicações importantes para a expressão do HLA-G, já que proporciona uma expressão mais prolongada dessa molécula na superfície celular em comparação com as moléculas HLA clássicas (PARK 2001).

O HLA-G é constitutivamente expressado apenas em tecidos fetais, tais como as células do trofoblasto, no timo em adultos, córnea, ilhotas pancreáticas, precursores de células endoteliais e eritróides. Sua expressão é altamente restrita a determinados tecidos e pode ser induzida em situações tais como transplantes, doenças inflamatórias, em células tumorais, esclerose múltipla e nas infecções virais (ROUAS-FREIS *et al.*, 2003; CAROSELLA 2008; VEIT & CHIES 2009).

## 2.9. HLA-G e câncer

Alguns estudos demonstram o caráter imunossupressivo e imunomodulatório da molécula HLA-G associado ao desenvolvimento do câncer (DOWNS-KELLY; SCHADE; HANSEL 2007). A molécula HLA-G pode inibir as funções de células T e células *natural killer* (NK) e altas concentração dessa molécula, poderia sistematicamente reduzir a imunovigilância contra o desenvolvimento do tumor e assim favorecer a progressão do câncer. A inibição de células NK promovidas pela elevada expressão de HLA-G ocorre pela interação direta da molécula – G com receptores inibitórios na superfície das células NK, denominado *killing immunoglobulin-like receptors* (KIRs) ou agindo indiretamente, estabilizando a expressão de HLA-E na superfície celular (CAROSELLA 2008).

Recentemente passou-se a estudar o papel do HLA-G nas doenças inflamatórias ressaltando a possibilidade da molécula transformar a resposta celular Th1 em resposta

Th2, onde o HLA-G agiria como uma molécula protetora nas respostas inflamatórias teciduais. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos imunomoduladores de HLA-G, *in vitro*. A elevada expressão dessa molécula é associada ao aumento de citocinas Th1, como IFN- $\gamma$ , enquanto citocinas Th2 (IL-4, IL-10) podem promover a manutenção e a progressão da infecção viral (NGUYEN *et al.*, 2005; REBMANN *et al.*, 2007; ROUAS-FREISS *et al.*, 2007).

Estudo com células tumorais de glioblastoma humano identificou expressão da molécula HLA-G em sua superfície celular. A expressão dessa molécula de histocompatibilidade não clássica torna as células tumorais menos vulneráveis ao ataque de células citolíticas do sistema imune (WIENDL *et al.*, 2002).

Recente estudo indica que a expressão da molécula HLA-G solúvel e/ou de superfície em uma pequena parte das células neoplásicas podem ser suficientes para a supressão da resposta antitumoral (MORANDI *et al.*, 2010). Acredita-se que o HLA-G interage diretamente com receptores das células imunes, como linfócitos T CD4+ e CD8+, induzindo uma supressão da resposta dessas células, além de inibir a sua proliferação.

O aumento expressão de moléculas HLA-G está associado à carcinogênese de ovário (ROUAS-FREISS *et al.*, 2008). Recentes estudos sobre o comportamento da molécula HLA-G em lesões cervicais associadas ao HPV demonstraram baixa expressão de HLA-G associado ao grau de diferenciação da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC1-2-3 e ICC) (GONÇALVES *et al.*, 2008; GUIMARAES *et al.*, 2010).

Dessa maneira, estudos são direcionados a avaliação da expressão da molécula HLA-G em tumores, uma vez que a modulação negativa poderia constituir uma nova abordagem terapêutica para limitar a progressão do tumor.

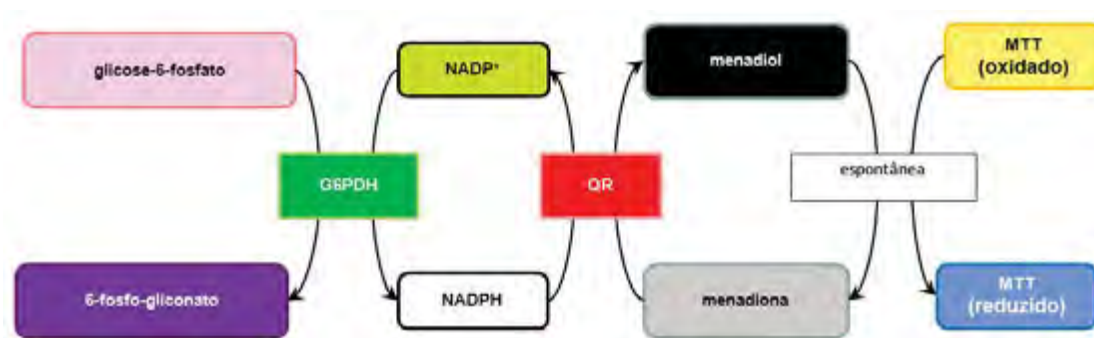
## 2.10. Produtos naturais e quimioprevenção

A quimioprevenção do câncer é feita pela prevenção, atraso ou reversão do processo de carcinogênese por meio da ingestão de compostos na dieta, nutracêuticos e fármacos (SONG *et al.*, 1999). Muitos desses produtos são capazes de alterar o metabolismo de carcinógenos através da indução de enzimas microsossomais envolvidas na detoxificação do organismo. A carcinogênese, portanto, pode ser evitada por uma série de compostos de diferentes classes tais como flavonóides, cumarinas, tiocarbamatos, fenólicos e isotiocianatos. A propriedade comum entre esses compostos é elevar a atividade enzimática por um aumento na sua síntese e na diminuição da degradação da mesma (CUENDET *et al.*, 2006).

As enzimas de fase 1 são responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e atuam na ativação carcinógenos, por outro lado, enzimas de fase 2 participam do processo de detoxificação do organismo frente a esses carcinógenos. Uma das estratégias para a proteção contra carcinogênese, utilizando produtos naturais, envolve a diminuição de enzimas de fase 1 enquanto aumentam enzimas de fase 2. Os chamados compostos indutores bifuncionais são aqueles que induzem enzimas de fase 1 tanto quanto enzimas de fase 2. Este é o caso de Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPA) que se ligam ao Receptor de Aril-hidrocarbonetos (AhR) com grande afinidade (CUENDET *et al.*, 2006). Os compostos monofuncionais induzem seletivamente apenas as enzimas de fase 2, ativando o elemento de resposta antioxidante (ARE) pela via Keap1-Nrf2 (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2002). A redução de quinonas eletrofílicas pela quinona redutase (QR) é uma importante via de detoxificação (TALALAY *et al.*, 1988; GERHÄUSER *et al.*, 1997).

O tratamento com produtos naturais podem induzir a quinona redutase. O ensaio da quinona redutase (QR) constitui um método simples, para uma rápida detecção e

avaliação de indução dessa enzima, que detoxifica carcinógenos (enzima de fase 2), baseando-se na medida direta da atividade da QR em células de hepatoma murino (Hepa 1c1c7) cultivadas em placas com 96 poços (PROCHASKA *et al.*, 1992). A quinona redutase catalisa a redução da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) a menadiol mediada por NADPH como doador de elétrons. O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é então reduzido não enzimaticamente pelo menadiol, resultando na formação de um sal precipitado com cor azul (azul de formazana) que pode ser quantificado em leitor de absorvância de microplacas (Figura 6) (PROCHASKA *et al.*, 1988; FAHEY *et al.*, 2004).



**Figura 6.** Princípio do ensaio da quinona redutase: glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato (G6PDH) geram NADPH continuamente. Este NADPH é usado pela QR para transferir elétrons a menadiona. O menadiol então formado reduz espontaneamente o MTT ao azul de formazana que pode ser medido em um amplo alcance de comprimentos de onda (490 a 640 nm). Ambos NADPH e menadiona são regenerados, o que evita problemas de depleção dos substratos (FAHEY *et al.*, 2004).

A linhagem derivada de hepatoma murino (Hepa 1c1c7) contém quantidades de QR induzíveis e facilmente mensuráveis, que fornece um confiável sistema de detecção de indutores de enzimas de fase 2 (PROCHASKA *et al.*, 1988; FAHEY *et al.*, 2004; CUENDET *et al.*, 2006).

Para determinar se um composto é considerado monofuncional ou bifuncional, pode-se comparar a capacidade de indução de uma substância na linhagem selvagem Hepalclc7 com o perfil da indução em duas linhagens mutantes. A linhagem TAOc1BPrcl é defeituosa no receptor AhR, enquanto a linhagem BPrcl é incapaz de translocar o complexo ligante-receptor para o núcleo (GERHÄUSER *et al.*, 1997). Portanto, os compostos que possuem o mesmo padrão de indução tanto na linhagem selvagem, quanto nas linhagens mutantes, são considerados indutores monofuncionais (CUENDET *et al.*, 2006).

### **III. OBJETIVOS**

---

### 3.1. Objetivos Gerais

Considerando que outros estudos já foram realizados em nosso laboratório com compostos isolados de *Pterogyne nitens*, o presente estudo tem por objetivo avaliar a atividade moduladora de resposta imunológica, antiinflamatória e antitumoral de dois alcalóides guanidínicos, pteroginina e pteroginidina em experimentos utilizando-se linhagens tumorais humanas (HeLa, SiHa, C33A e JEG-3) e linhagem normal humana de queratinócito de pele (HaCaT). Além disso, baseando-se na forte relação entre potencial antiinflamatório e quimioprevenção, o estudo foi biomonitorado em quantificar a atividade da enzima quinona redutase em linhagens de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) e linhagem mutante (TAOc1BPrcl) em ambos alcalóides guanidínicos de *P. nitens*.

### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade e determinar o  $CI_{50}$  entre as linhagens de carcinoma cervical imortalizadas por HPV (HeLa e SiHa), não-imortalizada pelo HPV (C33A) e queratinócitos de pele normal (HaCaT) tratadas em diferentes concentrações com alcalóides pteroginina e pteroginidina.
- Investigar a variação na produção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 liberadas pelas células de carcinoma cervical (HeLa, SiHa, C33A) e queratinócitos normais (HaCaT) tratadas e não-tratadas com os alcalóides pteroginina e pteroginidina .



- Determinar a expressão da molécula HLA-G solúvel, após tratamento com pteroginidina nas linhagens de carcinoma cervical (HeLa, SiHa e C33A), queratinócitos normais (HaCaT) e corioncarcinoma (JEG-3).
- Avaliar quantitativamente a atividade da enzima quinona redutase, em linhagem de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) e mutantes (TAOc1BPr1) induzida com alcalóides pteroginina e pteroginidina.

---

## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### 4.1. Extração, isolamento e identificação dos alcalóides guanidínicos (REGASINI *et al.*, 2009).

As folhas de *Pterogyne nitens* foram secas à temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas. O pó obtido foi submetido à maceração em hexano, com posterior remaceração em etanol. O extrato etanólico foi dissolvido em água: metanol (4:1) submetido à partição líquido-líquido empregando acetato de etila e *n*-butanol. A fração *n*-butanólica foi submetida a sucessivas etapas cromatográficas (cromatografia de permeação em gel e cromatografia de fase reversa), levando ao isolamento dos alcalóides pteroginina e pteroginidina. O isolamento das substâncias presentes no extrato foi realizado por técnicas cromatográficas: Cromatografia em Coluna, Cromatografia em Camada Delgada Preparativa e Cromatografia Líquida em Alta Eficiência, utilizando fases estacionárias (sílica, sílica derivatizada (C-18) e Sephadex LH-20) e solventes diversos. As substâncias puras foram submetidas à análise espectrométrica por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A preparação e etapas químicas de isolamento foram executadas pelo Dr. Luis Octavio Regasini do Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

#### 4.2. Cultura de células

O potencial efeito antiproliferativo de pteroginina e pteroginidina foram avaliados comparativamente entre as diferentes linhagens de carcinoma cervical imortalizadas pelo HPV (HeLa e SiHa) e carcinoma cervical não imortalizada por vírus (C33A). As linhagens ATCC (*American Type Culture Collection*) de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV-16 SiHa (ATCC:HTB-35), HPV-18 HeLa (ATCC:CCL-2), não imortalizada pelo vírus C33A (ATCC:HTB-31) e a linhagem normal de queratinócito de

pele HaCaT foram gentilmente cedidas pela Dra. Luiza Lina Villa, do Laboratório de Virologia, do Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer.

As células (HeLa, SiHa, C33A e HaCaT) foram cultivadas em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F10 (Sigma Co., St. Louis, USA) acrescido de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,2mg/mL de ciprofloxacina, 0,1 mg/mL de kanamicina (Sigma) e 10 % de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas, Brasil). A linhagem de corioncarcinoma JEG-3 (ATCC:HTB-36) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) e foi cultivada em meio DMEM-High Glicose-Plus (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) acrescido de 4,0 mM L-glutamina, 110 mg/L piruvato de sódio, 4,5 g/L D-glicose, 3,7 g/L bicarbonato de sódio.

As células foram cultivadas em garrafas, mantidas a 5 % de CO<sub>2</sub> e a temperatura de 37 °C até que a monocamada celular estivesse confluenta. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,35 g de NaHCO<sub>3</sub>, 1 g de glicose, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1000 mL) e tripsinizadas acrescentado-se 1 mL de ATV (Associação de Tripsina (0,2 %) e Versene (0,02 %) – Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil). Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio acrescido de 10 % de soro fetal bovino. A suspensão celular obtida em uma garrafa foi transferida para outras garrafas, de modo a obter 10<sup>5</sup> células por garrafa. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para os experimentos.

### 4.3. Tratamento das linhagens

Para os ensaios de citotoxicidade (MTT), foi utilizada uma suspensão de  $2,5 \times 10^4$  células/poço da linhagem HeLa, SiHa, C33A e HaCaT. As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades, e após 24 horas de cultivo, foram tratadas com os alcalóides (pteroginina e pteroginidina). Para todos os experimentos as células foram tratadas nas seguintes concentrações dos alcalóides: 0,312; 0,625; 1,25, 2,5; 5 e 10 mM, procurando avaliar o potencial efeito concentração-resposta para citotoxicidade. Inicialmente as células foram tratadas por 24 horas e avaliadas imediatamente após o tratamento (tempo zero,  $t_0$ ) para verificação dos parâmetros de citotoxicidade e seu sobrenadante reservado para posterior avaliação do perfil de citocinas. Da mesma forma foram realizados tratamentos de 24 horas, seguido de recuperação pós-tratamento de 24 horas (tempo recuperação,  $t_{24}$ ), para análise de citotoxicidade.

A concentração que induziu morte celular em 50% das células ( $CI_{50}$ ) foi determinada no tratamento de 24 horas ( $t_0$ ), assim como no tratamento seguido de recuperação ( $t_{24}$ ) nas diferentes concentrações para avaliação da citotoxicidade. Após a determinação do  $CI_{50}$  as células foram tratadas em duas concentrações abaixo e acima do  $CI_{50}$  das respectivas substâncias. Cada ensaio foi acompanhado de um controle positivo doxorrubicina 15  $\mu\text{g/mL}$  e controle negativo por células não tratadas.

### 4.4. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O método de MTT, utilizado para a avaliação de citotoxicidade, tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, EUA), formando

cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Após o tratamento descrito no item 4.3, o meio de cultura foi removido e 5 mg/mL de MTT em PBS foram adicionados em cada poço, as células na microplaca foram incubadas a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (3 a 5 horas). Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de álcool isopropílico absoluto foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540 nm, foi realizada em leitor de placas (Bio-Tek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc.,USA). Os testes foram realizados em três experimentos independentes. A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG *et al.*, 2004:

$$\text{Células vivas (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Controle Negativo}} \times 100$$

#### **4.5. Determinação da produção/ inibição das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 por ELISA**

As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram quantificadas no sobrenadante obtido da cultura celular antes do tratamento e pós-tratamento, como descrito o item 4.3. As dosagens foram determinadas utilizando do método imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) padronizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Dor do Prof. Fernando Queiroz Cunha (FMRP-USP) com algumas modificações. As microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning Inc., NY) foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti-IL-

1 $\beta$ , anti-IL-4, anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$  e anti-INF- $\gamma$  (Pharmigen, EUA) e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS (pH 7,4) contendo 0,05 % de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, foram bloqueadas com PBS contendo 10 % de FBS (PBS-FBS) (Merk, Alemanha) e mantidas a temperatura ambiente por 60 minutos. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e 100  $\mu$ L de cada citocina padrão e dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados foram adicionados às placas. As placas foram incubadas “overnight” a 4 °C, e lavadas 5 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-4, anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$  e anti-INF- $\gamma$  (Pharmigen, EUA) marcado com biotina e diluído na concentração de cada citocina em PBS-FBS. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas 5 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100  $\mu$ L do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS-FBS. As placas foram incubadas novamente a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e 100  $\mu$ L do substrato-fenildiamino dihidroclorido, OPD (Sigma, EUA) foram adicionados em cada cavidade. Após nova incubação a temperatura ambiente por 20 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 M. A absorbância foi lida a 490 nm em espectrofotômetro de microplacas e as concentrações das citocinas foram obtidas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

#### 4.6. Determinação da expressão da molécula HLA-G por ELISA

O ensaio de determinação da expressão da molécula solúvel HLA-G foi realizado por meio do teste imunoenzimático ELISA, utilizando o Kit sHLA-G Exbio, Praha, Czech Republic. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas sob orientação da pós-doutoranda Danielle Maia (FCFar-UNESP). Usou-se o sobrenadante das culturas celulares HaCaT, SiHa, HeLa, C33A e JEG-3 tratadas com pteroginidina para avaliar a quantidade da forma solúvel de Antígenos Leucocitários Humanos-G (sHLA-G). Os padrões das amostras foram incubadas em placas de poliestireno de 96 cavidades (Nunc) coberto com anticorpo monoclonal de rato anti-sHLA-G (Monoclonal Antibody to HLA-G (Human) Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated (0.1 mg) Ig-G1; Exbio, Praha, Czech Republic. Após, completar-se uma lavagem, foi adicionado anticorpo monoclonal de rato anti-humano b2-microglobulina ; após foi adicionado peroxidase e incubando com complexo anticorpo-sHLA-G imobilizado. Seguida de outra lavagem permaneceu com anticorpo com HRP- conjugado permitindo a reação com o substrato ( $H_2O_2$  com trametilbenzidina). A reação foi interrompida com adição de solução ácida, e a absorbância resultante do produto amarelo foi mensurada por espectofotometria a 450 nm (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech Div., Helsinki, Finland). As concentrações da molécula solúvel HLA-G foram obtidas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas da molécula padrão de acordo com o fabricante. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/mL. Como controle positivo foi utilizada a linhagem celular de corioncarcinoma humano (JEG-3) que expressa elevado nível de HLA-G. Como controle negativo, as linhagens celulares não receberam nenhum tratamento.



## 4.7. Ensaio de quinona redutase

### 4.7.1. Reagentes

Para realizar a quantificação de indução enzimática com o ensaio de quinonaredutase (QR) foi necessário preparar os seguintes reagentes. Solução de lise com 0,8 % dedigitonina e 2 mM de EDTA, pH 7,8. Solução de ensaio feita de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de glicose-6-fosfato, 50  $\mu$ M de menadiona, 30  $\mu$ M de NADPH, 5  $\mu$ M de FAD, 0,07% (m/v) de soro-albumina bovina, 0,03% (m/v) de MTT, 0,01% (v/v) de Tween-20 e 2 unidades/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. Como controle positivo foi utilizado o indutor  $\beta$ -naftoflavona (BNF) na concentração de 0,01  $\mu$ M (SONG et al., 1999). Reagentes obtidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

### 4.7.2. Quantificação da atividade de quinona redutase

As células Hepa1c1c7 e TAO1BPr1 foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e solução de antibiótico/antimicótico nas placas de 96 cavidades por 24 horas, com cerca de  $10^4$  células/mL em cada poço. Em seguida foram expostas a diferentes concentrações de pteroginina e pteroginidina solubilizados em meio de cultura por 48 horas para que ocorra a indução enzimática. Em cada coluna da placa colocou-se uma concentração, seguindo diluição seriada. Depois do tratamento, descartou-se o meio de cultura e adicionou-se 50  $\mu$ L de solução de lise. A placa foi então incubada por 10 minutos a 37 °C. Para facilitar a lise das células, as placas foram agitadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a lise, avaliou-se a atividade da QR com a adição de 200

$\mu\text{L}$  da solução de ensaio. Incubou-se a placa por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz e fez-se a leitura. A absorbância foi medida usando um leitor de iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 595 nm (PROCHASKA *et al.*, 1988; GROSS *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2004).

Os dados foram normalizados subtraindo da média de absorbância obtida de cada concentração, a média de absorbância do controle de reagente branco. O erro padrão da média em cada coluna é geralmente menor que 10%. Pode ocorrer um desvio maior que 50% em um poço devido a uma desigualdade na densidade celular (GROSS *et al.*, 2000). A viabilidade celular foi determinada em uma placa feita paralelamente, corada com violeta cristal e determinou-se a concentração que inibe em 50% o crescimento celular ( $\text{CI}_{50}$ ) (PROCHASKA *et al.*, 1992).

A potência de indução enzimática da QR é expressa em unidades por g (U/g). Uma unidade de atividade indutora de QR é definida com a quantidade de produto natural necessário para duplicar a atividade específica da QR em relação a células não tratadas (CD) (PROCHASKA *et al.*, 1988; GROSS *et al.*, 2000). Alguns compostos possuem o índice de indução enzimático muito próximo da concentração citotóxica. Para isso, calcula-se o índice de quimioprevenção (IC) dessas substâncias dividindo a  $\text{CI}_{50}$  pelo CD (FAHEY *et al.*, 2004).

#### **4.8. Análise estatística**

Para a comparação dos resultados obtidos de citotoxicidade, do potencial antiinflamatório, níveis de HLA-G solúvel e de indução da enzima quinona-redutase, pelo tratamento com pteroginina e pteroginidina, nas diferentes concentrações, foi aplicado o teste de análise de variância *oneway* (ANOVA) com pós-teste de Tukey. A

análise foi realizada com software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de  $p < 0.05$ .

---

## V. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da viabilidade celular

Os resultados de viabilidade celular estão demonstrados nas Figuras 7 e 8. As substâncias isoladas pteroginina e pteroginidina foram testadas nas concentrações de 0,312 a 10 mM por meio do ensaio de citotoxicidade, baseada na redução do MTT, obtendo-se o resultado da porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle negativo. O gráfico concentração-resposta é uma das formas onde melhor se visualiza a atividade antiproliferativa das amostras testadas. Com esse tipo de gráfico é possível verificar se a substância em questão possui efeito citocida (acima do ponto zero e abaixo de 50 %) e perfil concentração-dependente (ROUTH 1971). Os tratamentos com pteroginina e pteroginidina por 24 horas ( $t_0$ ) e tratamento de 24 horas seguido de recuperação de 24 horas ( $t_{24}$ ), foram avaliados para as linhagens celulares HaCaT, HeLa, SiHa e C33A.

Como esperado, os ensaios de citotoxicidade com ambos os alcalóides nos tempos  $t_0$  e  $t_{24}$  demonstraram que os queratinócitos normais de pele (HaCaT) foi a linhagem mais sensível ao tratamento com maior porcentagem de morte celular em comparação com as demais linhagens tumorais cervicais: HeLa, SiHa e C33A que demonstraram-se mais resistentes aos tratamentos (Figuras 7 e 8). Para todas as linhagens celulares foi observado que durante os tratamentos ( $t_0$  e  $t_{24}$ ) com pteroginina e pteroginidina, houve aumento da citotoxicidade concentração-dependente.

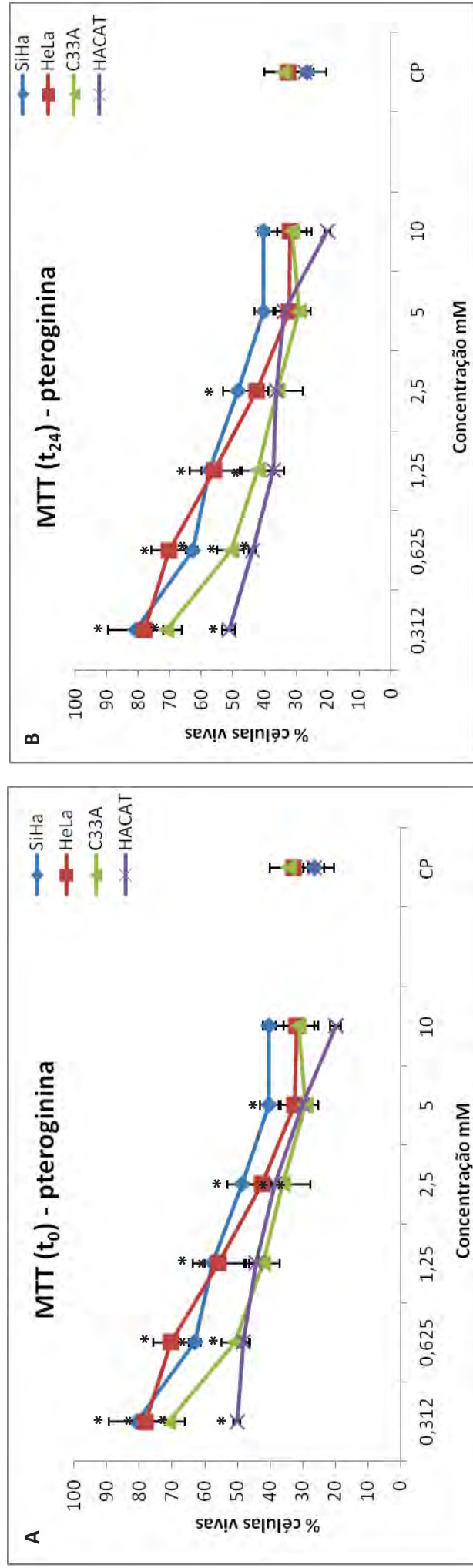
Na Figura 7 (A e B) estão apresentados os tratamentos com pteroginina nos tempos  $t_0$  e  $t_{24}$  em linhagens HaCaT, HeLa, SiHa e C33A. Nota-se a semelhança no perfil tóxico de pteroginina nos diferentes tempos:  $t_0$  e  $t_{24}$  para todas as linhagens, com valores de  $CI_{50}$  para HaCaT =  $0,312 \pm 0,006$  mM, HeLa =  $1,87 \pm 0,011$  mM, SiHa =  $2,5 \pm 0,009$  mM e para C33A =  $0,625 \pm 0,012$  mM no tempo  $t_0$  de tratamento. Tanto no tratamento  $t_0$  quanto no  $t_{24}$  com pteroginina (Figura 7A e 7B) maior citotoxicidade foi

encontrada na linhagem HaCaT, seguida posteriormente de C33A, HeLa e SiHa, na qual foi estabelecida seguinte ordem de citotoxicidade: HaCaT>C33A>HeLa>SiHa.

Da mesma forma, os tratamentos  $t_0$  e  $t_{24}$  foram realizados para a outra substância isolada de *P. nitens*, a pteroginidina, nas linhagens celulares HaCaT, HeLa, SiHa e C33A como mostra as Figura 8A e 8B. No tratamento  $t_0$  com a substância pteroginidina, uma maior atividade citotóxica foi encontrada em células HaCaT, seguida de HeLa, C33A e SiHa na concentração de 10 mM (Figura 8A). Já o tratamento  $t_{24}$  como mesmo alcalóide, (Figura 8B) apresentou perfil citotóxico diferenciado do tratamento  $t_0$  principalmente para a linhagem HaCaT, uma vez que o queratinócito mostrou discreta recuperação ao efeito do tratamento com pteroginidina nas concentrações de 5 e 10 mM. A linhagem C33A também demonstrou diferente perfil de viabilidade celular no tempo  $t_{24}$  em relação ao  $t_0$ , na qual foi observado menor sobrevida celular (65% de células vivas) na concentração de 0,312 mM, enquanto, que nas maiores concentrações (5 e 10 mM) foi a linhagem mais sensível ao tratamento apresentando mais morte celular (Figura 8B).

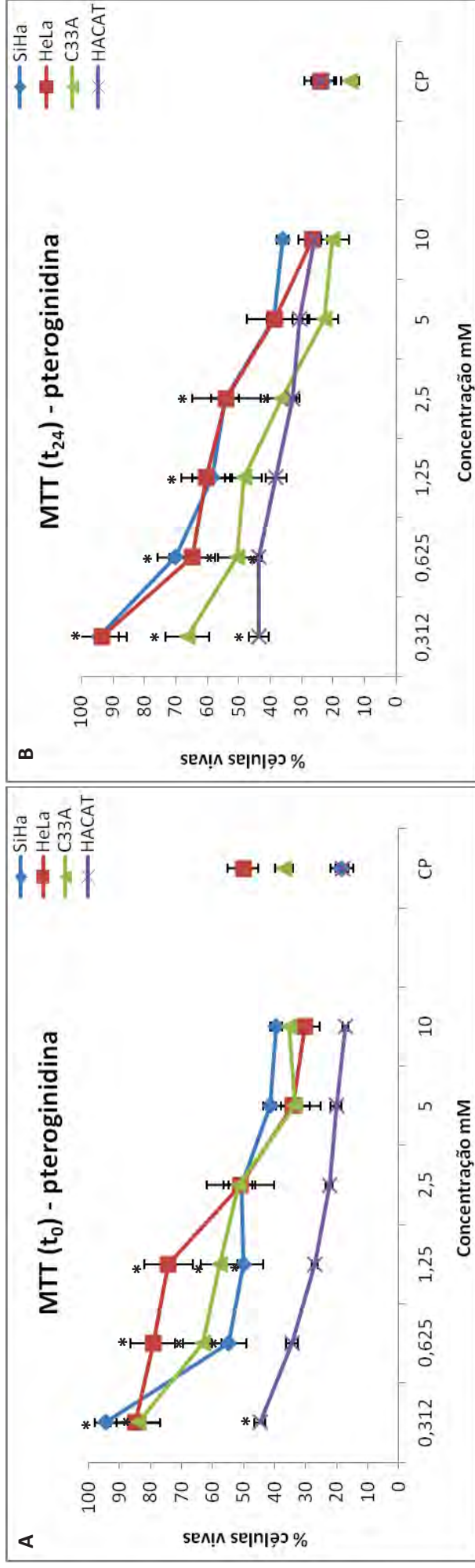
Diferença estatística significativa foi observada entre HaCaT e HeLa durante o tratamento com pteroginidina ( $p<0,01$ ) assim como para pteroginina ( $p<0,05$ ), indicando que as células não-tumorais são mais sensíveis ao tratamento com esses alcalóides. Adicionalmente, no tratamento de 24 horas ( $t_0$ ) foi observada diferença estatística significativa entre HaCaT tratada com pteroginina e HeLa tratada com pteroginidina ( $p<0,05$ ), HaCaT tratada com pteroginidina e SiHa tratada com pteroginina ( $p<0,01$ ) e HaCaT tratada com pteroginidina e HeLa tratada com pteroginina ( $p<0,01$ ). Nenhuma significância foi observada para o tratamento com ambos os alcalóides, em 24 horas entre HeLa *versus* SiHa e HeLa ou SiHa *versus* C33A. Os valores de 50% da concentração inibitória para o crescimento celular ( $CI_{50}$ )

foram expressos como a concentração resultante em 50% da redução do crescimento das células tumorais e foram calculadas através de regressão linear utilizando o programa GraphPad Prism® Version 5.01 demonstradas nas Tabelas 2 e 3.



**Figura 7.** Ensaio de citotoxicidade (MTT). Porcentagem de células vivas nas linhagens SiHa (■), HeLa (■), C33A (■) e HaCaT (■) tratadas com alcalóide pteroginina de *Pterogyne nitens* nas concentrações de 0,312 mM a 10 mM. (A) Tratamento por 24 horas ( $t_0$ ). (B) Tratamento de 24 horas seguido de 24 horas de recuperação ( $t_{24}$ ). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão ( $M \pm EP$ ). CP (controle positivo). *One way ANOVA* com pós teste Tukey. (\*) $p < 0,01$  (A) HeLa ( $p < 0,01$ -CPx 0,312;0,625; e 1,25 mM), SiHa ( $p < 0,01$ -CPx 0,312;0,625;1,25; 2,5; 5; 10 mM), C33A ( $p < 0,01$ -CPx 0,312; 0,625; 1,25; 2,5 mM) e HaCaT ( $p < 0,01$ -CPx1,25; 2,5 mM). (B) HeLa ( $p < 0,01$ -CPx0,312;0,625;1,25; 2,5; 5; 10 mM), C33A ( $p < 0,01$ -CPx0,312;0,625;1,25 mM) e HaCaT ( $p < 0,01$ -CPx0,312;0,625 mM).





**Figura 8.** Ensaio de citotoxicidade (MTT). Porcentagem de células vivas nas linhagens SiHa (■), HeLa (■), C33A (■) e HaCaT (■) tratadas com alcalóide pteroginidina de *Pterogyne nitens* nas concentrações de 0,312 mM a 10 mM. (A) Tratamento por 24 horas ( $t_0$ ). (B) Tratamento de 24 horas seguido de 24 horas de recuperação (t<sub>24</sub>). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo). *One way ANOVA* com pós teste Tukey. (\*)  $p < 0,01$  (A) HeLa ( $p < 0,01$  – CPx0,312; 0,626; 1,25 mM), SiHa ( $p < 0,01$  – CPx0,312; 0,626; 1,25; 2,5; 5; 10 mM), C33A ( $p < 0,01$  – CPx0,312; 0,626; 1,25; 2,5; 5; 10 mM) e HaCaT ( $p < 0,01$  – CPx0,312 mM). (B) HeLa ( $p < 0,01$  – CPx1,25 mM), SiHa ( $p < 0,01$  – CPx1,25; 2,5; 5; 10 mM), C33A ( $p < 0,01$  – CPx1,25; 2,5; 5; 10 mM) e HaCaT ( $p < 0,01$  – CPx1,25 mM).

**Tabela 2.** Determinação da atividade citotóxica de pteroginina por meio da técnica de MTT no tratamento de 24 horas ( $t_0$ ) e no tratamento de 24 horas, seguidos de recuperação em 24 horas ( $t_{24}$ ).

<i>Citotoxicidade pelo ensaio de MTT de pteroginina</i>				
<i>CI<sub>50</sub> (mM)</i>				
<b>Substâncias</b>	<b>HaCaT</b>	<b>HeLa</b>	<b>SiHa</b>	<b>C33A</b>
<b>pteroginidina (<math>t_0</math>)</b>	0,312±0,006	1,87±0,011	2,5±0,009	0,625±0,012
<b>pteroginidina (<math>t_{24}</math>)</b>	0,308±0,006	2,5±0,004	3,0±0,014	0,623±0,008

Os valores de 50% da concentração inibitória para o crescimento celular ( $CI_{50}$ ) foram expressos como a concentração resultante em 50% da redução do crescimento das células tumorais e foram calculadas através de regressão linear, utilizando o programa GraphPad Prism® Version 5.01.

**Tabela 3.** Determinação da atividade citotóxica de pteroginidina através da técnica de MTT no tratamento de 24 horas ( $t_0$ ) e no tratamento de 24 horas, seguidos de recuperação em 24 horas ( $t_{24}$ ).

<i>Citotoxicidade pelo ensaio de MTT de pteroginidina</i>				
<i>CI<sub>50</sub> (mM)</i>				
<b>Substâncias</b>	<b>HaCaT</b>	<b>HeLa</b>	<b>SiHa</b>	<b>C33A</b>
<b>pteroginidina (<math>t_0</math>)</b>	0,303±0,005	2,6±0,013	2,5±0,015	2,5±0,001
<b>pteroginidina (<math>t_{24}</math>)</b>	0,302±0,011	0,625±0,009	3,0±0,014	0,630±0,007

Os valores de 50% da concentração inibitória para o crescimento celular ( $CI_{50}$ ) foram expressos como a concentração resultante em 50% da redução do crescimento das células tumorais e foram calculadas através de regressão linear utilizando o programa GraphPad Prism® Version 5.01.

Nos tratamentos de 24 horas, seguidos de recuperação em 24 horas ( $t_{24}$ ), foi possível observar o aumento de citotoxicidade concentração-resposta, porém não houve significância estatística entre as linhagens com ambos os tratamentos. A avaliação comparativa de citotoxicidade do tratamento com a pteroginina entre as linhagens HeLa, SiHa, C33A e HaCaT foram realizadas para as diferentes concentrações (0,312; 0,625; 0,5; 1,25; 2,5; 5 e 10 mM) bem como no tratamento de 24 horas seguido de período de recuperação de 24 horas ( $t_{24}$ ). Não foi encontrada diferença significativa entre as diferentes linhagens nem nos diferentes tempos de tratamento ( $t_0$  e  $t_{24}$ ) (Figuras 7 e 8). Embora não haja diferença estatística na citotoxicidade entre as linhagens, é possível observar que HaCaT apresentou maior morte celular (Figuras 7A, 7B e 8A). Em contrapartida, menor frequência de morte celular foi observada sutilmente na linhagem SiHa na mesma condição de tratamento (Figuras 7A, 7B, 8A e 8B).

Quando o tempo de tratamento ( $t_0$  e  $t_{24}$ ) foi avaliado comparativamente, observou-se o mesmo perfil de morte celular de todas as linhagens tratadas com pteroginina nos tempos de 24 horas ( $t_0$ ) e tempo de 24 horas seguido de recuperação ( $t_{24}$ ). Entretanto, no tratamento com pteroginidina, a citotoxicidade foi menor para células HaCaT e maior para C33A com 24 horas de recuperação (Figuras 8A e 8B). O tratamento com pteroginidina aparentemente foi mais citotóxico para as células SiHa nas concentrações 0,625 mM e 1,25 mM em 24 horas ( $t_0$ ) quando comparadas com o tempo de recuperação ( $t_{24}$ ) mostrado nas Figuras 8A e 8B.

Os resultados mostram relativa semelhança no perfil tóxico dos alcalóides pteroginina e pteroginidina nas mesmas linhagens celulares e nos diferentes tempos de tratamento ( $t_0$  e  $t_{24}$ ). Em razão disto, para dar continuidade aos estudos posteriores foi preconizado somente realizar tratamentos no tempo  $t_0$ .

## 5.2. Determinação do perfil de variação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 por ELISA.

Para determinar o perfil de variação das citocinas, os sobrenadantes das linhagens antes e após tratamento foram mantidos em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior dosagem imunológica. Baseado nos resultados anteriores de citotoxicidade, uma vez que o tratamento de 24 horas ( $t_0$ ) não mostrou diferença significativa quando comparado ao tratamento de 24 horas seguido de recuperação de 24 horas ( $t_{24}$ ) foi mantido a escolha por determinar o aumento ou diminuição das citocinas apenas no tempo de tratamento de 24 horas ( $t_0$ ).

As substâncias pteroginina e pteroginidina não induziram variação de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 em condições não-citotóxicas na linhagem HaCaT. Contudo, nas mesmas condições foram obtidos resultados de variação no perfil de expressão de algumas citocinas concentração-dependente para as linhagens HeLa, SiHa e C33A tratadas com ambos alcalóides.

Os resultados do perfil de variação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 para as substâncias pteroginina e pteroginidina estão demonstrados nas Figuras 9 e 10. Análises comparativas dos resultados com pteroginina e pteroginidina (Figuras 9 e 10) para a linhagem HaCaT não demonstraram aumento ou diminuição concentração-resposta para as citocinas, caracterizando ausência de variação do perfil de citocinas para a linhagem HaCaT, na qual foi observado níveis basais semelhante ao controle não-tratado (Figura 9A), ressaltando apenas significativa diminuição de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , em condições citotóxicas (5 e 10 mM).

Em contrapartida, para as demais linhagens foi verificado perfil concentração-dependente para o tratamento com ambos alcalóides isolados de *P.nitens*. Para a

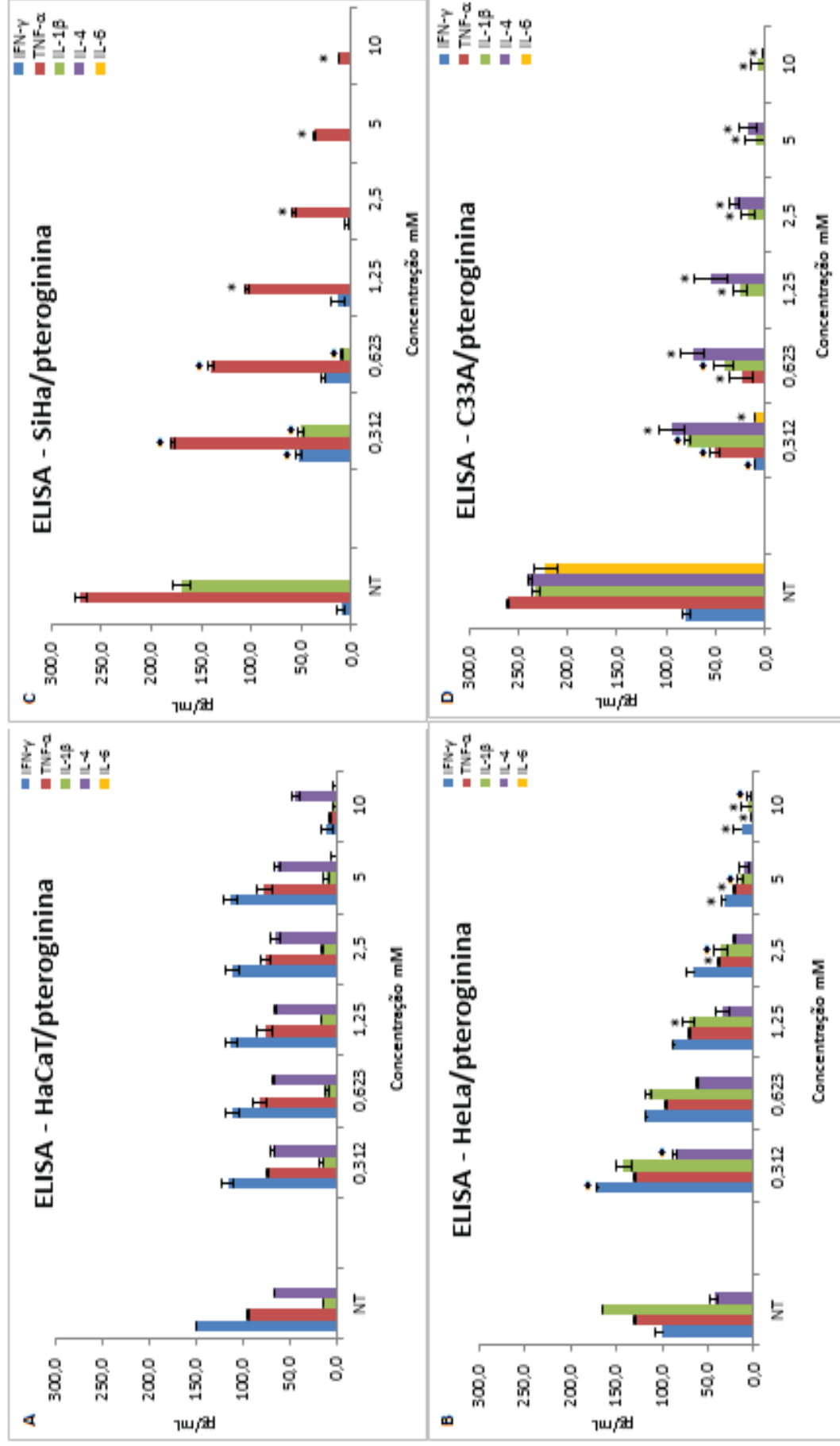
linhagem HeLa, (Figura 9B) houve aumento estatisticamente significativo de IFN- $\gamma$  e IL-4, enquanto que para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  houve discreta diminuição concentração-dependente ( $p < 0,01$ ). Ainda houve duas vezes maior aumento de IFN- $\gamma$  na menor concentração testada (0,312 mM) para a linhagem celular HeLa ( $p < 0,01$ ). Para linhagem SiHa, (Figura 9C) houve diminuição significativa para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ) na concentração de 0,312 a 0,625 mM quando comparado ao controle não-tratado (NT). Ainda, foi observado aumento significativo de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) na concentração de 0,312 mM para linhagem SiHa.

Em relação à linhagem C33A, (Figura 9D) após o tratamento com pteroginina houve inibição estatisticamente significativa de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-4 quando comparado ao controle não-tratado ( $p < 0,01$ ). De modo geral, análise qualitativa do perfil imunomodulatória do alcalóide pteroginina, demonstrou que este composto possui caráter inibidor de citocinas inflamatórias (Tabela 4).

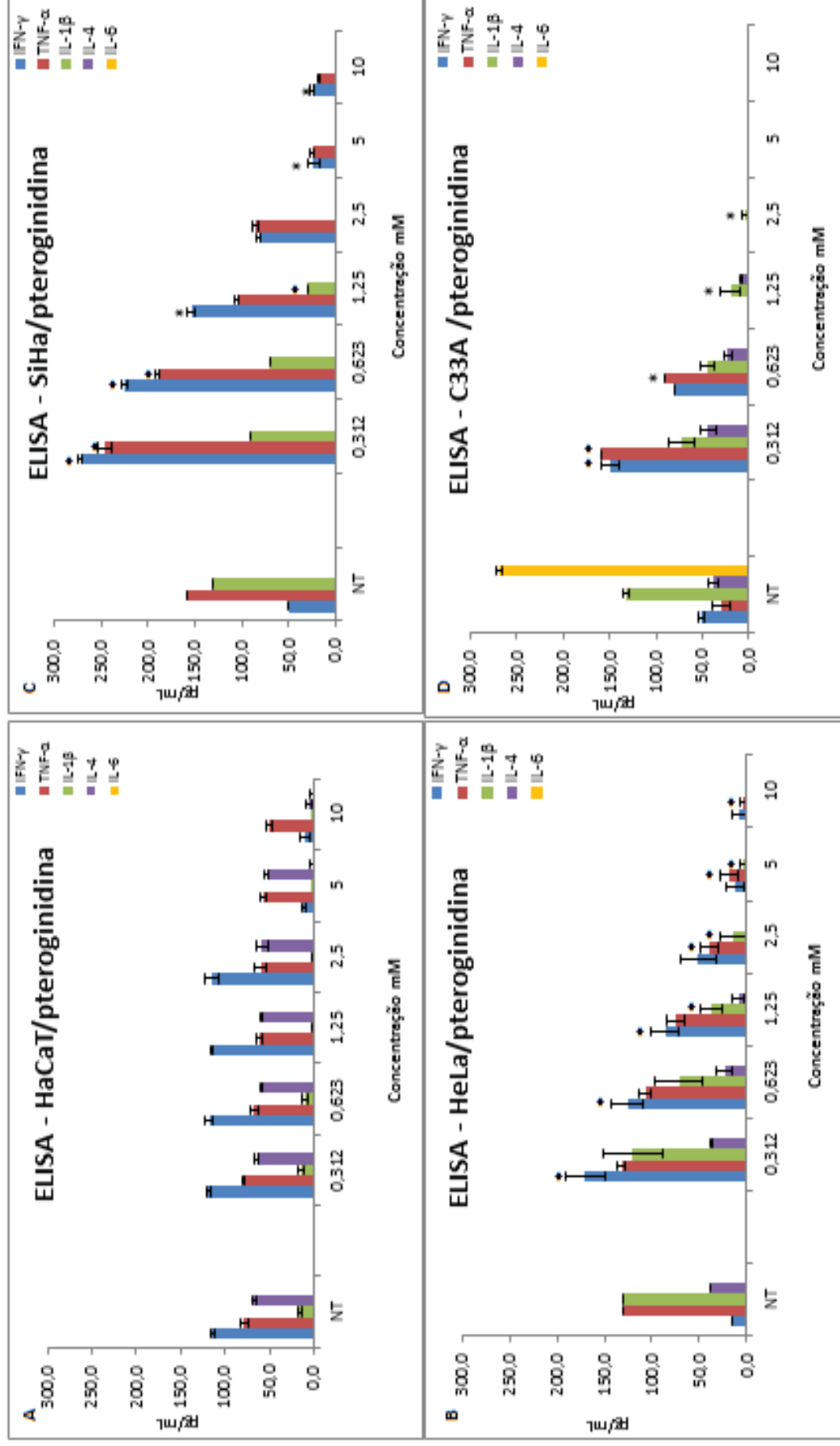
Os resultados para a substância pteroginidina estão mostrados na Figura 10. Houve novamente ausência de variação das citocinas para a linhagem HaCaT (Figura 10A). Assim como ocorrido no tratamento anterior com pteroginina, foi também observado que após o tratamento com pteroginidina, a linhagem HaCaT não demonstrou variação aos níveis de citocinas que foram equivalentes às taxas basais do controle não-tratado (NT) revelando assim perfil celular diferenciado às demais linhagens tumorais cervicais (HeLa, SiHa e C33A) do presente estudo. Para a linhagem HeLa (Figura 10B) houve aumento estatisticamente significativo de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) na concentração 0,312 mM. IFN- $\gamma$  apresentou níveis aumentados cerca de oito vezes mais em relação ao controle não-tratado (NT) atingindo 160 pg/mL. Ainda houve discreta diminuição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a partir da concentração de 0,623 mM ( $p < 0,01$ ). Para os resultados com a linhagem SiHa (Figura 10C), foi observado aumento significativo de INF- $\gamma$  ( $p < 0,01$ ) em

relação ao controle não-tratado (NT) sendo este resultado considerado o mais expressivo do presente estudo, com aumento de IFN- $\gamma$  seis vezes maior em relação ao controle não-tratado (NT) atingindo 270 pg/mL. Aumento significativo ( $p < 0,01$ ) também foi observado para TNF- $\alpha$  com pico de 240 pg/mL em 0,312 mM para a linhagem C33A (Figura 10D). IL-6 teve maior taxa de inibição após o tratamento com pteroginidina ( $p < 0,01$ ), seguido de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ) na concentração de 0,312 a 2,5 mM.

Uma vez que os compostos alteraram a produção de citocinas em relação aos controles, foi estabelecida ordem qualitativa de potência e desse modo obtido o potencial imunomodulador desses alcalóides para as citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 a partir dos valores expressos em pg/mL. Nas Tabelas 4 e 5 é possível observar a análise comparativa qualitativa do aumento (+), diminuição (-) e ausência (\*) das citocinas, referente aos tratamentos com pteroginina e pteroginidina. A substância que melhor inibiu essas citocinas foi pteroginina (Tabela 4) enquanto que pteroginidina mostrou-se um potente estimulador desses mediadores inflamatórios (Tabela 5).



**Figura 9.** Ensaio de ELISA. Correlação entre as citocinas: IFN- $\gamma$  (■), TNF- $\alpha$  (■), IL-1 $\beta$  (■), IL-4 (■) e IL-6 (■) nas linhagens HaCaT (A), HeLa (B), SiHa (C) e C33A (D) tratadas e não-tratadas com pteroginina. As médias referem-se a três experimentos independentes. Os resultados são relatados como média  $\pm$  erro padrão da média da concentração das citocinas em pg/mL. *Oneway ANOVA* com pós-teste Tukey. \*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle não-tratado (NT).



**Figura 10.** Ensaio de ELISA. Correlação entre as citocinas: IFN- $\gamma$  (■), TNF- $\alpha$  (■), IL-1 $\beta$  (■), IL-4 (■) e IL-6 (■) nas linhagens HaCaT (A), HeLa (B), SiHa (C) e C33A (D) tratadas e não-tratadas com pteroginidina. As médias referem-se a três experimentos independentes. Os resultados são relatados como média  $\pm$  erro padrão da média da concentração das citocinas em pg/mL. *Oneway* ANOVA com pós-teste Tukey. \*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle não-tratado (NT).



**Tabela 4.** Análise qualitativa comparativa da variação de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6, após tratamento com pteroginina.

*Variação do perfil de citocinas após tratamento com pteroginina*

	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-6
HaCaT	*	*	*	*	*
HeLa	+	-	-	+	*
SiHa	+	-	-	*	*
C33A	-	-	-	-	-

\* (ausência); + (aumento); - (diminuição).

**Tabela 5.** Análise qualitativa comparativa da variação de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6, após tratamento com pteroginidina.

*Variação do perfil de citocinas após tratamento com pteroginidina*

	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-6
HaCaT	*	*	*	*	*
HeLa	+	-	-	-	*
SiHa	+	+	-	*	*
C33A	+	+	-	-	-

\* (ausência); + (aumento); - (diminuição)

### 5.3. Avaliação do perfil de expressão da molécula HLA-G solúvel.

A fim de compreender o mecanismo pelo qual HLA poderia participar da patogênese das neoplasias, conferindo susceptibilidade ou proteção contra o desenvolvimento do câncer, este estudo foi direcionado à avaliação dos níveis de HLA-G solúvel, uma vez que essa molécula é expressa em linhagens celulares de carcinoma cervical e altamente expressas em trofoblastos.

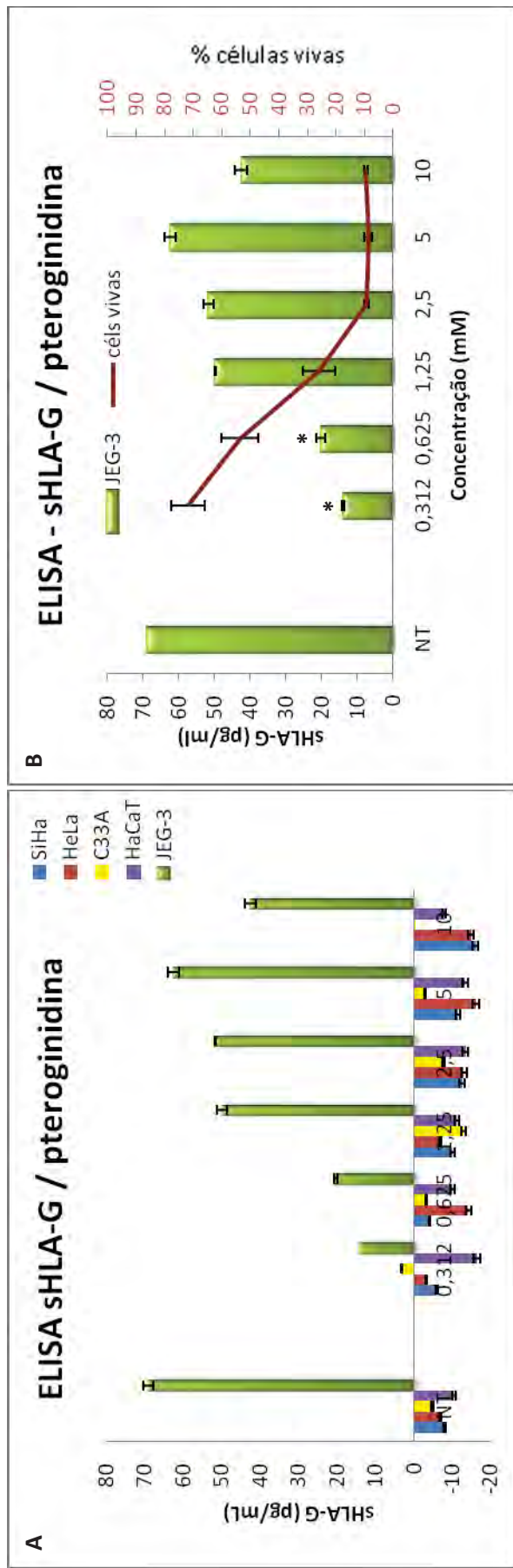
Sendo assim foi avaliada a capacidade da substância pteroginidina, em diminuir a expressão de molécula HLA-G solúvel nas linhagens HeLa (HPV-18), SiHa (HPV-16), C33A (sem HPV), HaCaT (queratinócito de pele normal) e JEG-3 (corioncarcinoma).

A molécula HLA-G solúvel foi quantificada no sobrenadante obtido da cultura celular através do teste imunoenzimático de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e a viabilidade celular pelo ensaio de MTT.

O presente estudo procurou estabelecer a relação entre o tratamento com produto natural em linhagens tumorais e a potencial diminuição dos níveis de HLA-G solúvel. A análise prévia dos resultados mostrou que dentre as cinco linhagens celulares, somente JEG-3 apresentou níveis superiores da molécula no sobrenadante quando comparadas com as células não-tratadas (Figura 11). A linhagem de carcinoma cervical C33A apresentou discreto aumento na menor concentração do alcalóide testado (0,312 mM), mas com valor estatisticamente não significativo quando comparado com os índices da linhagem de corioncarcinoma JEG-3. Já as demais linhagens não houve posterior avaliação, pois seus valores foram negativos, incluindo o controle de células não-tratadas.

Considerando que os melhores resultados foram observados para o tratamento com pteroginidina em ensaios anteriores de imunomodulação, o presente estudo preconizou

somente avaliar os níveis de HLA-G solúvel na linhagem JEG-3 tratadas com o alcalóide pteroginidina. Nas menores concentrações (0,312 e 0,625 mM) houve redução da concentração de sHLA-G ( $p < 0,01$ ) quando comparada ao controle negativo não-tratado (NT) que expressou concentrações maiores da molécula. Concomitantemente, a viabilidade celular apresentou concentração-resposta ao tratamento com  $CI_{50\%}$  na concentração de 0,625 mM para linhagem JEG-3 (Figura 11).



**Figura 11.** Níveis de sHLA-G pelo ensaio de ELISA. (A) Sobrenadante das linhagens SiHa, HeLa, C33A, HaCaT e JEG-3 tratadas e não-tratadas com pteroginidina. (B) Níveis de sHLA-G na linhagem JEG-3 e viabilidade celular pelo método de MTT utilizando tratamento com pteroginidina.

\*  $p < 0,001$  quando comparado ao controle não tratado (NT).

Os resultados sugerem que o tratamento com pteroginidina influenciou a diminuição dos níveis de expressão da molécula sHLA-G em concentrações não citotóxicas. Este é o primeiro estudo que demonstra os efeitos da pteroginidina, alcalóide isolado de *P. nitens* sobre a proteção contra o desenvolvimento do câncer. Interessantemente, em concentrações citotóxicas (1,25 a 10 mM) foi observado níveis superiores de sHLA-G quando comparadas às concentrações não-citotóxicas (0,312 e 0,625 mM). Quando, comparada com o controle de células JEG-3 não tratadas não houve diferença estatisticamente significativa, o que poderia demonstrar a permanência da concentração de sHLA-G mesmo com o tratamento que induziu a morte celular por citotoxicidade.

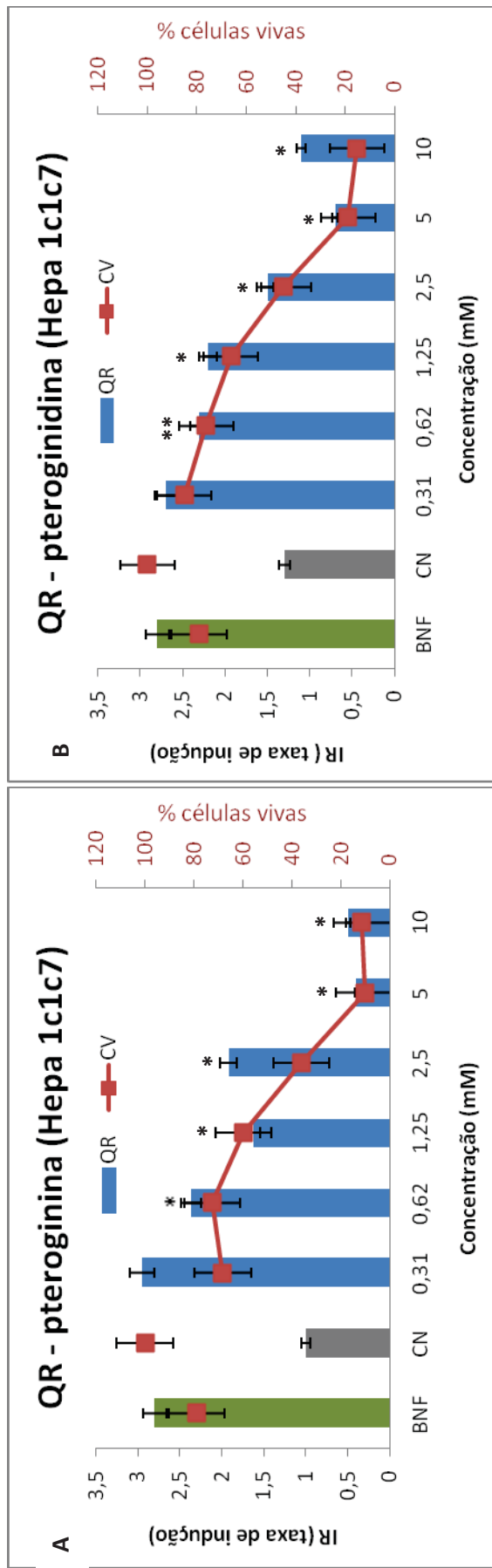
Em resumo, os resultados obtidos demonstraram específica correlação entre a menor expressão de sHLA-G com a condição menos citotóxica de pteroginidina frente ao tratamento da célula tumoral, possivelmente indicando que a baixa regulação dessa molécula não-clássica poderia ser uma estratégia adotada para o tratamento antitumoral, contribuindo dessa forma para a proteção e regressão da malignidade.

#### 5.4. Quantificação da atividade de quinona redutase

Os resultados do ensaio de quinona redutase (QR) encontram-se nas Figuras 12 e 13. As análises para pteroginina (Figura 12A) demonstraram indução (IR) de  $2,9 \pm 0,8$  ( $p < 0,001$ ) na concentração de 0,312 mM e viabilidade celular de  $68 \pm 0,7$  %. Para o alcalóide pteroginidina (Figura 11B) foi observada atividade de quinona redutase na menor concentração testada (0,312 mM) concomitantemente com a maior porcentagem de viabilidade celular ( $86 \pm 1,3$  %), com um índice de indução enzimática de  $2,8 \pm 0,7$  ( $p < 0,001$ ), semelhante ao demonstrado pelo controle positivo  $\beta$ -naftoflavona (BNF).

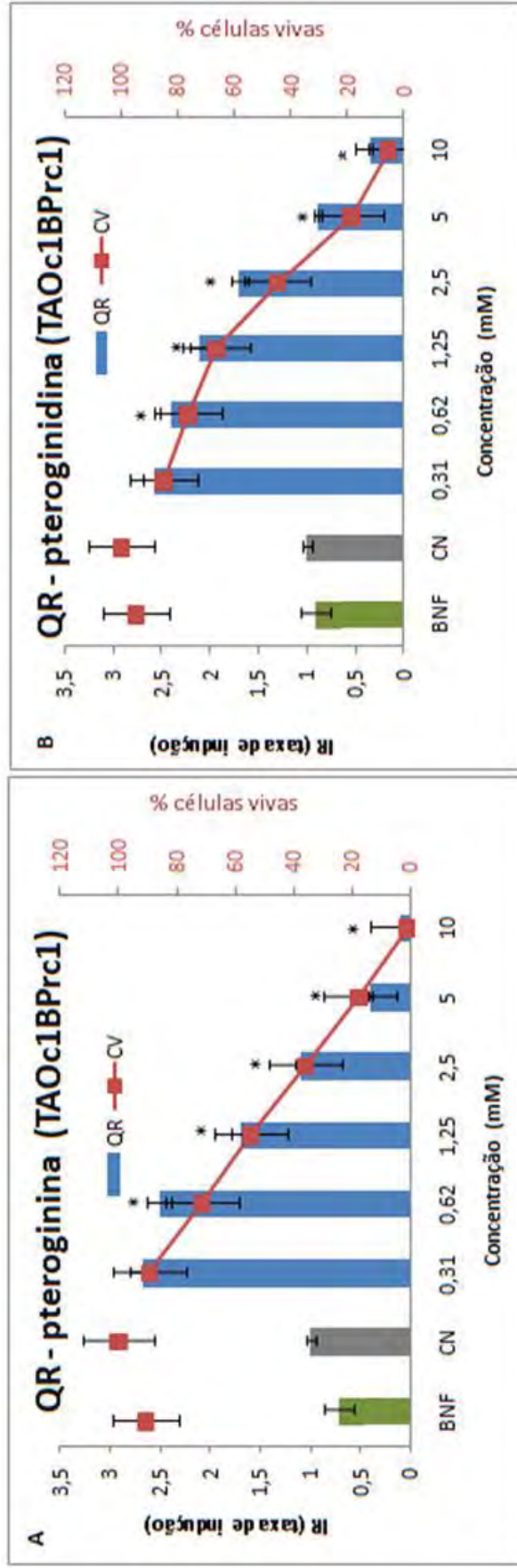
Nenhuma indução foi observada nas maiores concentrações (2,5 a 10mM), uma vez que a viabilidade celular por violeta cristal demonstrou índices de viabilidade celular equivalentes a  $19,9 \pm 1,3$  % no tratamento de 10 mM com alcalóide pteroginidina. Os valores de  $CI_{50}$  foram  $1,5 \pm 0,6$  mM para pteroginina e  $2,2 \pm 0,5$  mM para pteroginidina.

Para determinar a característica da substância em monofuncional ou bifuncional, foi realizado o mesmo ensaio com a linhagem TAOc1BPr1 defeituosa no receptor aril-hidrocarboneto (AhR). Dessa maneira pode-se comparar a capacidade de indução enzimática de uma substância em linhagem selvagem (Hepa1c1c7) com o perfil da indução em linhagem mutante (TAOc1BPr1).



**Figura 12.** Indução da enzima quinona-redutase em células de hepatocarcinoma murino Hepa 1c1c7 por pteroginidina e pteroginidina (tratamento/control) (■) e relação com sobrevivência celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (■) tratadas por 48h. Controle positivo  $\beta$ -naftoflavona (■) a 0,01  $\mu$ M. Controle negativo (■) CD 11,7  $\pm$  0,4  $\mu$ M. (A) pteroginidina. (B) pteroginidina.

\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  quando comparado ao controle positivo  $\beta$ -naftoflavona (BNF).



**Figura 13.** Indução da enzima quinona redutase em células de hepatocarcinoma murino mutantes TAOc1BPrcl por pteroginidina e pteroginidina (tratamento/control) (■) e relação com sobrevivência celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (■) tratadas por 48h. Controle positivo  $\beta$ -naftoflavona (■) a 0,01  $\mu$ M. Controle negativo (■) CD 11,7  $\pm$  0,4  $\mu$ M. (A) pteroginidina. (B) pteroginidina.

\*  $p < 0.001$  quando comparado ao controle positivo  $\beta$ -naftoflavona (BNF).



Os resultados do ensaio de quinona redutase para linhagem mutante TAOc1BPrcl estão mostrados na Figura 13. A princípio, a análise dos resultados demonstraram um perfil semelhante de indução da linhagem Hepalclc7 com a linhagem TAOc1BPrcl, onde notou-se que após o tratamento com pteroginina (Figura 13A) a taxa de indução (IR) foi de  $2,67 \pm 0,5$  ( $p < 0,001$ ) na menor concentração e viabilidade celular de  $89 \pm 0,4\%$ . Os resultados para pteroginidina (Figura 13B) demonstraram maior taxa de indução (IR) de  $2,57 \pm 0,9$  ( $p < 0,001$ ), enquanto que a viabilidade manteve-se com  $84 \pm 0,9\%$  na concentração de 0,312 mM. Da mesma maneira não houve indução nas maiores concentrações da substância onde a viabilidade é baixa. O  $CI_{50}$  para pteroginina foi  $1,4 \pm 0,2$  mM, enquanto que pteroginidina foi de  $2,3 \pm 0,7$  mM.

Contudo diante da semelhança no perfil de indução da enzima quinona redutase podemos sugerir que ambos compostos possuem característica monofuncional. Baseado nessas respostas intracelulares, os alcalóides isolados de *P. nitens* podem ser potenciais agentes quimiopreventivos.

---

## **VI. DISCUSSÃO**

A pesquisa de novos fármacos passou por avanços significativos nos últimos anos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo a realização de várias repetições dos experimentos e propiciando uma análise consistente dos resultados. Os avanços tecnológicos que contribuíram para a busca de novos compostos bioativos referem-se à descoberta de novos alvos moleculares, impulsionados pelas novas ferramentas de biologia molecular, e a evolução de novas técnicas de síntese orgânica, resultando em substâncias ativas mais eficazes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como protótipos de fármacos com atividades farmacológicas semelhantes às originais (HOUGHTON 1996; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER 1996; HOUGHTON 2000; NIELSEN 2002; NEWMAN & CRAGG 2003, 2004).

O uso de produtos naturais como agentes antitumorais tem uma longa história que se iniciou com a medicina popular e através dos anos foi incorporada à medicina alopática. Muitas drogas usadas atualmente na quimioterapia foram isoladas de espécies de plantas ou derivadas de um protótipo natural (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2005). De acordo com Cragg e Newman (2000), cerca de 50% dos fármacos utilizados na clínica com atividade antitumoral foram isoladas de fontes naturais ou relacionadas a elas. Portanto, o uso de produtos naturais representa a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos medicamentos usados na terapia antitumoral (BEZERRA *et al.*, 2008).

A flora brasileira, uma das mais diversas do mundo, é um importante local para a prospecção de novas substâncias devido à diversidade de espécies associada à riqueza química (YOUNES *et al.*, 2007). Sabe-se que plantas da floresta tropical representam uma rica fonte de substâncias potencialmente imunomodulatórias e antitumorais

(SUFREDINI *et al* 2006; SUFREDINI *et al* 2007; WILLIAMS 2001; YOUNES *et al* 2007). Atualmente, em vários laboratórios, uma grande variedade de plantas medicinais tem sido testadas na busca de novos compostos bioativos com propriedades antitumorais (DOS DANTOS *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; MOONGKARNDI *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2005). A determinação desses compostos biologicamente ativos contra células tumorais normalmente se inicia pelos ensaios de viabilidade celular (WINTERS 2006).

A determinação da viabilidade celular é fundamental durante o desenvolvimento das manipulações experimentais, assegurando dessa forma a capacidade de uma determinada população celular responder às substâncias a serem avaliadas. Através do teste de viabilidade, fica garantido que as concentrações dos compostos testados são adequadas e não causam citotoxicidade às culturas celulares. Neste trabalho, utilizando-se linhagens tumorais de carcinoma cervical (HeLa, SiHa e C33A), foram realizados experimentos *in vitro* para a determinação da atividade citotóxica dos alcalóides isolados de *Pterogyne nitens*. O potencial citotóxico dos compostos estudados sobre linhagens tumorais foi avaliado através da técnica colorimétrica de MTT. Primeiramente, foi determinado o  $CI_{50}$  dos compostos e, em seguida, os valores encontrados foram comparados com o da doxorubicina. A doxorubicina possui um imenso valor no tratamento de tumores sólidos e hematológicos, sendo um fármaco utilizado como tratamento de primeira linha para vários tipos de câncer desde sua descoberta em 1971 (PATIL *et al.*, 2008). Este composto foi selecionado como controle nos teste de avaliação da citotoxicidade. Os resultados do presente estudo demonstraram alta toxicidade dos alcalóides guanidínicos. No entanto, concentrações na faixa do  $CI_{50}$  foram estabelecidas e demonstraram que os compostos causam citotoxicidade concentração-resposta. Outras frações e substâncias

ativas de *P. nitens* foram anteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais (HL-60, HCT-8, MDA-MB-435, SF-295) em triagens para pesquisa de novos fármacos antitumorais, demonstraram uma boa correlação nos ensaios de citotoxicidade/inibição do crescimento celular *in vitro*. (REGASINI *et al.*, 2009). O ideal para uma boa substância anticarcinogênica é a indução de morte celular por apoptose. Duarte *et al.*, (2010) demonstraram a atividade citotóxica dos compostos pteroginina e pteroginidina em linhagem de adenocarcinoma de mama (ZR-7531) na qual foi observado a morte celular por apoptose. A apoptose é uma forma altamente regulada de morte celular programada, observada em resposta a numerosos estímulos (BRAS *et al.*, 2005). É caracterizada por alterações no citoesqueleto celular que induzem contração celular, sem perda de integridade da membrana e desprovida de resposta inflamatória (YASUHARA *et al.*, 2003).

Desse modo, este trabalho, é continuidade ao estudo da atividade antitumoral dos alcalóides pteroginina e pteroginidina de *P. nitens*. Para iniciar o estudo foi necessário determinar inicialmente a toxicidade destas substâncias sobre as linhagens tumorais (HeLa, SiHa e C33A) e não tumorais (HaCaT). Os ensaios com ambos os alcalóides isolados de *P. nitens*, foram padronizados nas mesmas condições e concentrações, para tratamentos de 24 horas ( $t_0$ ) e tratamentos de 24 horas seguidos de recuperação de 24 horas ( $t_{24}$ ). Os resultados (Tabela 2) foram analisados e demonstraram ser muito semelhantes nos diferentes tempos ( $t_0$  e  $t_{24}$ ), o que norteou realizar os demais experimentos com sobrenadante da cultura celular no tempo de 24 horas ( $t_0$ ).

Recente estudo, conduzido em nosso laboratório, demonstrou elevada citotoxicidade concentração-resposta e tempo-resposta em linhagens de carcinoma cervical (HeLa e SiHa) e fibroblasto pulmonar (MRC-5) utilizando substâncias isoladas

de *Cryptocarya mandioccana*, em ensaios com período de recuperação de 24, 48 e 72 horas que demonstraram proporcionalmente semelhantes nos diferentes tempos quanto a sua capacidade antiproliferativa (GIOCONDO *et al.*, 2010). Os autores apontam que apenas o tratamento de 24 horas é corresponde aos demais tempos de recuperação, fazendo-se desnecessários os ensaios com diferentes tempos de recuperação (GIOCONDO *et al.*, 2010).

Os resultados com os alcalóides pteroginina e pteroginidina demonstraram ser altamente citotóxicos nas células tumorais de carcinoma cervical (SiHa, HeLa e C33A), bem como para os queratinócitos normais (HaCaT), exibindo valores próximos aos da doxorrubicina. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que os queratinócitos de pele normal (HaCaT) foram os mais sensíveis aos tratamentos com pteroginina, ( $CI_{50} = 0,312$  mM) e pteroginidina, ( $CI_{50} = 0,303$  mM). Considerando que essas substâncias citotóxicas não ocasionaram seletiva morte celular (somente nas células neoplásicas), esses resultados indicam que a aplicabilidade desses compostos é ainda questionável do ponto de vista tóxico às células normais. Atualmente, a busca por novas drogas com maior potência quimioterápica e que desenvolvam menos efeitos tóxicos é constante (DEMAIN & VAISHNAV 2010).

Entre os tipos de compostos obtidos de plantas, os alcalóides têm sido tradicionalmente pesquisados devido à sua pronunciada gama de atividades biológicas (KUTCHAN & DITTRICH 1995). No reino vegetal alcalóides guanidínicos são restritos às famílias Euphorbiaceae e Leguminosae (BOLZANI *et al.*, 1995). Em estudos anteriores, Bolzani *et al.* (1995) analisaram a atividade citotóxica do alcalóide pteroginidina em cepas geneticamente modificadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Este alcalóide foi ativo em cepas mutantes RS321, sugerindo seu potencial como agente antitumoral.

*Pterogyne nitens* (Fabaceae), é uma planta distribuída do sudeste ao sul do Brasil, principalmente na Mata Atlântica e Cerrado (LORENZI 1992). Estudos anteriores demonstraram a atividade citotóxica, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante, antigenotóxica e mutagênica das frações e substâncias isoladas dessa planta (FERNANDES *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2005; REGASINI *et al.*, 2008a; OLIVEIRA *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2010).

Embora a maioria dos estudos com alcalóides tenha como característica química comum grupamentos fenólicos, a pteroginina e pteroginidina isolados de *Pterogyne nitens*, são alcalóides que apresentam em sua estrutura química, nitrogênio e grupamentos de amina e iminas. Alcalóides com grupamentos de amina e anéis indólicos já foram estudados e demonstraram atividade antitumoral, antiviral, antifúngica e antiinflamatória (McNULTY *et al.*, 2007; GRIFFIN *et al.* 2007; BAO *et al.* 2004; DASSONNEVILLE *et al.* 2000; XU *et al.* 2006). Desde a antiguidade compostos nitrogenados são conhecidos pelo seu potencial farmacológico, sendo que algumas substâncias se consagraram como princípios ativos eficazes, como a morfina (hipoanalgésico) e a quinina (antimalárico). Atualmente, fármacos potentes utilizados no tratamento de enfermidades graves como o câncer e o Mal de Alzheimer contêm átomos de nitrogênio, como paclitaxol e galantamina. Compostos contendo núcleo indólico são descritos na literatura por apresentarem a capacidade de inibir/modular enzimas específicas (proteínas quinases), as quais são reguladoras de processos celulares em tecidos e são associadas com ampla variedade de doenças (ISLAM *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 1999). Hidrazonas, contendo núcleo indólico, apresentaram atividade antiinflamatória e analgésica (SONDHI & DINODIA & KUMAR 2006).

Diante dos resultados obtidos, pteroginidina foi o composto mais ativo frente células de carcinoma cervical, seguido pela pteroginina. Os dois alcalóides guanidínicos

diferem apenas na substituição do tipo isoprenílica, com diferentes posições, onde a pteroginidina apresenta padrão de substituição tipo *N,N'*-diisoprenil e a pteroginina padrão de substituição tipo *N,N*-diisoprenil. Realizando uma análise da relação estrutura-atividade, pode-se verificar que o padrão de substituição tipo *N,N'*-diisoprenil do alcalóide pteroginidina o conferiu maior potência, possuindo um  $CI_{50}$  quatro vezes menor para C33A, quando comparado ao  $CI_{50}$  da pteroginina. A partir deste resultado, sugere-se que esse efeito seja devido à maior lipofilicidade da pteroginidina, conferido pelo padrão de substituição tipo *N,N'*-diisoprenil, quando comparado à pteroginina, já que o aumento desta característica aumenta o seu coeficiente de partição. Quanto maior o coeficiente de partição, maior a facilidade de o composto atravessar as biomembranas das células neoplásicas (BARREIRO & FRAGA 2001; BOGO 2009). A modificação da posição de grupos químicos pode conferir não somente modificação de polaridade, bem como a modificação de sua atividade (BANSKOTA *et al.*, 2002; REGASINI *et al.*, 2008a).

É importante considerar que algumas plantas possuem compostos bioativos representando uma fonte de agentes anticancerígenos. Pelo menos 60% desses agentes usados, são derivados de uma forma ou de outra de fontes naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e micro-organismos (CRAGG & NELMAN 2005). Considerando que vários alcalóides isolados de plantas têm sido utilizados como agentes terapêuticos contra o câncer e que existem muitos alcalóides cujo mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, esta pesquisa é necessária para que haja uma melhor compreensão das relações estrutura-atividade e, deste modo, seja possível o desenvolvimento de novas perspectivas terapêuticas e com grande potencialidade (REGASINI *et al.*, 2008c).



No presente estudo, foi observado que as substâncias pteroginina e pteroginidina, isolados de *P. nitens*, possuem atividade imunomodulatórias *in vitro*. Foram obtidos excelentes resultados dos compostos testados, quanto à capacidade dos mesmos demonstrarem atividades antiinflamatórias e pró-inflamatórias, alterando o perfil de modulação de importantes citocinas da resposta inflamatória. Uma vez que a inflamação crônica promove e potencializada o desenvolvimento, o crescimento e a progressão tumoral, é possível prever que um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais agem os produtos naturais, promova o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos, direcionados ao processo inflamatório.

Quanto à atividade inflamatória das substâncias avaliadas no presente estudo, observou-se que ambas possuem capacidade de modular os níveis de citocinas. No tratamento com pteroginina, foi observada significativa diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  em linhagens tumorais SiHa e C33A. A eficácia do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) como um agente anticancerígeno é limitado. Essa limitação pode estar relacionada com a expressão de mecanismos de resistência de síntese protéica que impede a lise de células tumorais por TNF- $\alpha$ . (POWELL *et al.* 1996). De acordo com Powell *et al.* (1990) a terapia envolvendo TNF- $\alpha$  e inibidores de síntese protéica podem ser úteis para o tratamento do câncer cervical. Dessa maneira, o TNF- $\alpha$ , atua como uma citocina pró-inflamatória e apresenta importante papel na regressão de tumores, bem como pode atuar no controle imunológico das displasias cervicais entre mulheres infectadas com HPV de alto risco, como o HPV-16 e HPV-18 (BACHMANN *et al.*, 2002).

Os resultados do presente estudo demonstram que HeLa (HPV-18), não demonstrou susceptibilidade a variação dos níveis de TNF- $\alpha$  após os tratamentos com ambos alcalóides, estabelecendo níveis máximos de 130 pg/mL. Não houve diferença significativa quando comparado ao controle não tratado (Figura 8B e 9B). Em contraste

com esses resultados, Lu *et al.*, (2010) encontraram elevada expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  (cerca de duas vezes mais) após tratamento de 48 horas com alcalóide berberina em sobrenadante da linhagem HeLa. Neste estudo o autor retrata tratamentos de 12, 24, e 48 horas, e que apenas se observa aumento de expressão no tratamento mais longo (48 h). Dessa maneira, seria interessante realizar ensaios com diferentes tempos de tratamento, a fim de verificar expressão de TNF- $\alpha$  nessa linhagem.

Sabe-se que o TNF- $\alpha$  é uma importante citocina regulatória, com funções de imunomodulação e inibição no desenvolvimento tumoral em queratinócitos infectados pelo HPV, que ainda não sofreram transformação maligna, suprimindo a transcrição dos oncogenes virais E6 e E7 (PALLADINO *et al.*, 2003). Estudos *in vivo*, utilizando camundongos Swiis, conduzidos por Lopes *et al.*, (2005) demonstraram a atividade imunomodulatória da fração acetato de etila (AGF) extraída da planta *Alchornea glandulosa*. Neste estudo a fração enriquecida com alcalóides e flavonóides foi capaz de estimular a produção de TNF- $\alpha$ , exibindo atividade antiinflamatória importante para regulação de processos neoplásicos. Segundo Naldini e Carraro (2005) o tratamento com TNF- $\alpha$  resulta na redução da angiogênese e na prevenção da infiltração leucocitária, sugerindo que estas ações podem ser úteis na terapia biológica contra o câncer. Ainda, o TNF- $\alpha$ , pode induzir morte por necrose ou apoptose em algumas células tumorais primárias e em linhagens celulares tumorais (CASRWELL *et al.*, 1975; AGGARWAL & NATARJAN 1996), incluindo linhagens de câncer cervical (LU *et al.*, 2010).

Massad *et al.*, (1991), demonstraram em estudos envolvendo linhagens tumorais cervicais (ME-180, MS751, SiHa, HT-3 e C33A) que o tratamento das linhagens por TNF- $\alpha$  combinada com IFN- $\gamma$  pode maximizar os efeitos de lise celular *in vitro* contribuindo para redução do tumor.

No presente estudo foi observado aumento de IFN- $\gamma$  após o tratamento com pteroginina para HeLa e SiHa e após o tratamento com pteroginidina para HeLa, SiHa e C33A (Tabela 4 e 5). Os resultados do presente estudo, demonstraram conformidade aos apresentados por Fischer *et al.*, (2007) que utilizaram a própolis, (extrato rico em flavonóides obtido de *Baccharis dracunculifolia L.*) que foi capaz de imunomodular os níveis de IFN- $\gamma$  em linhagem celular de baço. Segundo Fernandes *et al.* (2005), a tumorigênese cervical está associada aos tipos oncogênicos HPV-16 e HPV-18 com o predomínio de citocinas da padrão Th2, demonstrado pela redução de IFN- $\gamma$  (padrão Th1). Os interferons (IFNs) consistem em um grupo de proteínas que são importantes nas infecções virais (SAIKIA *et al.*, 2010). O presente estudo avaliou o nível de IFN- $\gamma$  nas células transformadas pelo HPV-16 (SiHa) que produz de 1 a 2 cópias virais (MEISSNER, 1999). No futuro, seria interessante avaliar os níveis de IFN- $\gamma$  em células CaSki que possui cerca de 600 cópias virais de HPV-16 (MEISSNER 1999).

Alguns estudos demonstram que os efeitos principais dos IFN- $\gamma$  é facilitar o reconhecimento de agentes virais pelo sistema imunológico, através do aumento de glicoproteínas de classe I e de classe II pelo Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP). Experimentos *in vivo* demonstram que o IFN- $\gamma$  agem destruindo alvos infectados por vírus, ativando células NK e macrófagos e, inibindo a replicação viral. (YORK & ROCK 1996). Além destas propriedades, existem relatos de que o IFN- $\gamma$  possa inibir o crescimento celular (incluindo atividade antitumoral), bem como a penetração viral em células e o brotamento a partir de células infectadas (PENNA *et al.*, 1994). Os interferons podem afetar a proliferação das células cancerígenas ou induzir a diferenciação das células do tumor (NOMELINI *et al.*, 2007). Estudo conduzido por Kufe & Weichselbaum (2003), demonstraram os efeitos antitumorais de IFN *in vivo*, resultando na ação direta da proliferação celular, bloqueando parcialmente

a translocação celular. Esse bloqueio promove uma significativa redução da síntese protéica, particularmente RNAm, com inibição da indução dos fatores de crescimento celular específicos, podendo gerar efeitos indiretos, tais como a imunomodulação e a inibição da angiogênese do tumor (KUFE & WEICHSELBAUM 2003).

Sabendo-se que o IFN- $\gamma$  aumenta a imunidade celular e estimula a imunidade humoral, a avaliação dos padrões de citocinas na infecção associada ao HPV revela que alterações no equilíbrio das mesmas estão relacionadas ao desenvolvimento dessa infecção (MACIAG & VILLA 1999). Estudos comprovam que vários polimorfismos no gene do IFN- $\gamma$  estariam associados com a susceptibilidade individual para o desenvolvimento do câncer cervical associado à presença do HPV (SONG *et al.*, 2008). A literatura demonstra diversos estudos clínicos associando tratamentos com IFNs em mulheres jovens com infecção pelo HPV (SCHEUNGRABER *et al.*, 2009; LAWSON 2008; VETRANO *et al.*, 2007; FRANCESCHI *et al.*, 2006). Esse fato expressa a necessidade de terapias conservadoras com o IFN, o qual não altera a anatomia do colo e preserva o futuro reprodutivo das pacientes (PENNA *et al.*, 1994; IWASAKA *et al.*, 1990). A eficácia do uso do IFN em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), associada à infecção pelo HPV, já foi descrita em vários estudos (GRISMONDI *et al.*, 1995; STELLATO 1992; SIKORSKI & ZRUBEK, 2003; CAZORLA *et al.*, 2005). Entender como o sistema imune atua na terapêutica com IFN é o primeiro passo na busca de tratamentos que possam controlar ou combater as NICs.

Os resultados aqui apresentados apontam que ambos os alcalóides não foram capazes de alterar a níveis das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-6 na linhagem celular não tumoral epitelial (HaCaT). A semelhança dos níveis de citocinas comparadas com o controle não tratado revela a ausência de mudança das mesmas que permaneceu com níveis basais desses mediadores. Entretanto, quando se compara

HaCaT com as demais linhagens celulares, observou-se que os alcalóides poderiam induzir o aumento das citocinas especificamente nas células tumorais e que não sofrem o efeito citotóxico observado de no ensaio do MTT. Ainda, vale lembrar que em doses não citotóxicas (0,312 mM) a linhagem não tumoral (HaCaT) também não apresentou aumento dos níveis de citocinas. Dessa forma, é importante ressaltar que para os futuros ensaios, concentrações inferiores a usadas neste estudo deverão ser realizados para estabelecer a dose ideal, onde não haja toxicidade celular em células não tumorais.

Embora as linhagens tumorais (HeLa, SiHa e C33A) tenham apresentado maior viabilidade celular após tratamento com os alcalóides pteroginina e pteroginidina em comparação com a linhagem não tumoral (HaCaT), somente foi observada alteração no padrão dos níveis de citocinas nas linhagens tumorais. Aparentemente, este estudo poderia indicar que neste modelo o tratamento com os compostos apresentariam seletividade à células tumorais, o que tornaria vantajoso o tratamento com esses alcalóides. Dados na literatura demonstram que a linhagem HaCaT responde diferentemente a determinadas citocinas como por exemplo para os IFNs, por vias celulares específicas (STAT1 e STAT2) (MAHER *et al.*, 2008). Dessa maneira nos sugerindo propor que a ausência de níveis de citocinas específicas (como IFN- $\gamma$ ) antes e após tratamento é de caráter peculiar da própria linhagem celular (TARTOUR *et al.*, 1999).

A relação entre inflamação crônica e desenvolvimento do câncer já esta bem estabelecida, contudo experimentos atuais demonstram o potencial papel das citocinas antiinflamatórias na ação anticarcinogênica. É certo que as interações entre essas citocinas e as células presentes no microambiente tumoral, incluindo as células tumorais e as células inflamatórias, precisam ainda ser mais bem esclarecidas (NALDINI & CARRARO 2005).

Inter-relacionadas com a citocina TNF- $\alpha$  estão os mediadores IL-6 e IL-1 $\beta$ , sendo que estes podem atuar cooperativamente, sugerindo que estas três citocinas formam uma rede de fatores que afetam a progressão tumoral. Atualmente, há um volume crescente de publicações na literatura sobre o papel das citocinas na regulação de uma variedade de funções em células tumorais (NICOLINI *et al.*, 2006) incluindo a vigilância de neoplasia cervical relacionado a infecção pelo HPV (NOQUEIRA DE SOUZA *et al.*, 2006).

IL-1 $\beta$  induz a proliferação e ativação de macrófagos teciduais, monócitos, células dendríticas, linfócitos B e células NK (DINARELLO 2009). Fibroblastos e células do epitélio geralmente não produzem essa citocina. Entretanto, relatos na literatura demonstram que vários tumores malignos, expressam IL-1 $\beta$  como parte de sua natureza neoplásica, particularmente leucemia mielóide aguda, melanoma, mieloma múltiplo e leucemia mielóide juvenil apresentam expressão constitutiva de RNAm para IL-1 $\beta$  (DINARELLO, 2009). Ainda IL-1 $\beta$  possui a capacidade de aumentar a citotoxicidade e inibir o crescimento *in vivo* das células tumorais cervicais (QIAN *et al.*, 2010). Nos resultados do presente estudo, a maior significância estatística ( $p < 0,01$ ) dos níveis de IL-1 $\beta$ , foi observada nas linhagens SiHa e C33A após o tratamento com pteroginina (Figura 9 C-D). Os níveis dessa citocina foram reduzidos, cerca de duas vezes menos, quando comparado ao controle não tratado (NT). Já para o outro alcalóide nenhuma variação significativa foi observada após o tratamento. Em recente estudo conduzido por Remppis *et al.*, (2010), foi demonstrado que o alcalóide berberina, isolado de *Rhizoma coptidis* não foi capaz de estimular macrófagos murinos RAW 264.7 a produzirem IL-1 $\beta$ . Os autores apontam esse fato ao reduzido número de células e, portanto a baixa secreção de citocinas não atingindo níveis detectáveis IL-1 $\beta$ .

No presente estudo ambos os alcalóides demonstraram a capacidade de inibir os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 conjuntamente nas linhagens HeLa, SiHa e C33A (Tabela 5). A IL-6 por sua vez, é uma citocina-chave para o crescimento tumoral, além de desempenhar função pró-inflamatória e anti-apoptótica em murinos (NAUGLER *et al.*, 2007).

Recente descoberta apontou que IL-4 é um potente inibidor da transcrição do HPV-16, compondo a lista de citocinas com potencial para controlar a infecção por HPV, bem como o desenvolvimento da carcinogênese associada ao vírus (NELMS *et al.*, 1999). Foi a partir desse estudo que houve interesse em associar mais esta citocina (IL-4) com os produtos de origem natural no presente estudo. Os resultados demonstraram que apenas na linhagem HeLa após o tratamento com pteroginina (Figura 8B) foi observada discreto aumento de seus níveis com significância estatística ( $p < 0.01$ ) apenas na concentração de 0,312 mM. De forma geral esse aumento após o tratamento não se mostrou favorável para estabelecer um paralelo com ação anti-inflamatória e antitumoral por esse alcalóide.

Estudo conduzido por Donalisio *et al.*, (2008) demonstrou a baixa regulação de E6 e E7 exercido pela IL-4 em linhagem cervical CaSki, confirmando sua ação repressora na atividade transcricional da região LCR do HPV-16. IL-4 exerce efeito sobre inibição da expressão de genes virais E6 e E7, tornando o vírus insuficiente para ativar p53 e induzir senescência. O presente estudo avaliou o nível de IL-4 nas células transformadas pelo HPV-18 (HeLa) que produz de 10 a 50 cópias virais (MEISSNER 1999) e não possui sua região transcricional intacta. Em futuros estudos, seria interessante avaliar os níveis de IL-4 em células CaSki que possui cerca de 600 cópias virais de HPV-16 e região transcricional intacta. (MEISSNER 1999).

A partir desses resultados acredita-se que esses compostos possuam um papel especial no microambiente tumoral, uma vez que eles inibem simultaneamente o aumento de citocinas pró-inflamatórias.

A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou por meio de supressão de elementos do sistema imunológico (KIRLEY 1999). Este conceito começou a ser formulado em 1976, quando Edward Jenner utilizou a primeira vacina contra varíola humana. Desde então, vários estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias capazes de auxiliar o sistema imune no combate a microrganismos patogênicos, ou ainda em doenças autoimunes e câncer (LABRO 2000).

A imunomodulação exercida pelos alcalóides de *P. nitens* no presente estudo, demonstraram tanto perfil estimulador quanto supressor a determinados eventos da resposta imune celular. Esses resultados demonstram que o tratamento com as substâncias podem ser potencialmente aplicável como agente imunoestimulante, ou no combate a processos inflamatórios indesejáveis presentes nos tumores. Porém esses dados indicam a necessidade de ampliação dos estudos relacionados às propriedades bioativas da *P. nitens*, visando o esclarecimento da relação estrutura-atividade e perfil imunomodulatório *in vivo*.

Apesar de poucos estudos abordarem a influência de alcalóides guanidínicos sobre o sistema imunológico, os resultados do presente estudo são complementares a outros que já demonstraram excelentes atividades biológicas com esses compostos (por exemplo: morte por apoptose e atividade anti-angiogênica). Estes estudos demonstram que apesar da grande diversidade química entre as substâncias de *P. nitens* utilizadas, os alcalóides possuem a mesma estabilidade e perfil de atividade biológica (DUARTE *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2009). Nenhum estudo aparentemente foi realizado com



linhagens celulares cervicais *in vitro*, tratadas com alcalóides pteroginina e pteroginidina, e o perfil de citocinas. Assim, o presente estudo demonstra resultados inéditos frente à literatura internacional.

Desse modo, os resultados indicam o potencial do alcalóide pteroginina como agente antiinflamatório e ainda esta de acordo com outras informações observadas na literatura, onde vários efeitos de produtos naturais na inflamação são explicados. Muitas plantas e compostos são tradicionalmente utilizados no tratamento do câncer e exibem atividade antitumoral através de múltiplos processos independentes, como por exemplo, efeitos na expressão gênica, na sinalização celular ou em atividades enzimáticas. Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* de compostos isolados de plantas, demonstram ser potenciais agentes antiinflamatórios, como por exemplo: *Artemisia annua*, *Viscum album*, *Curcuma longa*, *Scutellaria baicalensis*, resveratrol e proantocianinas (extrato de semente de uva), *Magnolia officinalis*, *Cammelia sinensis* (chá verde), *Ginkgo biloba*, quercetina, *Poria cocos*, *Zingiber officinalis* (gingibre), *Panax ginseng*, *Rabdosia rubescens*. (HUANG *et al.*, 1993; ORHAN *et al.*, 2006; KUMAR; PRAKASH; DOGRA 2011; LEE *et al.*, 2008).

Uma potencial vantagem dos fitoquímicos é que eles são capazes de agir em múltiplas vias de sinalização celular, desse modo, podem reduzir o desenvolvimento de resistência nas células tumorais (SAGAR *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que o extrato de chá verde e seu principal componente, epigallocatequina-3-galato (EGCG), apresentam atividades anti-angiogênicas em vários modelos experimentais (YOKOYAMA *et al.* 2004). Os efeitos antitumorais apresentados pelo EGCG incluem a prevenção da carcinogênese cervical, indução de apoptose, inibição de telomerase e desregulação do ciclo celular (ZHANG *et al.*, 2006). Noguchi *et al.*, (2006) demonstraram que esses efeitos também foram observados em linhagens celulares de

adenocarcinoma cervical, com supressão da expressão da proteína Ki-67. Outros efeitos incluem a inibição da proteína HIF-1 $\alpha$ , com conseqüente inibição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que apresentam papel na angiogênese tumoral. Tang *et al.*, (2008) encontraram inibição da expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  induzida pelas oncoproteínas do HPV-16, e diminuição da proteína VEGF e RNAm em células cancerígenas cervicais humanas. Com esses achados, os autores sugerem que o extrato de chá verde e EGCG possam ser utilizados no contexto de prevenção de lesões pré-malignas e do câncer e como terapia anti-câncer.

Considerando a linha de pesquisa do nosso grupo e procurando melhor investigar os efeitos antitumorais e antiinflamatórios dos alcalóides de *P.nitens*, foram avaliados os níveis da molécula HLA-G solúvel nas linhagens não tumorais e tumorais. O presente estudo aparentemente é inédito na avaliação de HLA-G solúvel em linhagens celulares cervicais (HeLa, SiHa e C33A) associado a produtos de origem natural (Figura 11). A molécula HLA-G pode ser induzida em situações tais como transplantes, doenças inflamatórias, esclerose múltipla, infecções virais e ainda esta associada ao caráter imunossupressivo e imunomodulatório na carcinogênese (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007).

Recentemente, passou-se a estudar o papel do HLA-G nas doenças inflamatórias, ressaltando a possibilidade da molécula transformar a resposta celular Th1 em resposta Th2, onde o HLA-G agiria como uma molécula protetora nas respostas inflamatórias teciduais (REBMANN *et al.*, 2007). A elevada expressão dessa molécula é associada ao aumento de citocinas Th1, como IFN- $\gamma$ , enquanto citocinas Th2 (IL-4, IL-10) podem promover a manutenção e a progressão da infecção viral (NGUYEN *et al.*, 2001; BOLPETTI *et al.*, 2010). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos imunomoduladores de HLA-G, *in vitro*. Dessa maneira, estudos são

direcionados à avaliação da expressão da molécula HLA-G em tumores, uma vez que sua modulação negativa poderia constituir uma nova abordagem terapêutica para limitar a progressão do tumor. Os resultados obtidos no presente estudo apontam alterações relevantes nos níveis da molécula HLA-G solúvel apenas na linhagem celular de corioncarcinoma (JEG-3) após o tratamento com pteroginidina. As demais linhagens celulares (HeLa, SiHa, C33A e HaCaT) não apresentaram expressão dessa molécula. A regulação positiva (maiores níveis de HLA-G) ou negativa (diminuição ou ausência de HLA-G) tem sido atualmente alvo de importantes estudos relacionados à atividade antitumoral.

Com relação à regulação positiva de HLA-G, estudo prévio demonstra o aumento da expressão de moléculas HLA-G associado à carcinogênese de ovário (ROUAS-FREISS *et al.*, 2007). Em relação aos níveis de HLA-G em lesões cervicais associadas ao HPV, recentes estudos demonstram a baixa expressão dessa molécula associada ao grau de diferenciação da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC1-2-3) e lesões cervicais invasivas (ICC) (GONÇALVES *et al.*, 2008; GUIMARAES *et al.*, 2010). Contudo, Dong *et al.* (2010), demonstrou que a molécula HLA-G é altamente expressa na carcinogênese cervical de maneira independente do grau de neoplasia intra-epitelial cervical. No presente estudo foi observada a diminuição dos níveis de HLA-G solúvel na linhagem celular de coriocarcinoma (JEG-3), corroborando com os resultados apresentados por Gonçalves *et al.* (2008) e Guimaraes *et al.*, (2010).

De fato, a capacidade da molécula HLA-G ser altamente expressa em linhagem de corioncarcinoma (JEG-3) foi correspondente ao esperado no estudo na qual observou-se a diminuição dos níveis de HLA-G solúvel nas menores concentrações do tratamento com pteroginidina. Essa linhagem trofoblástica, apresenta altos níveis de HLA-G constitutivamente, sendo utilizado em vários estudos como controle positivo (PAUL, *et*

*al.*, 1998; POLÁKOVA & RUSS 2000). Porém era esperado que nas linhagens cervicais houvessem picos de expressão de sHLA-G (POLÁKOVA & RUSS 2000). Até o momento não existem estudos na literatura demonstrando a expressão da molécula HLA-G solúvel nas linhagens celulares do presente estudo. Apesar dessas linhagens celulares cervicais (HeLa, SiHa, C33A) apresentarem características compatíveis genótípicas com os tecidos tumorais cervicais, no presente estudo não foi observado a diferença dos níveis da molécula HLA-G nessas linhagens.

Na revisão bibliográfica efetuada não foi encontrado relatos a cerca da atividade imunomodulatória e antitumoral da molécula HLA-G solúvel por produtos de origem natural, evidenciando que o presente estudo é inédito para o alcalóide pteroginidina. Em paralelo com os resultados de expressão de HLA-G, foi realizado o ensaio de citotoxicidade por MTT. Os resultados demonstraram que houve citotoxicidade dose resposta para o alcalóide pteroginidina e que em concentrações não citotóxicas houve menor expressão de HLA-G solúvel. Os níveis basais de HLA-G nas maiores concentrações poderiam estar associados à maior morte celular. Na continuidade do presente estudo, dever-se-á avaliar os níveis protéicos de HLA-G de membrana plasmática, ou a expressão de mRNA, para melhor caracterizar a expressão dessa molécula após o tratamento com o alcalóide de *P.nitens*.

Embora, os resultados não demonstrem alteração nos níveis de HLA-G solúvel, pelo ensaio de ELISA, nas maiores concentrações de tratamento com pteroginidina as linhagens cervicais, mantiveram seus níveis basais equiparados com as das células não-tratadas.

Recente estudo, utilizando diferente metodologia (imuno-histoquímica) demonstrou o aumento de expressão de HLA-G solúvel em lesões cervicais (DONG *et al.*, 2010). Contudo, as diferenças de metodologias apontadas não são suficientes para

justificar as diferenças nos resultados. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que somente nas menores concentrações de tratamento onde houve baixa citotoxicidade os níveis da molécula HLA-G solúvel apresentaram-se diminuídos.

HLA-G apresenta regulação temporal bem marcada na gravidez, havendo elevada expressão no início e diminuição da expressão no terceiro trimestre de gestação (GERAGHTY *et al* 1987; KOVATS *et al* 1990). Na situação patológica (câncer e inflamação), a ativação da expressão gênica e protéica de HLA-G está sob influência do microambiente tissular (UROSEVIC *et al.*, 2003). A expressão da molécula HLA-G pode ser perdida em culturas primárias que permanecem tempo prolongado em cultivo (SOLIER *et al* 2001). No presente estudo, procurou-se tratar as linhagens celulares na 3ª passagem, evitando que os níveis da molécula HLA-G fossem diminuídas ou ausentes.

Um certo número de citocinas e hormônios produzidos (por exemplo GM-CSF, IL-10, IFN, glicocorticóides, progesterona, TNF) durante a gravidez ou presentes no microambiente tumoral são moduladores da expressão de HLA-G (ONNO *et al.*, 2000; UROSEVIC *et al.*, 2001; MOREAU *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 1996; LEFEBVRE *et al.*, 2001; MOREAU *et al.*, 2001; YIE *et al.*, 2006a; YIE *et al.*, 2006b). Similarmente, condições de stress (choque térmico, arsênico, hipoxia) podem modular também a transcrição do gene *HLA-G* (ZIDI *et al.*, 2006; IBRAHIM *et al.*, 2000; KILBURN *et al.*, 2000).

Principalmente extratos ou substâncias isoladas de plantas têm sido frequentemente avaliados quanto ao seu potencial antitumoral. Pelo fato de muitos fármacos antitumorais apresentarem estrutura alcaloídica, atualmente estão sendo isolados alcalóides nunca antes estudados a fim de verificar os seus possíveis efeitos sobre doença tumorais (SILVA *et al.*, 2009). Neste contexto, os resultados dos ensaios biológicos com os alcalóides pteroginina e pteroginidina demonstraram possuir

potenciais alvos terapêuticos no controle e tratamento do câncer cervical associado ao HPV, demonstrando capacidade citotóxica, antiproliferativa e antiinflamatória.

Atualmente em fase de finalização estudos *in vivo* com implante xenográfico em camundongos NUDE Balb-c têm sido conduzidos pelo nosso laboratório. Nesse estudo os tumores sólidos de origem cervical (SiHa HPV-16) após doses de nitensidina A (alcalóide isolados da *P. nitens*) diminuem o tamanho da massa tumoral, sugerindo eficácia do tratamento. Análises patológicas, perfil de morte celular e ação genotóxica estão atualmente sendo conduzida pela mestrandia Juliana Sorbo-Bozeto, a fim de complementar este trabalho.

Pode-se dizer ainda, que outros estudos estão sendo conduzidos para avaliar os mecanismos pelos quais os compostos testados inibem a inflamação e progressão tumoral, aperfeiçoando seus efeitos terapêuticos da planta *P. nitens*. Através de uma análise geral de todos os resultados, observou-se que todos os compostos testados exibem atividades biológicas, sejam elas, antiinflamatórias ou antitumorais. Contudo, outros estudos são necessários para avaliar se esses compostos poderiam ser combinados (análise de sinergismo), possibilitando assim maior potência como agente terapêutico útil ao tratamento do câncer e inflamação. Além disso, o presente estudo proporcionou uma melhor compreensão das ações farmacológicas de compostos de *P. nitens*, ressaltando a importância da biodiversidade e também contribuindo para o entendimento da relação entre alcalóides e plantas medicinais.

De acordo com o trabalho publicado por Fernandes *et al.*, (2008) as folhas de *P. nitens* contém ainda uma mistura de polifenóis, especialmente flavonóides e ácidos fenólicos, que demonstraram atividade antioxidante em ensaios de DPPH e MPO. De acordo com esses resultados esses compostos podem ser usados como potenciais

agentes quimiopreventores para doenças cardiovasculares, câncer, doenças degenerativas, assim como tratar inflamações e envelhecimento cutâneo, uma vez que essas substâncias antioxidantes combatem os radicais livres. (FERNANDES *et al.*, 2008).

Pouco se conhece sobre a atuação dos alcalóides pteroginina e pteroginidina frente quanto à atividade quimiopreventiva. No presente estudo, a atividade da enzima quinona redutase esteve duas vezes aumentada na menor concentração (0,312 mM) quando comparada ao controle positivo  $\beta$ -naftoflavona (BNF). Esse aumento é uma evidência da atividade de quimioprevenção dos compostos testados. O presente estudo demonstrou que os alcalóides pteroginina e pteroginidina induzem a duplicação da enzima quinona redutase e concomitantemente o valor de  $CI_{50}$  não demonstra citotoxicidade (Figura 11). A atividade indutora desta enzima foi observada para pteroginina (IR=2,9 $\pm$ 0,8) e pteroginidina (IR=2,8 $\pm$ 0,7) na linhagem de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) sem, contudo causar toxicidade celular com viabilidade para pteroginina de 68 $\pm$ 0,7% e para pteroginidina de 86 $\pm$ 1,3%. Esses resultados demonstram a baixa toxicidade celular para ambos os alcalóides nas menores concentrações em linhagem Hepa1c1c7 correspondentes a presença de atividade de quinona redutase (PROCHASKA & SANTAMARIA 1988).

Esses resultados são relevantes no estudo de prevenção de câncer, uma vez que essa atividade, proveniente de produtos naturais pode contribuir para o tratamento e prevenção do câncer (YANG *et al.*, 2009). Os agentes indutores de enzimas de detoxificação são classificados como monofuncionais e bifuncionais, respectivamente pela sua capacidade de induzir seletivamente as enzimas da fase II, ou de induzir ambas as enzimas das fases I e II (PROCHASKA & TALALAY 1988).

A redução de quinonas eletrofílicas pela quinona redutase se constitui numa via importante de detoxificação e o seu grau de atividade pode ser inferido através da indução em células da linhagem de hepatocarcinoma murino Hepa1c1c7. A indução de enzimas da fase II pode proteger os sistemas biológicos contra espécies químicas tóxicas e reativas, e estudos recentes demonstram que a elevação dessas enzimas, como a NADPH: quinona redutase e GST (Glutathione *S*-transferase) estão correlacionadas com a proteção celular nos estágios iniciais e intermediários contra a carcinogênese induzida por agentes químicos em modelos animais (WATTENBERG 1985; SONG *et al.*, 1999; CUENDET *et al.*, 2006).

A fim de determinar a característica de indução enzimática, o presente estudo avaliou a capacidade de indução de ambos os alcalóides na linhagem mutante. A linhagem TAOc1BPr1 é defeituosa no receptor de aril-hidrocarbonetos (AhR), apresentando seletividade aos indutores monofuncionais que estão representados pelos compostos utilizados no presente estudo (GERHÄUSER *et al.*, 1997). Dessa forma foi possível observar que os alcalóides pteroginina (IR=2,67±0,5) e pteroginidina (IR=2,57±0,9) induziram QR na linhagem mutante TAOc1BPr1, na qual foi possível observar duplicação da atividade indutora sem contudo ocasionar toxicidade celular, caracterizando os compostos como indutores monofuncionais. Pode-se dizer que os alcalóides pteroginina e pteroginidina podem ser protótipos para agentes quimiopreventivos, contribuindo para inibir a instalação de eventos iniciais associados à etiologia do câncer.

Outros ensaios de indução dos elementos de resposta antioxidante ARE (*Antioxidant Responsive Elements*) deverão ser empregados para avaliar a atividade destas substâncias sobre a etapa do início da carcinogênese, além de ensaios complementares de inibição de NF-κB e aromatase, somados aos ensaios de inibição



das enzimas COX-1 e COX-2 para avaliar a atividade quimipreventiva sobre a etapa de promoção e progressão da carcinogênese (CUENDET *et al.*, 2005 ; MORAIS *et al.*, 2010).

Portanto, as atividades descritas nesse trabalho, somadas às atividades inflamatórias, antioxidantes, apoptóticas e antitumorais relatada para pteroginina e pteroginidina isoladas de *P. nitens* são evidências que sustentam a escolha destas substâncias para estudos relacionados ao desenvolvimento de agentes terapêuticos e quimiopreventivos úteis ao controle de processos cancerígenos (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON 1995; VELLOSA 2005; REGASINI *et al.*, 2008a; LOPES *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2010).

---

## VII. CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que:

- Ambos os alcalóides demonstraram citotoxicidade concentração-resposta para as linhagens HeLa, SiHa, C33A e HaCaT, (t0 e t24)
- Os resultados sugerem que ambas as substâncias possuem potencial imunomodulador de citocinas em células de carcinoma cervical infectadas por HPV;
- Pteroginidina diminui os níveis da molécula HLA-G solúvel em linhagem celular JEG3 em condições não-citotóxicas e pode ser considerado o primeiro composto de origem natural a conferir este efeito. Entretanto, não foi observado o aumento de HLA-G solúvel nas linhagens cervicais (HeLa, SiHa, C33A e HaCaT);
- Diante da semelhança no perfil de indução da enzima quinona redutase, podemos sugerir que ambos compostos possuem característica monofuncional.

---

## **VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; POBER, J. The Major Histocompatibility Complex. **Cellular and Molecular Immunology**. 1994. 2nd edition.

AGGARWAL, B. B.; NATARJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Cytokine Netw.**, v.7, p.93-124, 1996

AGARWAL, A.; RANI, M.; SAHA, G. K.; VALARMATHI, T. M.; BAHADUR, S.; MOHANTI, M.; DAS, S.N. dysregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. **Immunol. Invest.**, v.32, n.2, p.17-30, 2003.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K., SETHI, G. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochem Pharmacol.**, v.72, p.1605-1621, 2006.

BACHMANN, A.; HANKE, B.; ZAWATZKY, R.; SOUTO, U.; VAN RIGGELEN, J.; ZUR HAUSEN, H. Disturbance of tumor necrosis factor alpha-mediated beta interferon signaling in cervical carcinoma cells. **J. Virol.**, v.76, p.280-291, 2002.

BANSKOTA, A. H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L. Y.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J. Ethnopharmacol.**, v. 80, p.67-73, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. **Química Medicinal**. Porte Alegre, RS: Artmed Editora, 2001.

BAO, B.; SUN, Q.; YAO, X.; HONG, J.; LEE, C. O.; SIM, C. J.; IM, K. S.; JUNG, J. H. Citotoxic bisindole alkaloids from a marine sponge *Spongosorites* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p: 711-715, 2004.

BEZERRA, D.P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LATUFO, L. V. In vitro and in vivo

antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**, v.28, p.158-63, 2008.

BOGO, D. Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica do ácido lacanórico e de seus produtos de modificação estrutural. **Dissertação**. 2009. Universidade Federal de Mato Grosso do sul, Campo Grande, MS.

BOLPETTI, A.; SILVA, J. S.; VILLA, L. L.; LEPIQUE, A. P. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC Immunol.**, v.7, p.11-27, 2010.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.** v.58, p. 1683, 1995.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N., Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **An. Acad. Bras.**, 1999.

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

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

BUKART, A. Las Leguminosas Argentinas. **Aemé Agency**, Buenos Aires, 1952.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.72, p.3666-3670, 1975.

CAROSELLA, E. D. HLA-G molecule: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv. Immunol.**, v.81, p.199-252, 2003.

CAROSELLA, E. D. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v.111, n.10, p.4862-4870, 2008.

CAROSELLA, E. D.; LEMAULT, J. HLA-G: a look back, a look forward. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.2, p.1-4, 2010.

CAZORLA, E.; URGAL, A.; CÓRDOBA, J.; BOLDÓ, A.; MARÍN, M.; SÁNCHEZ GUTIÉRREZ, M. Immunomodulatory treatment with beta-interferon in patients with cervical intraepithelial neoplasia and Human Papillomavirus infection: long-term follow-up. **Rev. Esp. Quimioter.**, v.18, n.1, p. 26-31, 2005.

CHEAH, P. L.; LOOI, L. M. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: A review. **Malays. J. Pathol.**, v. 20, p. 1-10, 1998.

CLEMENTS, C. S. Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding. **Hum. Immunol.**, v.68, n. 4, p.220-226, 2007.

CONGER, K. L.; LIU, J. S.; KUO, S. R.; CHOW, L.T.; WANG, T. S. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. **J. Biol. Chem.**, v.274, p. 2696-2705, 1999.

CRAGG, G. M.; BOYD, M. R.; CARDELLINA, J. H.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M.; McCLOUD, T. G. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. **Ciba Found Symp.**, v.185, p.178-190, 1994.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.** v.60, p.52-60, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, v.9, p.1-15, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p.72-79, 2005.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem Rev.**, v.109, p.3012-3043, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T.H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E.A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potencial of plants used in Blangladeshi folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.21-30, 2005.

CUENDET M.; OTEHAM C. P.; MOON R C.; PEZZUTO J. M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **J. Nat. Prod.**, v.69, p.460-463, 2006.

CUENDET, M.; GUO, J.; LUO, Y.; CHEN, S.; OTEHAM, C. P.; MOON, R. C.; VAN BREEMEN, R. B.; MARLER, L. E.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity and metabolism of isoliquiritigenin, a compound found in licorice. **Cancer Prev. Res.**, v.3, p.221-32, 2010.

D'ANDRILLI, G.; BOVICELLI, A.; GIORDANO, A. HPV Vaccines: Stages of the Art. **J. Cell. Physiol.**, v.224, p.601-604, 2010.

DASSONNEVILLE, L.; LANSIAUX, A.; WATTELET, A.; WATTEZ, N.; MAHIEU, C.; MIERT, S. V.; PIETERS, L.; BAILLY, C. Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v.409, p.9-18, 2000.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat. Rev. Câncer**, v.6, p. 24–37, 2006.



DELIGEOROGLOU, E.; CHRISTOPOULOS, P.; ARAVANTINOS, L.; PAPADIAS K. Human papilloma vírus molecular profile and mechanisms of cancerogenesis: a review. **Eur. J. Gynaecol Oncol.**, v.30, n. 2, p.128-132, 2009.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; HOLTZCLAW, W.D.; COLE, R. N.; ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; YAMAMOTO, M.; TALALAY, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.99, p.11908-11913, 2002.

DEMAIN, A.L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microb. Biotechnol.**, doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00221, 2010.

DINARELLO, C. A. Immunological anti-inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu. Rev. Immunol.**, v.27, p.519–50, 2009.

DONALISIO, M.; CORNAGLIA, M.; LANDOLFO, S.; LEMBO, D. TGF- $\beta$ 1 and IL-4 downregulate human papillomavirus-16 oncogene expression but have differential effects on the malignant phenotype of cervical carcinoma cells. **Virus Res.**, v.132 p.253–256, 2008.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin. Sci.**, v.110, p.525-541, 2006.

DOS SANTOS, P. A.; AMARANRE, M. F.; PEREIRA, A. M.; BERTONI, B.; FRANCA, S.C.; PESSOA, C.; DE MORAIS, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PEREIRA, M. R.; LOPES, N. P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chem. Pharm. Bull.**, v.52, n.12, p.1433-1435, 2004.

DONG, D. D.; YANG, H.; LI, K.; XU, G.; SONG, L. H.; FAN, X. L.; JIANG, X. L.; YIE, S. M. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical lesions: association with cancer progression, HPV 16/18 infection, and host immune response. **Reprod. Sci.**, v.17, p.718-23, 2010.

DOWNS-KELLY, E.; SCHADE, A.; HANSEL, D. The role of HLA-G in gastrointestinal inflammatory disease and malignancy. **Semin Cancer Biol**; 17: 451-58, 2007.

DUARTE, R. A.; MELLO, E. R.; ARAKI, C.; MORAIS, M. C. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, T. G. A.; SOARES, C. P. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induces apoptosis in malignant breast cancer cell line. **Tumour Biol.**, v.31, p.513-522, 2010.

FAHEY, J. W.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. The "Prochaska" microtiter plate bioassay for inducers of NQ01. **Meth. Enzymol.**, v.382, p.243-258, 2004.

FERNANDES, A. P. M.; GONÇALVES, M. A. G.; DUARTE, G.; CUNHA, F. Q.; SIMÕES, R. T.; DONADI, E. A. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. **Virology**, v.334, p.294-298, 2005.

FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M.; SIQUEIRA, D. H. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.56, n. 5, p. 723-726, 2008.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; DUMMER, L. A.; VARGAS, L.D.; HÜBNER, S. O.; DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1, **Vaccine**, v.25, p.1250-1256, 2007.

FRANCESCHI, S.; HERRERO, R.; CLIFFORD, G. M.; SNIJDERS, P. J.; ARSLAN, A.; ANH, P. T. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. **Int. J. Cancer**, v.119, n.11, p. 2677-2684, 2006.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.84, n.24, p.9145-9149, 1987.

GERHÄUSER, C.; YOU, M.; LIU, J.; MORIARTY, R. M.; HAWTHORNE, M.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug metabolizing enzymes. **Cancer Res.**, v.57, p.272-278, 1997.

GIOCONDO, M. P.; BASSI, C.L.; TALASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; AGUSTONI, D.; MELLO, E. R.; SOARES C. P. Cryptomoscatone D2 from *Cryptocarya mandiocana*: citotoxicity against human cervical carcinoma cell line. **J. Basic and Applied Pham. Sci.**, v.30, p.315-322, 2010.

GRIFFIN, C.; SHARDA, N.; SOOD, D.; NAIR, J.; MCNULTY, J.; PANDEY, S. Selective cytotoxicity of Pancreatistatin-relates natural *Amaryllidaceae* alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. **Cancer Cell International**, v. 7, n.1, p: 01-07, 2007.

GRISMONDI, G.L.; MASIN, G.; MARINI, A. Interferon in the therapy of cervico vaginal papilloma virus (HPV) infection associated with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). **Minerva Ginecol.**, v.47, p.527-529, 1995.

GROSS, H. B.; DALEBOUT, T.; GRUBB, C.D.; ABEL, S. Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. **Plant. Sci.**, v.159, p.265-272, 2000.

GONÇALVES, M. A.; DONADI, E. A. Immune cellular response to HPV: Current concepts. **Braz. J. Infec. Dis.**, v.8, n.1, p.1-9, 2004.

GONÇALVES, M. A.; LE DISCORDE, M.; SIMÕES, R. T.; RABREAU, M.; SOARES, E. G.; DONADI, E. A.; CAROSELLA, E. D. Classical and non-classical HLA molecules and p16INK4a expression in precursors lesions and invasive cervical cancer. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Biol.**, v.141, p.70-74, 2008.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural products characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.55, p.74-82, 2011.

GUIMARÃES, M. C.; SOARES, C. P.; DONADI E. A.; DERCHAIN, S. F.; ANDRADE, L. A.; SILVA, T. G.; HASSUMI, M. K.; SIMÕES, R. T.; MIRANDA, F. A.; LIRA, R. C.; CRISPIM, J.; SOARES, E. G. Low expression of human histocompatibility soluble leukocyte antigen-G (HLA-G5) in invasive cervical cancer with and without metastasis, associated with papilloma virus (HPV). **J. Histochem. Cytochem.**, v.58, p.405-11, 2010.

HAMBURGER, M; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Search for new drugs of plant origin. In: **Advances in Drug Research**, Academic Press, v.20, 1991.

HARTWELL, J. L. Plants used against cancer: a survey. **Quarterman Publications.**, p.438-439, 1982.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v.13, n.19-20, p.894-901, 2008.

HEISE, A. The Clinical Significance of HPV. **Nur. Practit.**, v. 28, p. 8-19, 2003.

HORVATH, C. A. J.; BOULET, G. A. V.; RENOUX, V. M.; DELVENNE, P. O.; BOGERS, J. J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology J.**, v.7, p.1-7, 2010.

HOUGHTON, P. J. Compounds with anti-HIV activity from plants. **Transactions from the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, p.601-604, 1996.

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytother. Res.**, v.14, p.419-423, 2000.

HUANG, Y.; HAGER, E. R.; PHILLIPS, D. L.; DUNN, V. R.; HACKER, A.; FRYDMAN, B.; KINK, J. A.; VALASINAS, A. L.; REDDY, J. A.; MARTON, L. J.; CASEROP J. R., R. A.; DAVIDSON, N. E. A novel polyamine analog inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p: 2769-2777, 2003.

HUANG, L.; LIU, J. F.; LIU, L. X.; LI DF, ZHANG, Y.; NUI, H. Z.; SONG, H. Y.; ZHANG, C. Y. Antipyretic and anti-inflammatory effects of *Artemisia annua* L. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.**, v.18, p.63-4, 1993.

HWANG, E. S.; NOTTOLI, T.; DIMAIO, D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. **Virology**, v. 211, p. 227-233, 1995.

IBRAHIM, E. C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. **Cell. Stress Chaperones.**, v. 5, p.207-18,2000.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas e incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 05/06/2011.

KANG, Y. H.; PEZZUTO, J. M. Induction of quinone reductase as primary screen for natural product anticarcinogens. **Meth. Enzymol.**, v.382, p.380-414, 2004.

ISLAM, I.; BROWN, G.; BRYANT, J.; HRVATIN, P.; KOCHANNY, M. J.; PHILIPS, G. B.; YUAN, S.; ADLER, M.; WHITLOW, M.; LENTZ, D.; POLOKOFF, M. A.; WU, J.; SHEN, J.; WALTERS, J.; HO, E.; SUBRAMANUAM, B.; ZHU, D.; FELDMAN, R. I.; ARNAIZ, D. O. Indolinone based phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors. Part 2: optimization of BX-517. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 17, p. 3819-3825, 2007.

IWASAKA, T.; HAYASHI, Y.; YOKOYAMA, M.; HACHISUGA, T.; SUGIMORI, H. Interferon gamma treatment for cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, v.37, n.1, p.96-102, Apr.1990.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KILBURN, B. A.; WANG, J.; DUNIEC-DMUCHOWSKI, Z. M.; LEACH, R. E.; ROMERO, R.; ARMANT, D. R. Extracellular matrix composition and hypoxia regulate the expression of HLA-G and integrins in a human trophoblast cell line. **Biol. Reprod.**, v.62, p.739-47, 2000.

KIM, K. H.; KIM, Y. S. Role of HPV and p53 suppressor gene in cervical carcinogenesis. **Yonsei Med.**, v.36, p.412-425, 1995.

KIRKLEY, S. A. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.6, n.5, p.652-657, 1999.

KOVATS, S.; MAIN, E. K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S. J.; DEMARS, R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v.248, p.220-3, 1990.

KUFE, D.; WEICHSELBAUM, R. Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology. **Cancer Biol. Ther.**, v.2, n.4, p. 326-329, 2003.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; DOGRA, S. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*) against D-galactose-induced senescence in mice. **J. Asian. Nat. Prod. Res.**, v.18 p.42-55. 2011.

KUNDU J, K.; SURH, Y. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutat. Res.**, v.659, p.15-30, 2008.

KUTCHAN, T. M.; DITTRICH, H. Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. **J. Biol. Chem.**, v.270, n. 41, p. 24475–24481, 1995.

LABRO, R. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, n.4, p.615-650, 2000.

LAWSON, M. A. Human papillomavirus infection in adolescent and young women. **Mo. Med.**, v.105, n.1, p. 42-46, 2008.

LEDWABA, T.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic cascade. **Biol. Chem.**, v. 385, p. 671–682, 2004.

LEE, J. H.; LEE, J. H.; LEE, Y. M.; KIM, P. N.; JEONG, C. S. Potential analgesic and anti-inflammatory activities of *Panax ginseng* head butanolic fraction in animals. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, p.3749-52, 2008.

LEFEBVRE, S.; BERRIH-AKNIN, S.; ADRIAN, F.; MOREAU, P.; POEA, S.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p.6133-9,2001.

LILA, N. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. **Lancet**, v.355, n.9221, p.2138, 2000.

LIN, P.; KOUTSKY, L. A.; CRITCHLOW, C. W. HLA Class II DR-DQ and increased risk of cervical cancer among senegalese women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.10, p.1037-1045, 2001.

LIU, J. J.; HUANG, R. W.; LIN, D. J.; PENG, J.; WU, X. Y.; PAN, X. L.; LI, M. Q.; LIN, Q. Anti-proliferative effects of oridonin on SPC-A-1 cells and its mechanism of action. **Int. Med. Res.**, v.32, n.6, p.617-625, 2004.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas e árvores do Brasil. **Nova Odessa**: Plantarum, p.352, 1992.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. **Nova Odessa**, São Paulo, Instituto Plantarum, p.395, 2000.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W. ; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 9, p. 1726-1730, 2005.

LU, B; HU, M; LIU, K; PENG, J. Cytotoxicity of berberine on human cervical carcinoma HeLa cells through mitochondria, death receptor and MAPK pathways, and in-silico drug-target prediction. **Toxicol. In Vitro**, v24, p.1482–1490 2010.

MACHADO, M. C. F. P.; MELO-JUNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre sarcoma 180 em camundongos. **Rev. Eletrôn. Farm.**, v.6, p.1-6, 2009.

MACIAG, P. C.; VILLA, L. L. Genetic susceptibility to HPV and cervical cancer. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.915-922, 1999.

MACIAS, P. C.; SCHLECHT, N. F.; SOUZA, P. S. A. Major Histocompatibility Complex Class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.9, p.1183-1191, 2000.

MADKAN, V. K.; COOK-NORRIS, R. H.; STEADMAN, M. C.; ARORA, A.; MENDOZA, N.; TYRING, S. K. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. **Br. J. Dermatol.**, v. 157, p. 228–241, 2007.

MASSAD, L. S.; MUTCH, D. G.; POWELL, C. B.; KAO, M-S.; COLLINS, J. L. Inhibition of protein synthesis increases the lytic effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in cell lines derived from gynecologic malignancies. **Cancer Immunol. Immunother.**, v.33, p.183-188, 1991.

MAVAR-MANGA, H.; CHAPON, D.; HOET, S.; BLOCK, S.; PAUW-GILLET, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. *N1,N2,N3*-Triisopentenyl guanidine and *N1,N2*-Diisopentenyl guanidine, two cytotoxic alkaloids from *Alchornea cordifolia* (Schumach



e Thonn.) Mull.Arg.(Euphorbiaceae) Root Barks. **Nat. Prod. Communications**. v.1, n.2, p.1097-1100, 2006.

MAVAR-MANGA, H.; HADDAD, M.; PIETERS, L.; BACCELLI, C.; PENGE, A.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. **Arg. J. Ethnopharmacol.**, v. 115, p: 25-29, 2008.

MAHER, S. G., SHEIKH, F.; SCARZELLO, A. J.; ROMERO-WEAVER, A. L.; BAKER, D. P.; DONNELLY, R. P.; GAMERO, A. M. IFN- $\alpha$  and IFN- $\lambda$  differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity. **Cancer Biol. Ther.**, v.7, p.1109–1115, 2008.

McCANCE, D. J. Human Papillomaviruses and cell signaling. **Sci. STKE**, v.288, p.29-34, 2005.

McDOUGALL, J. K. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 186, p. 101-119, 1994.

McNULTY, J.; NAIR, J. J.; BASTIDA, J.; PANDEY, S.; GERASIMOFF, J.; GRIFFIN, C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. **Photochemistry**, v. 68; p: 1068-1074, 2007.

MEISSNER, J. D. Nucleotide sequences and further characterization of humanpapillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. **J. Gen. Virol.**, v.80, p.1725–1733, 1999.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Drug design based on natural products. **Quím. Nova**, v.24, p.105-111, 2001.

MOONGKARNDI, P.; KOSEM, N.; LUANRATANA, O.; JONGSOMBOONKUSOL, S.; PONGPAN, N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. **Phytoterapy**, v.75, n3-4, p.375-377, 2004.

MORAIS M. C. C., LUQMAN S., KONDRATYUK T. P., PETRONIO M. S., REGASINI L. O., SILVA D. H. S., BOLZANI V. S., SOARES C. P., PEZZUTO J. M. Suppression of TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat. Prod. Res.**, v.24, p.1758-1765, 2010.

MORANDI, F.; FERRETTI, E.; BOCCA, P.; PRIGIONE, I.; RAFFAGHELLO, L.; PISTOIA, V. A novel mechanisms os soluble HLA-G mediated immune modulation: downregulation of T cell chemokine receptor expression and impairment of chemotaxis. **PLoS One**, v.5, p.11763, 2010.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **Int. Immunol.**, v.11, p.803-11, 1999.

MOREAU, P.; FAURE, O.; LEFEBVRE, S.; IBRAHIM, E. C.; O'BRIEN, M.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. **Transplant Proc.**, v.33, p.2277-80, 2001.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res.**, v. 2, p. 213-228, 2002.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 518–527, 2003.

NALDINI, A.; CARRARO, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. **Curr. Drug Target Inflamm. Allergy**, v.4, n.1, p.3-8, 2005.

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.

NAUGLER, W. E.; SAKURAI, T.; KIM, S.; MAEDA, S.; KIM, K.; ELSHARKAWY, A.M.; KARIN, M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. **Science**, v.317, p.121–124, 2007.

NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, J., RYAN, J. J., PAUL, W. E.,. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.701–738, 1999.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SANDER M. K. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1693-713, 2004.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat.Prod.**, v. 70, n.3, p. 461-477, 2007.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Curr. Opinion Chem. Biol.**, v. 6, p. 297-305, 2002

NGUYEN, H. H.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T.; ALVAREZ, R. D.; VU, H. L.; ANDRASI, J.; BREWER, L. R. Immune responses to human papilloma-virus in genital tract of women with cervical cancer. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p.423-474, 2001.

NGUYEN, T. T.; SOMKIN, C. P.; MA, Y. Participation of Asian-American women in cancer chemoprevention research: physician perspectives. **Cancer**, v.15;p.3006-14, 2005.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.17, p.325–337, 2006.

NOGUEIRA, R. C.; CERQUEIRA, H. F.; SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert. Opinion Ther. Pat.**, v. 20, p.1-13, 2010.

NOGUCHI, M., YOKOYAMA, M.; WATANABE, S.; UCHIYAMA, M.; NAKAO, Y.; HARA, K.; IWASAKA, T. Inhibitory effect of the tea polyphenol, (-)-epigallocatechin galatte, on growth of cervical adenocarcinoma cell lines. **Cancer Lett.**, v.234, p.135-42, 2006.

NOMELINI, R. S.; MARDEGAN, M. C.; MURTA, E. F. C. Utilization of interferon ingynecologic and breast cancer. **Clin. Med. Oncol.**, v.1,p.111-120, 2007.

NOQUEIRA DE SOUZA, N. C.; BRENNAN, S. M.; CAMPOS, F.; SYRJANEN, K. J.; BARACAT, E. C.; SILVA, I. D. Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v16, p.1278–1282, 2006.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **J. Nat. Prod.**, v.67, n.2, p.129-135, 2004.

OLIVEIRA JUNIOR, R. J. Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180. 2008. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

OLIVEIRA, A. M.; CALIRI, C. M.; REGASINI, L. O.; TELASCREA, M.; PERON, M. C. C.; SILVA, D. H. S.; SANTOS, A.G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHERIO, A.J .; SOARES, C. P. Mutagenic effect of ethanolic extracts isolated from *Cryptocarya mandioccana*, *Cryptocarya moschata* and *Pterogyne nitens* in *Tradescantia pallida* micronucleus assay (Trad-MCN). **Rev. Bras. Toxicol.**, v.20, p.73-78, 2007.

ONNO, M.; LE, FRIEC, G.; PANGAULT, C.; AMIOT, L.; GUILLOUX, V.; DRENOU, B.; CAULET-MAUGENDRE, S.; ANDRE, P.; FAUCHET, R. Modulation of HLA-G antigens expression in myelomonocytic cells. **Hum. Immunol.**, v.61, p.1086-94 2000.

ORHAN, D. D.; KÜPELI, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album* ssp. *album*. *Z. Naturforsch C.*, v.61, p.26-30, 2006.

OTAKE, A. H.; CHAMMAS, R.; ZATZ, R. Câncer. Novos alvos para tratamento. *Ciência Hoje*, v.38, n.223, p.28-33, 2006.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.2, p.736-746, 2003.

PANTANOWITZ, L.; MICHELOW, P. Review of human immunodeficiency vírus (HIV) and squamous lesions of the uterine cervix. *Diagn. Cytopathol.*, v.39, n.1, p.65-72, 2010.

PARK, B. The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality control function in post-ER compartments. *Immunity.*, v.15, n.2, p.213-24, 2001.

PATIL, R. R.; GUHAGARKAR, S. A.; DEVARAJAN, P. V. Engineered nanocarriers of doxorubicin: a current update. *Crit. Vet. Ther. Drug Carrier. Syst.*, v.25, n.1, p.1-61, 2008.

PAUL, A. T.; GOHIL, V. M.; BHUTANI, K. K. Modulating TNF- $\alpha$  signaling with natural products. *Drug Discov. Today*, v.11, n.15/16, p.725-732, 2006.

PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; MOREAU, P.; RITEAU, B.; GAL, A. L. F.; AVRIL, M. F.; DAUSSET, J.; GUILLET, J. G.; CAROSELLA, E. D. Immunology HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p. 4510–4515, 1998.

PAUL, P.; CABESTRE, F. A.; IBRAHIM, E. C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R. M.; BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. Identification of HLA-G7 as a new Splice variant of the HLA-G m RNA and

expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum. Immunol.*, v.61, n.11, p.1138-49, 2000.

PENNA, C.; FALLANI, M. G.; GORDIGIANI, R.; SONNI, L.; TADDEI, G. L.; MARCHIONNI, M. Intralesional beta-interferon treatment of cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection. *Tumori.*, v.80, n.2, p.146-150, 1994.

PETT, M.; COLEMAN, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J. Pathol.*, v. 212, p. 356–367, 2007.

POLÁKOVÁ K.; RUSS G. Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted. *Neoplasma.*, v.47, p.342-8, 2000.

POTTERAT, O.; HOSTETTMANN, K. Plant sources of natural drugs and compounds. in encyclopedia of environmental biology. *Academic Press*, v.3, 1995.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.*, v.169, n.2, p.328-336, 1988.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B.; TALALAY, P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.89, p.2394-2398, 1992.

POWELL, C. B.; MUTCH, D. G.; MASSAD, L. S.; KAO, M. S.; COLLINS, J, L. Common expression of a tumor necrosis factor resistance mechanism among gynecological malignancies. *Cancer Immunol. Immunother.*, v.32, p.131-6. 1990.

POWELL, C. B.; SCOTT, J.; COLLINS, J, L. Comparison of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  cytolytic mechanisms in human ovarian and cervical carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.*, v.71, p.258-265, 1996.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nat. Clin. Pract.Oncol.**, v. 1, n.5, p. 24-31, 2008.

QI, L.; XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.16, p.4243-4245, 2006.

QIAN N.; CHEN X.; HAN S.; QIANG F.; JIN G.; ZHOU X.; DONG J.; WANG X.; SHEN H.; HU Z.: Circulating IL-1 $\beta$  levels, polymorphisms of IL-1 $\beta$ , and risk of cervical cancer in Chinese women. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.136, p.709–716, 2010.

REBMANN, V.; WAGNER, S.; GROSSE-WILDE H. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cell to escape from immunosurveillance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.4510-4515, 2007.

REGASINI, L. O.; FERNANDES D.C.; CASTRO-GAMBOA I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M., BOLZANI V.S, BARREIRO E. J.; CARDOSO-LOPES, E. M.; YOUNG, M. C. M.; TORRES L. B.; VELLOSA, J. C. R.; OLIVEIRA, O.M.M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quím. Nova**, n. 31, p. 802- 806, 2008a.

REGASINI, L.O.; VELLOSA, J.C.R.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O.M.M.; KHALIL, N.M.; BRUNETTI, I.L.; YOUNG, M.C.M.; BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochem.**, v.69, p. 1739-1744, 2008b.

REGASINI, L. O.; OLIVEIRA, C. M.; VELLOSA, J. C.; REBUGLIO, O. M.; MASCARENHAS F. O.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Free radical scavenging activity of *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae). **African J. Biotechnology**, v. 7, n. 24, p. 4609-4613, 2008c.

REGASINI, L. O.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C.; LOTUFO, L. V.C.; MORAES, M. O.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v.72, p.473-476, 2009.

REGASINI, L.O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M.; BARREIRO, E. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.20, p.706-711, 2010.

RHODS, D. A.; TROWSDALE, J. Genetics and molecular genetics of the MHC. **Rev. Immunogenet.**, v. 1, n. 1, p.21-31, 1999.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. **Baltimore: Williams & Wilkins**, 1996.

RODGERS, J.R; COOK,R G. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.5, n. 6, p.459-471, 2005.

ROSENBLATT, C.; WROCLAWKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. HPV na prática clínica. 1ºed, **Atheneu**, 2006.

ROUAS-FREISS, N. HLA-G in cancer: a way to turn off immune system. **Semin. Cancer**, v.13, n.5, p.325-336, 2003.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; Le MAOULT, J.; CAROSELLA, E. D. Expression of telarogenic HLA-G molecule in cancer prevents antitumor responses. **Semin. Cancer Biol.**, v.17, p.413-421, 2007.

ROUTH, J. W. Mathematical preparation for laboratory technicians. Philadelphia, W. B. **Saunders Co.** 1971.

ROWINSK.Y, E. K.; ONETTO, N.; CANETTA, R. M.; ARBUCK, S. G. Taxol-the 1<sup>st</sup> of the taxanes, an important new class of atitumor agents. **Semin. Oncol.**, v.19, p.646-662, 1992.



SAIKIA, P.; FENSTERL, V.; SEN, G. C. The inhibitory action of p56 on select functions of e1 mediates interferon's effect on human papillomavirus DNA replication. **J. Virol.**, v.84, p. 13036–13039, 2010.

SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann. Ist. Super Sanita.**, v.43, n.4, p.394-405, 2007.

SAGAR, S. M.; YANCE, D.; WONG, R. K. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer – Part 1. **Curr. Oncol.**, v.13,p.14-26, 2006.

SGAMBATO, A.; CITTADINI, A. Inflammation and cancer: a multifaceted link. **Eur. Rev. Med. Pharmacol Sci.**; v.14, n.4, p.263-268, 2010.

SCHEUNGRABER, C.; GLUTIG, K.; FECHTEL, B.; KUEHNE- HEID, R.; DUERST M.; SCHNEIDER, A. Inner border a specific and significant colposcopic sign for moderate or severe dysplasia (cervical intraepithelial neoplasia 2 or 3). **J. Low. Genit. Tract. Dis.**, v.13, n.1, p.1-4, Jan. 2009.

SHOEB, M. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh J. Pharmacol.**, v.1, p.35-41, 2006.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K, F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alkaloids and other constituents from *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Quím. Nova**, v.32, p.1566-70, 2009.

SIKORSKI, M.; ZRUBEK, H. Long-term follow-up of patients treated with recombinant human interferon gamma for cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v.82, n.2, p.179-185, 2003.

SONG, L. L.; KOSMEDER II, J. W.; LEE, S. K.; GERHÄUSER, C.; LANTVIT, D.; MOON, R. C.; MORIARTY, R. M.; PEZZUTO, J. M. Cancer Chemopreventive Activity Mediated by 4'-Bromoflavone, a Potent Inducer of Phase II Detoxification Enzymes. **Cancer Res.**, v.59, p.578-585, 1999.

SONG, S. H.; LEE, J.K.; LEE, N. W.; SAW, H. S.; KANG, J. S.; LEE, K. W. Interferon gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). **Gynecol. Oncol.**, v.108, n.3, p.543-548, 2008.

SONDHI, S. M.; DINODIA, M.; KUMAR, A. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 4657-4663, 2006.

SOUSA, R.; DOSTATNI, N.; YANIV, M. Control of papillomaviruse gene expression. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1032, p. 19, 1990.

SOUTO, F. J. D.; CRISPIM, J. C. O.; FERREIRA, S. C.; DA SILVA, A. S. M.; BASSI, C. L.; SOARES, C. P.; ZUCOLOTO, S.; RAUSS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MARTINELLI, A. L. C.; DONADI, E. A. Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection. **J. Viral Hepat.**, v.10, p.1-4, 2010.

SPELMAN, K.; BURNS, J.; NICHOLS, D., WHINTERS, N.; OTTERSBERG, S.; TENBORG, M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Altern. Med. Rev.**, v.11, n.2, p.128-150, 2006.

SOLIER, C.; MALLET, V.; LENFANT, F.; BERTRAND, A.; HUCHENQ, A.; LE BOUTEILLER, P. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v.53, p.617-25, 2001.

SPPV, SOCIEDADE PORTUGUESA DE PAPILOMAVÍRUS. Características gerais dos HPV's. Disponível em: [http://www.sppv.org/info\\_ciencia.html](http://www.sppv.org/info_ciencia.html). Acesso em: 07/06/2011.

STAHELIN, H. Activity of a new glycosidic lignin derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. **Eur. J. Cancer**, v.9, p.215-221, 1973.

STANLEY, M. A. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. **Virus Res.**, v. 89, n. 2, p. 241-248, 2002.

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

STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 6, 2007.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecol. Oncol.**, v. 109, S15-S21, 2008.

STELLATO, G. Intralesional recombinant alpha 2 $\beta$  interferon in the treatment of human papillomavirus-associated cervical intraepithelial neoplasia. **Sex. Transm. Dis.** v.19, n.3, p.124-126, 1992.

SUN, L.; TRAN, N.; LIANG, C.; TANG, F.; RICE, A.; SCHRECK, R.; WALTZ, K.; SHAWWER, L. K., MCMAHON, G.; TANG, C. Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3-or4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidenyl]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptors tyrosine kinases. **J. Med. Chem.**, v. 42, n. 25, p. 5120-5130, 1999.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. In vivo cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancer and leukemia. **Fitoterapia**, v.78, p.223-226, 2007.

SUFFRENDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R.N. Cytotoxic molecules from natural sources: tapping the Brazilian biodiversity. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v.6, p.367-375, 2006.

TALALAY, P.; DE LONG, M. J.; PROCHASKA, H. J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.85, p.8261-8265, 1988.

TAN, G.; GYLLENHAAL, C.; SOEJARTO, D. D. Biodiversity as a source of anticancer drug. **Curr. Drug Targets**, v.7, p.265-277, 2006.

TANG, X. D.; ZHOU, X.; ZHANG, Q. Z.; LE, A. D.; ZHOU, K. Y. Effects of green tea extract on expression of human papillomavirus type 16 oncoproteins-induced hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in human cervical carcinoma cells. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.**, v.88, p.2872-7, 2008.

TARTOUR E.; FOSSIEZ F.; JOYEUX I.; GALINHA A.; GEY A.; CLARET E.;SASTRE-GARAU X.; COUTURIER J.; MOSSERI V.; VIVES V.; BANCHEREAU J.; FRIDMAN W. H.; WIJDENES J.; L SERGE.; SAUTE`S-FRIDMAN C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice1. **Cancer Res.**, v.59, p.3698–3704, 1999.

TORRENTE, M. C.; OJEDA, J. M. Exploring the relation between human papilloma virus and larynx cancer. **Acta Otolaryngol.** , v.127, n.9, p.900-906, 2007.

TUNGTEAKKHUN, S. S.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. **Arch. Virol.**, v.153, p.397–408, 2008.

UNG, A.; KRAMER, T. R.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; BRATTI, C. B.; BURK, R. D.; SWANSON, C. A.; SHERMAN, N. E.; HUTCHINSON, M. L.; ALFARO, M.; MORALES, J.; BALMACEDA, H.; HILDESHEIM, A. Soluble interleukin 2 receptor levels and cervical neoplasia: results from a population-based case-control study in Costa Rica. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.8, p.249-253, 1999.

UROSEVIC, M.; KURRER, M.O.; KAMARASHEV, J.; MUELLER, B.; WEDER, W.; BURG, G.; STAHEL, R.A.;DUMMER, R.; TROJAN, A. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. **Am. J. Pathol.**, v.159, p.817-24, 2001.

VAN ELSWIJK, D. A.; IRTH, H. Analytical tools for the detection and characterization of biologically active compounds from natura. **Phytochem. Rev.**, v. 1, p. 427-439, 2003.

VEIT, T. D.; CHIES, J. A. Tolerance versus immune response-micro RNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transpl. Immunol.**, v.20, n.4, p.229-231, 2009.

VEIT, T. D.; VIANNA, V.; CHIES, J. A. From fetal tolerance to a regulatory molecule in inflammatory diseases. **Curr. Immunol. Rev.**, v.6, n.1, p.1-15, 2010.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Quím. Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

VELLOSA, J. C. R. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase, **Dissertação**. 2005. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara-SP.

VETRANO, G.; LOMBARDI, G.; DI LEONE, G.; PARISI, A.; SCARDAMAGLIA, P.; PATE, G. Cervical intraepithelial neoplasia: risk factors for persistence and recurrence in adolescents. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v.28, n.3, p.189-192, 2007.

XU, Y. K.; YANG, S. P.; LIAO, S. G.; ZHANG, H.; LIN, L. P.; YUE, J. M. Alkaloids from *Gelsemium elegans*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p.1347-1350, 2006.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; McPHAIL, A. T.; SIM, G. A. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, v.88, p.3888-3890, 1996.

WATT, F. M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.353, p.831-837, 1998.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. Review. **Prev. Med.**, v.25, p.44-45, 1996.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world? Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>. Acesso em: 08/06/2011.

WIENDL, H.; MITSDOERFFER, M.; HOFMEISTER, V.; WISCHHUSEN, J.; BORNEMANN, A.; MEYERMANN, R. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. **J. Immunol.**, v.168, n. 9, p. 4772- 4780, 2002.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the *Peruvian rainforest* with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Gado. **Altern. Med. Rev.**, v.6, n.6, p.567-579, 2001.

WINTERS, M. Ancient medicine, modern use: *Withania somnifera* and its potencial role in integrative oncology. **Altern. Med. Rev.**, v.11, n.4, p.269-277, 2006.

YANG, J.; LIU, R. H. Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by grape extracts and selected phytochemicals. **Food Chemm.**, v.114, n.3, p.898-904, 2009.

YANG, Y.; CHU, W.; GERAGHTY, D. E.; HUNT, J. S. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. **J. Immunol.**, v.156, p.4224-31,1996.

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

YIE, S. M.; LI, L. H.; LI, G. M.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 21, p.46-51, 2006a.

YIE, S. M.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Hum. Reprod.**, v.21, p.2538-44, 2006.

YOKOYAMA, M.; NOGUCHI, M.; NAKAO, Y.; PATER, A.; IWASAKA, T. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin galatte effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines. **Gynecol. Oncol.**, v.92, p.197-20, 2004.

YOON, C. S.; KIM, K. D.; PARK, S. N.; CHEONG, S. W. Alpha (6) integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n. 283, p. 668–673, 2001.

YORK, I.A.; ROCK, K.L. Antigen processing and presentation by 1 the class I major histocompatibility complex. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p. 369-396,1996.

YOSHIDA, M.; FUCHIGAMI, M.; NAGAO, T.; OKABE, H.; MATSUNAGA, K.; TAKATA, J.; KARUBE, Y.; TSUCHIHASHI, R.; KINJO, J.; MIHASHI, K.; FUJIOKA, T. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from Centella asiatica. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28, n.1, p.173-175, 2005.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFRENDI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazil plant extract using high throughput screening. **Clinics**, v.62, p.763-768, 2007.

ZHANG, Q.; ZHANG, Q.; TANG, X.; LU,, Q.; ZHANG Z.; RAO, J.; LE AD. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-galatte inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1 $\alpha$  protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. **Mol. Cancer Ther.**, v.5, p.1227-38, 2006.

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

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 11, p. 2286-2302, 2006.

ZIDI, I.; GUILLARD, C.; MARCOU, C.; KRAWICE-RADANNE, I.; SANGROUBER, D.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. Increase in HLA-G1 proteolytic shedding by tumor cells: a regulatory pathway controlled by NF-kappaB inducers. **Cell. Mol. Life Sci.**, 2006.

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

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

ZUR HAUSSEN, H. Papillomviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v.384, p.260-265, 2009.



# CAPÍTULO II

---

**CYTOTOXIC ASSESSMENT OF ALKALOIDS ISOLATED OF *PTEROGYNE NITENS* IN SEVERAL CANCER AND NON-CANCER HUMAN CELL LINES.**

Elaine R. Mello-Monfre<sup>a</sup>, Isabel C. Silva<sup>a</sup>, Tarsia G. A. Silva<sup>a</sup>, Mauro C.C. Moraes<sup>a</sup>, Juliana M. Sorbo<sup>a</sup>, Roberta A. Duarte<sup>a</sup>, Luis O. Regasini<sup>b</sup>, Dulce H. S. Silva<sup>b</sup>, Vanderlan S. Bolzani<sup>b</sup>, Eduardo A. Donadi<sup>c</sup>, Christiane P. Soares<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>*Cytology and Cellular Biology Laboratory, Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro, 14801-902, Araraquara-SP, Brazil,*

<sup>b</sup>*NuBBE-Nucleus of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products, Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, São Paulo State University - UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, 14801-970, CP 355, Araraquara-SP, Brazil.*

<sup>c</sup>*Faculty of Medicine of Ribeirão, University of São Paulo (USP), Av dos Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Zip Code 14041-900 - Ribeirão Preto, São Paulo – Brazil,*

\*Author for Correspondence:

Christiane Pienna Soares, Ph.D.

Professor and Dean

School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP

Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro. Zip Code: 14801-902, Araraquara-SP, Brazil.

Phone: +55 16 3301-6554, Fax: +55 16 3301 6547, e-mail: soarescp@fctar.unesp.br.

## Abstract

Several natural products have been demonstrating anti-tumor promoter activity. In Brazil, a bioprospecty program aim is to evaluate primary screening novel antitumor drug prototypes, of two compounds obtained from *Pterogyne nitens* Tul. (*Fabaceae*, *Caesalpinioideae*). We investigated the *in vitro* anti-tumoral activities of compounds pterogynine and pterogynidine isolates from *Pterogyne nitens*, using cytotoxic MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to normal cell line HaCaT (keratinocyte skin), NOK (keratinocyte mouth), MRC-5 (lung fibroblast), and tumorigenic cell lines HeLa (cervical HPV18), SiHa (cervical HPV16), C33A (cervical non HPV), MFC-7 (breast cancer), A549 (lung adenocarcinoma epithelial), CasKi (cervical), H292 (lung mucoepidermoid carcinoma), ZR (breast ductal carcinoma) and Hep-G2 (hepatocarcinoma). Alkaloids IC<sub>50</sub> values in a range of 1.25 to 10 mM. Pterogynidine and pterogynine were showed highest cytotoxic effect on tumorigenic cell line while demonstrated less toxicity in normal cell line (MRC-5 and NOK). This study has demonstrated that both alkaloids causes cell death in dose-response, demonstrating that those compounds could be considered cytotoxicity in tumor cells.

**Keywords:** *Pterogyne nitens*, alkaloids, natural products, cytotoxicity, anticancer.

## Introduction

Cancer is a very widespread disease, which is responsible for millions of deaths each year worldwide. Chemotherapy is an essential strategy for the treatment of disseminated cancers, however, its efficiency is restricted by both intrinsic and acquired cell resistance to drugs. To circumvent chemoresistance to conventional anticancer drugs, anticancer compounds with new cellular targets are needed. This observation stimulates the search for new anticancer agents, and in this regard, the investigation of naturally originating compounds could be very valuable. (TIAN, *et al.*, 2007; YIM, *et al.*, 2006, COSERI, 2009).

Plants have been an important source of anticancer agents (KITAJIMA, *et al.*, 2006). The use of plants as medicinal agents predates recorded history, and worldwide efforts are still ongoing to identify new anticancer compounds from plants (CRAGG, *et al.*; 2009).

Since the nitrogen mustard has been used for an anticancer agent in 1940s, FDA approved 87 anticancer drugs for clinical trial through 1994. Among them, 62% of anticancer drugs were derived from natural products directly or semi-synthetically. Moreover, of the 300 pre-NDA (New Drug Application) anticancer drug candidates, 61% are originated from terrestrial plants, marine, and microbial resources (CRAGG, *et al.*; 2005; NEWMAN, 2007). In other words, over the half of anticancer drugs were produced in the natural products, especially from the plant kingdom. This fact suggests that natural sources are very important research target in the market of drug discovery (JINWOONG, *et al.*; 2002). Actually, traditional medicine, largely based on terrestrial plants, currently has a place in 85% of the treatment regimens utilized by the inhabitants

of underdeveloped countries, which means above 79% of the world's population rely on the traditional medicines to some extent (PEZZUTO, 1997).

Traditionally, alkaloids are well known to produce biologically active principles, and anticancer alkaloids, vinblastine and vincristine, isolated from *Catharanthus roseus*, and two other related alkaloids, vinleurosine and vinrosidine led to semi-synthetic compounds being approved in Europe for the cancer treatment, viz. vinorelbine and vindesine. (MURATA, *et al.*; 2006).

Natural products currently are the leading source in the search for new biologically active compounds (REDDYA, *et al.*; 2003). As part of a program to study the therapeutic properties of Brazilian plants, our group started a biomonitor assay of *Pterogyne nitens* (Fabaceae) compounds.

*Pterogyne nitens* is the sole member of genus *Pterogyne* (Leguminosae) and this plant species has been reported to contain terpenoid guanidine alkaloids with anti-fungal and anticancer activity (BOLZANI, *et al.*; 1995; RENEE, *et al.*; 1970). Its alkaloids also presented moderate cytotoxicity against Chinese hamster ovary cell lines (BOLZANI, *et al.*; 1995). *Pterogyne nitens* is a popular Brazilian plant, a beautiful leguminosae tree and sole member of the genus *Pterogyne*, which is distributed mainly in Brazil, Bolivia, Paraguay and Argentina and can reach a height of 5-12m. Its wood is also widely used in building and, to our knowledge, there are no reports of ethnomedicinal uses for this species (REGASINI, *et al.*; 2008a).

In a previous report, Bolzani, *et al.* (1995) tested the cytotoxic activity of pterogynidine in genetically engineered strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for mechanism-based anticancer activity. This alkaloid was found to be active in the

mutant strain RS 321, suggesting its potential as antitumor agent. However, these alkaloids effect on cancer cell lines are unknown and need further investigation.

Despite major scientific and technological progress in combinatorial chemistry, drugs derived from natural product still make an enormous contribution to drug discovery today. In this study, we demonstrated that two alkaloids isolated from *P. nitens*, pterogynine and pterogynidine, showed an interesting potential anti-tumor activity *in vitro*.

## Material and methods

### *Plant material*

Leaves of *Pterogyne nitens* were collected in the Botanic Garden of Sao Paulo, SP, Brazil, in May 2003, and a voucher specimen (SP204319) has been deposited in the herbarium of the Botanic Institute (SP, Brazil).

### *Extraction and isolation of alkaloids*

Shade-dried and powdered leaves of *P. nitens* (10.2 kg) were extracted by re-maceration with ethanol (3x) (Labsynth Ltda., São Paulo, SP, Brazil, 95%) and the combined extracts were concentrated under reduced pressure to yield 766.0 g of residue. The crude extract of *P. nitens* was analyzed by HPLC-DAD using a Phenomenex<sup>®</sup> ODS column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) eluted with water (solvent A) and methanol (solvent B) in the gradient mode (5 to 100% B, in 60 min; flow rate of 1.0 mL/min). The chromatogram showed peaks with UV spectrum ( $\lambda_{\text{max}} = 237$  nm) characteristic of

terpenoid guanidine alkaloids (Bolzani *et al.* 1995), typical for *P. nitens* leaves in addition to peaks with UV spectrum ( $\lambda_{\text{max}} = 257$  and 349 nm) characteristic of flavonoid glucosides. The leaves of *P. nitens* were dried minced and extracted at room temperature, firstly with hexane and then with ethanol. The *P. nitens* ethanol extract concentrated and was dissolved in H<sub>2</sub>O : MeOH (1:4), and partitioned with using AcOH and n-butanol. The n-butanol fraction was loaded to a reverse-phase high performance liquid chromatography (RPHPLC) for isolation of pterogynine and pterogynidine. All alkaloids were single components by thin layer chromatographic analysis <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Figure 1).

Pterogynine (PNG, yield 4.6 %, calculated from the alkaloidal fraction): yellow oil. <sup>1</sup>H NMR  $\delta_{\text{H}}$  (*multiplicity*; *J* in Hz; position): 7.44-7.64 (*br s*, H-1 and H-3), 3.72 (*d*; 6.5, H-1'), 5.16 (*t*, 6.5, H-2'), 1.62 (*s*, H-4'), 1.68 (*s*, H-5'). <sup>13</sup>C NMR  $\delta_{\text{C}}$  (position): 155.7 (C-2), 39.0 (C-1'), 119.2 (C-2'), 135.8 (C-3'), 17.8 (C-4'), 25.2 (C-5').

Pterogynidine (PDG, yield 3.8 %, calculated from the alkaloidal fraction): yellow oil. <sup>1</sup>H NMR  $\delta_{\text{H}}$  (*multiplicity*; *J* in Hz; position): 7.72 (*t*; 6.5; H-3 and H-4), 7.20 (*br s*; H-1), 3.70 (*t*; 6.5, H-1'), 5.16 (*t*, 6.5, H-2'), 1.63 (*s*, H-4'), 1.69 (*s*, H-5'). <sup>13</sup>C NMR  $\delta_{\text{C}}$  (position): 156.9 (C-2), 38.7 (C-1'), 119.0 (C-2'), 136.0 (C-3'), 17.7 (C-4'), 25.1 (C-5').

### ***Solubilization and dilution of test substance***

For initial screening, the substances were tested at 33.0  $\mu\text{M}$ . If antiproliferative activity was detected, the test substance was retested at six concentrations (1.25, 2.5, 5 and 10 mM), but were the 4 last the most significant concentrations recommended in the

study and each concentration was studied in triplicate wells. All samples were initially solubilized in water miliq. The synthesized compounds were stored frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### *Cell culture*

The goal of the new program is to evaluate experimental agents against groups of cell line panels each representing a major clinical category of human malignancy. Each panel (e.g., cervical, lung, breast, skin and hepatic) is to contain multiple, representative human and tumor cell lines.

The cell line HaCat (keratinocyte skin), MRC-5 (lung fibroblast), Hep-G2 (hepatocarcinoma), HeLa (cervical HPV18), SiHa (cervical HPV16), C33A (cervical non HPV), MFC-7 (breast cancer), CasKi (cervical), and A549 (lung adenocarcinoma epithelial) were maintained in DMEM/Ham's F10 mixture (Sigma), whereas NOK (keratinocyte mouth) cultivated in Medium Keratinocyte (Gibco) and H292 (lung mucoepidermoid carcinoma) was maintained in RPMI-1640 (Sigma) cultivated in 10% FBS (Gibco) and antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100  $\mu\text{g/mL}$ , amphotericin B 0.25  $\mu\text{g/mL}$ , ciprofloxacin 0.2 mg/mL, kanamycin 0,1 mg/mL) (Sigma) at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. The cell line HeLa, SiHa, C33A, CasKi, HaCaT, were kindly provided by Dra. Luisa Lina Villa (Ludwig Institute for Cancer Research), H292, NOK, A549, Hep-G2, MCF-7 were acquired ATCC (American Type Culture Collection) and MRC-5 was kindly provided by Laboratory of DNA Repair - Institute of Biomedical Sciences – USP, Carlos Frederico Martins Menck.

The cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD).



### *Cytotoxicity assay*

The cytotoxic effect on cells was observed through the MTT assay. Cells were seeded at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells per well of 96-well plates in 100  $\mu\text{L}$  medium. After an overnight incubation, the medium was replaced by fresh one with increasing concentrations of the test compounds (pterogynine and pterogynidine) by 24 hours. After the treatment, 10  $\mu\text{L}$  of MTT solution in standard phosphate buffer (PBS) at the concentration of 5 mg/mL was added to each well and incubated for 3 h at  $37^\circ\text{C}$ . After 100  $\mu\text{L}$  of DMSO was added to solubilize formazan salt in each well. The absorbance of converted dye was measured at a wavelength of 570 nm with background subtraction at 620 nm by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader for determine the cell viability. Each experiment used as a positive control, cells treated with a well known antitumoral compound, doxorubicin 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was obtained determining  $\text{IC}_{50}$  value by dose-response curve. The level of absorbance directly correlates to the viable cell number. Results were expressed as a percentage of negative control, fixed at 100%. Each condition was realized in triplicate and each set of tests was performed twice, so each condition was repeated in four microwells.

### *Statistic analysis.*

Data were expressed as the percent variation with respect to the control (each point resulted by three independent experiments, performed in quadruplicate). The percentages of cell growth were used to obtain the full dose response curves and to determine the  $\text{IC}_{50}$  values (concentration inhibiting of 50% the cell growth compared with control).

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc.). Results were subjected to One-way analysis of Variance (ANOVA), and differences between means were located using Tukey's multiple comparison test. Differences between means at the 5% ( $p < 0.05$ ) level were considered significant. The data are expressed as means  $\pm$  standard error.

### ***Results and discussion***

Analysis of extracts *Pterogyne nitens* by HPLC-DAD isolated the main class of secondary metabolites presents in the sample: alkaloids guanidine, named pterogynine and pterogynidine.

The Cytotoxicity assay (MTT) was performed on 12 human cell lines (HeLa, SiHa, C33A, CasKi, MCF-7, Hep-G2, H292, A549, JEG-3, MRC-5, HaCaT and NOK) (Table 2). The cytotoxicity assays were performed in three independent experiments and values were expressed as mean  $\pm$  standard error. Both compounds showed dose-dependent cytotoxicity in all cell lines.

In order to obtain  $IC_{50}$ , several concentrations were screened since 0.005  $\mu$ M to 33  $\mu$ M and we decided to test four concentrations (1.25, 2.5, 5 and 10 mM) based on this preliminary screen for cytotoxicity assays.

The results (Table 1) show  $IC_{50}$  values of each strain for compounds pterogynine and pterogynidine. The both compounds demonstrated less cytotoxic cells in non-tumor (NOK and MRC-5) and high cytotoxicity to MCF-7 and A549. Both alkaloids were evaluated against 9 human cancer cell, which showed cytotoxicity activity with more or less of a marked effect depending on the cell line. The cell lines with  $IC_{50} < 10$  mM was

to SiHa, HeLa, C33A, JEG-3, MCF-7 and A549, whereas in CasKi and Hep-G2 the  $IC_{50}$  were  $> 10$  mM. The cytotoxicity of pterogynidine was especially marked on Hep-G2 and H292. In contrast, the treatment with the same alkaloid demonstrated less cytotoxicity on NOK and MRC5 ( $IC_{50} < 1.25$  mM). These results emphasize that the presence of two isoprenil residues in the chemical structure of pterogynidine could be responsible for the selective cytotoxic activity in tumor cell lines *versus* non-tumor cells (REGASINI, *et al.*, 2009).

When we compared the high concentration of each compound (10 mM), we observed that pterogynidine was more cytotoxic in CasKi, HepG2 and H292 cell lines than pterogynine, which they are, respectively, derived from cervical, hepatic and pulmonary cancer (Figure 4). When cytotoxicity assays were comparable according time of treatment, we observed that pterogynidine inhibited the proliferation of tumor cell lines treated 24 hours, especially in Hep-G2, H292, MCF-7 (breast cancer cell line) and HeLa (cervical cancer cell line) treated at 10mM. However, at same conditions of time and concentration, the NOK cell line (oral keratynocytes) demonstrated less cytotoxicity when compared with Hep-G2, H292, MCF-7 cell lines. Remarkable differences was observed in the treatment (10 mM, in 24 hours) between pterogynine and pterogynidine in HepG2 cell line, observing that pterogynine is less cytotoxic than pterogynidine to the treatment with pterogynine presented 67% cell viability whereas the treatment with pterogynidine 20% of cell viability.

Among all tumor cell lines, the treatment with pterogynidine (10mM and 24 hours) was more cytotoxic MCF-7 and in non-tumor cell line (NOK) it was less cytotoxic, indicating selectivity in its cytotoxic properties. The alkaloid activity more intense in breast cell lines than non-tumor cell lines (NOK) and these results seems to

agree with Jansen *et al.*, (2006) which demonstrate similar selectivity of alkaloids to tumor cells.

Toxicity represents an important obstacle in drug development from natural or synthetic sources. A balance between therapeutic and toxicological effects of a given compound is important when determining its applicability as a pharmacological drug. Pterogynine and pterogynidine has not displayed cytotoxicity against different tumor cell line and only nitensidine E demonstrated remarkable citotoxicity (REGASINI, *et al.*; 2009). However, we should consider that different cell lines was used in the present study. Moreover, to the treatment with pterogynidine and pterogynine, we verify selectivity to tumor cell (HepG2 and MCF-7), in the high concentration and less cytotoxicity to non-tumor cell (NOK and MRC-5). When considering the chemotherapy side effects, it is very important to determine whether the drug possesses a harmful effect against normal cells. However, among all tumor cell lines (cervical cancer, lung cancer, breast cancer and hepatic cancer) pterogynidine and pterogynine does not appear to be selective when compared with non-tumor cells (Figure 4).

Chemotherapy is the major treatment modality for cancer and some plants, including the *Pterogyne nitens*, appear to have active ingredients that can control a proliferation of malignant cells. Alkaloids have been studied for their potential anticarcinogenic and the concentrations used range from 1.25 to 10 mM (HIRANO, *et al.*; 1989).

Although most of the studies with alkaloids have a common chemical characteristic regarding the phenolic groups (MCNULTY, *et al.*, 2007, GRIFFIN, *et al.*, 2007), in the present study the alkaloid isolated from *P.nitens* (pterogynine and pterogynidine) possess amine grupaments. The chemical structure of pterogynine and

pterogynidine groups possess primary and tertiary amine, with pattern of substitution of the type *N, N*-diisoprenyl. Pterogynidine presents isoprenil pattern of substitution of the type *N, N*-diisoprenyl that gives smaller and smaller polarity hidrossolubility in relation to the pterogynine whose substitution pattern is of the type *N, N*-diisoprenyl. Alkaloids with amine groups and indolic rings were studied and they demonstrated antitumor activity, antiviral, antifungic and anti-inflammatory (BAO, *et al.*, 2004; DASSONNEVILLE, *et al.*, 2000). Other structures of alkaloids isolated of plants are being related to analgesic activities, and immunomodulatory antiarrhythmics (XU, *et al.*, 2006). However, none of these has been considered composed with important activity in solid tumors, including the breast cancer. So, more studies present tumor cell lines treated with alkaloids should be done in order to better evaluate antitumor activity. Moreover new assays will be necessary to evaluate a decrease of the cellular proliferation and induction of apoptosis time-response (HUANG, *et al.*, 2003).

Guanidine alkaloid isolated from *Alchornea cordifolia*, subjected to a bioassay modified strains of *Saccharomyces cerevisiae* showed that alkaloids with isopentenyl units, such as the alkaloid *N-1 N-2.N-3*-trisisopentenilguanidina, are potential antitumor compounds (BOLZANI *et al.*; 1995). Later studies with the alkaloid in cells of human cervical cancer (HeLa), melanoma (Mel5), ascites tumor (J774) and cultured normal human lung (WI 38), showed selective cytotoxic activity against tumor cells compared to normal cell (MAVAR-MANGA, *et al.*; 2006).

Pterogynidine has a composition with guanidine structure with substitution *N1, N2*-diisoprenyl substitution when compared to *N1, N2, N3*-diisoprenyl it shows reasonable cytotoxicity in relation to the alkaloid trisubstituted alkaloid, which was demonstrated to be highly deleterious in several different cell lines (MAVAR-MANGA, *et al.*, 2008). The modification of chemical groups or change the position of

cis-trans grupaments it can check not only polarity modification, as well as the modification of activity (BANSKOTA, *et al.* 2002). When, in that study, we compared the cytotoxicity of the two alkaloids, we observed a high cytotoxicity of pterogynidine in comparison to pterogynine, which presented lower IC<sub>50</sub> cytotoxicity.

In accordance with the results of this study, Regasini, *et al.*; (2008), showed the profile of five cytotoxic alkaloids guanidine (nitensidine D, nitensidine A, pterogynine, pterogynidine and galegine) on human tumor lines leukemic (HL-60), colon (HCT-8), melanoma (MDA-MB435) and glioblastoma (SF-295), in which the alkaloid However among all compounds assayed, nitensidina E proved to be the most active compound carcinogenic in human cells. (REGASINI, *et al.*, 2008). In the present study we also tested pterogynine and pterogynidine. To pterogynidine high antitumor activity was observed to lung metastatic cell line (H292 and A549) and hepatocarcinoma HepG2. The other compound (pterogynine) in higher concentration presented citotoxicity in breast cancer cells (ZR7531 and MCF-7) and lung tumor cells (A549). To both pterogynine and pterogynidine low citotoxicity was observed to cervical cell line (CaSki). We think that CaSki immortalized by HPV 16 could explain these results.

Unfortunaley, in keratinocytes cells (HaCaT) we also observed high citotoxicity. However, a lower citotoxicity was observed in human fibroblast (MRC-5) and oral keratinocytes, which seems to us that pterogynidine and pterogynine possess good selectivity between normal *versus* tumor cell lines.

Another study, the extracts and fractions of leaves and fruits of *P. nitens* demonstrated antiproliferative effect in the murine melanoma cell line (B16F10), which could be explained through the presence of guanidine alkaloids and flavonoids (quercetin and isoquercitine) (BOLZANI, *et al.*, 2007).

We can conclude that guanidine alkaloids isolated from *Pterogyne nitens* appear to be an attractive compound to the cancer treatment to breast, lung and hepatocarcinoma, inhibiting the proliferation of human cancer cells. However, further investigation should be done to evaluate if those compounds induces apoptosis which is a good way to cell death.

### **Acknowledgements**

This work was funded by grants from the “Sao Paulo State Research Foundation” FAPESP (Brazil), as part of the Biota-FAPESP – The Biodiversity Virtual Institute Program ([www.bioprosecta.org.br](http://www.bioprosecta.org.br)), (n°03/02176-7).

## References

Bolzani VS, Gunatilaka AAL, Kingston DGI. 1995. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products* **11**:1683-1688.

Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* **80**:67-73.

Bao B, Sun Q, Yao X, Hong J, Lee C-O, Sim CJ, Im KS, Jung JH. 2004. Citotoxic bisindole alkaloids from a marine sponge *Spongisorites* sp. *Journal of Natural Products* **68**: 711-715.

Coseri S. 2009. Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. *Mini Rev Med Chem* **9**:560-71.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal Natural Products* **6**:1022-37.

Cragg GM, Newman DJ. Plants as source of anticancer agents. **J. Ethopharmacol.**, v.100, p.72-79, 2005.

Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. 2009. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem. Rev.* **109**:3012–3043.

Dassonneville L, Lansiaux A, Wattelet A, Wattez N, Mahieu C, Miert SV, Pieters L, Bailly C. 2000. Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology* **409**: 9-18.

Griffin C, Sharda N, Sood D, Nair J, McNulty J, Pandey S. 2007. Selective cytotoxicity of Pancratistatin-related natural *Amaryllidaceae* alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell International* **7**: 01-07.

Hirano T, Oka K, Akiba M. 1989. Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR-75-1. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol*, **64**:69-78.



- Huang Y, Hager ER, Phillips DL, Dunn VR, Hacker A, Frydman B, Kink JA, Valasinas AL, Reddy JA, Marton LJ, Caserop JR, Davidson NE. 2003. A novel polyamine analog inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* **9**: 2769-2777.
- Jansen OV, Akhmedjanova L, Angenot G, Balansard A, Chariot E, Ollivier M, Titsa M, Frederich. 2006. Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss. for their cytotoxic properties. *Journal of Ethnopharmacology* **105**: 241–245.
- Jinwoong K, Eun JP. 2002. Cytotoxic Anticancer Candidates from Natural Resources. *Curr. Med. Chem.* **2**: 485-537.
- Kitajima M, Nakamura T, Kogure N, Ogawa M, Mitsuno Y, Ono K, Yano S, Aimi N, Takayama H. 2006. Isolation of Gelsedine-Type Indole Alkaloids from *Gelsemium elegans* and Evaluation of the Cytotoxic Activity of *Gelsemium* Alkaloids for A431 Epidermoid Carcinoma Cells. *Journal Natural Products* **69**:715-718.
- Mavar-Manga H, Chapon D, Hoet S, Block S, Pauw-Gillet M, Quentin-Leclercq J. 2006. N1,N2,N3-Trisisopentenyl guanidine and N1,N2-Diisopentenyl guanidine, two cytotoxic alkaloids from *Alchornea cordifolia* (Schumacher Thonn.) Mull.Arg.(Euphorbiaceae) Root Barks. *Natural Product Communications* **1**: 1097-1100.
- Mavar-Manga H, Haddad M, Pieters L, Baccelli C, Penge A, Quentin-Leclercq J. 2008. Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Müll. Arg. *Journal of Ethnopharmacology* **115**: 25-29.
- McNulty J, Nair JJ, Bastida J, Pandey S, Gerasimoff J, Griffin C. 2007. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* **68**:1068-1074.
- Murata J, Bienzle D, Brandle JE, Sensen CW, De Luca V. 2006. Expressed sequence tags from Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *FEBS Letters* **580**:4501-4507.
- Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal Natural Products* **70**:461-77
- Pezzuto JM. 1997. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol* **53**:121-133.

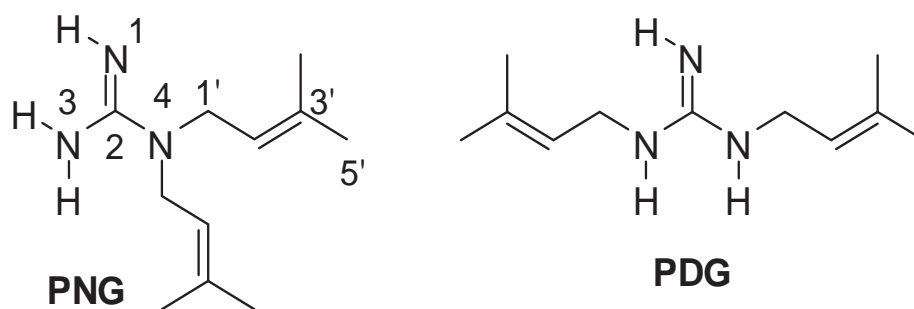
- Reddya L, Odhava BK, Bhoola D. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 99:1–13.
- Regasini LO, Velloso JCR, Silva DHS, Furlan M, Oliveira OM, Khalil NM, Brunetti IL, Young MCM, Barreiro EJ, Bolzani VS. 2008. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 69:1739–1744.
- Regasini LO, Rebuglio Velloso JC, Silva DHS, Furlan M, Mascarenhas DE Oliveira OM, Khalil NM, Brunetti IL, Marx Young MC, Barreiro EJ, Bolzani VS. 2008. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 69: 1739-1744.
- Regasini LO, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Barreiro EJ, Pinheiro-Ferreira PM, Pessoa C, Lotufo LVC, Moraes MO, Young MCM, Bolzani VS. 2009. Cytotoxic Cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products* 72: 473-476.
- Renee AC, Orfeo OO, Petruccelli MF. 1970. Synthesis of Pterogynine and isolation of its isomer Pterogynidine, a new guanidine alkaloid. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* 9:556-556.
- Tian H, Ip L, Luo H, Chang DC, Luo KQ. 2007. A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br J Pharmacol* 150:321-34.
- Yim EK, Lee MJ, Lee KH, Um SJ, Park JS. 2006. Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in cervical carcinoma cell line. *Int J Gynecol Cancer* 16:2023-2031.
- Xu YK, Yang SP, Liao SG, Zhang H, Lin LP, Yue JM. 2006. Alkaloids from *Gelsemium elegans*. *Journal of Natural Products* 69:1347-1350.

**Table 1.** IC<sub>50</sub> cytotoxicity assay of the alkaloids pterogynidine and pterogynine isolated from *P. nitens*.

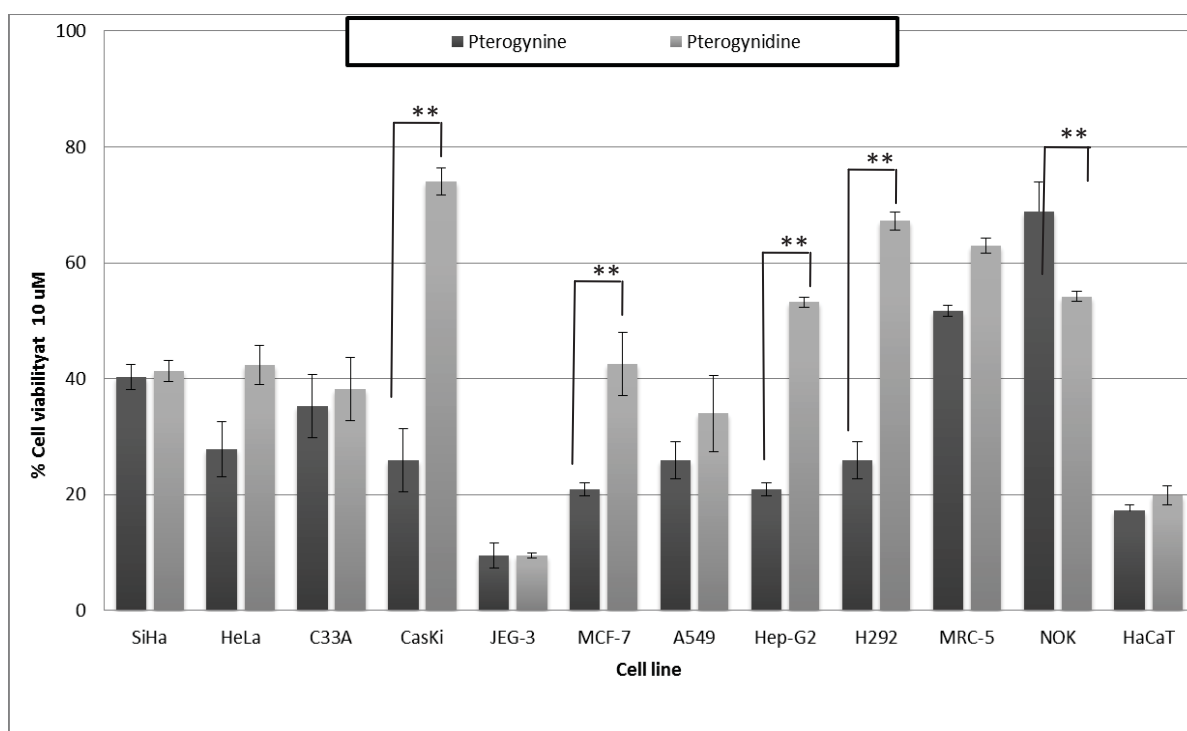
<b>IC<sub>50</sub> Cytotoxicity MTT assay of compounds isolated from <i>P. nitens</i>.</b>												
<b>Human cell lines tested IC<sub>50</sub> (mM)</b>												
Human cell line	SiHa	HeLa	C33A	CasKi	MCF-7	JEG-3	A549	H292	Hep-G2	NOK	MRC-5	HaCaT
pterogynidine	2.5	2.6	2.5	>10	2.5	0.312	1.25	>10	>10	<1.25	10	0.303
pterogynine	2.5	1.87	0.625	>10	2.5	1.25	2.5	10	10	<1.25	>10	0.312

**Table 2.** Cell lines

Table 2	
Normal Cell line	Origin
NOK	mouth keratinocytes
HaCaT	skin keratinocytes
MRC-5	lung fibroblasts
Tumorigenic Cell line	
HeLa	cervical cancer HPV18
SiHa	cervical cancer HPV 16
CasKi	epidermoid cervical
C33A	cervical cancer non-HPV
MCF-7	breast cancer
A549	lung epithelial adenocarcinoma
H292	lung mucoepidermoid carcinoma
JEG-3	choriocarcinoma
Hep-G2	hepatocarcinoma

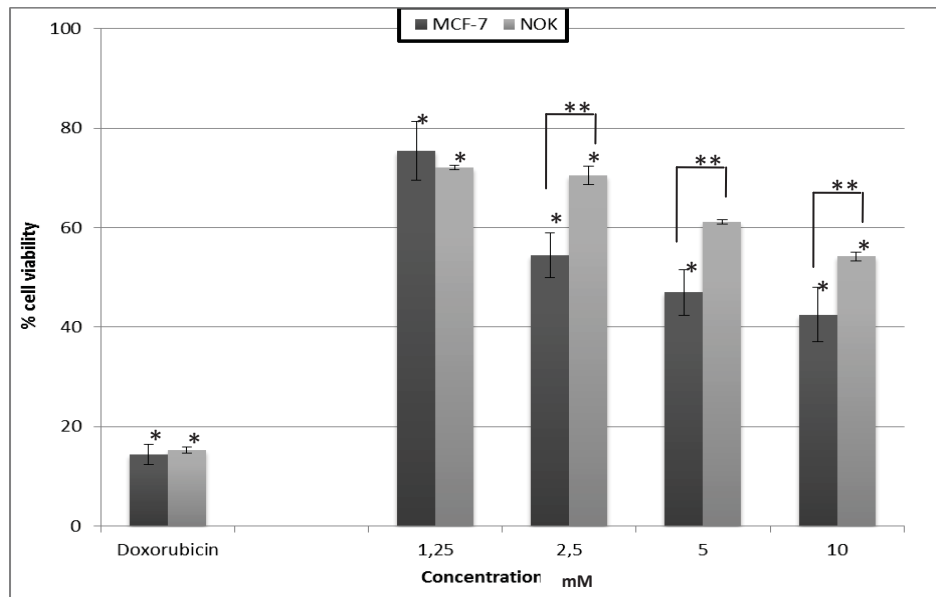


**Figure 1.** Chemical structure of guanine alkaloids isolated from pterogynine (PNG) and pterogynidine (PDG) of *Pterogyne nitens*. Source: (Bolzani, Guanatilaka & Kingston, 1995).



**Figure 2.** Comparison of cell viability after treatment with 10 mM pterogynine and pterogynidine.

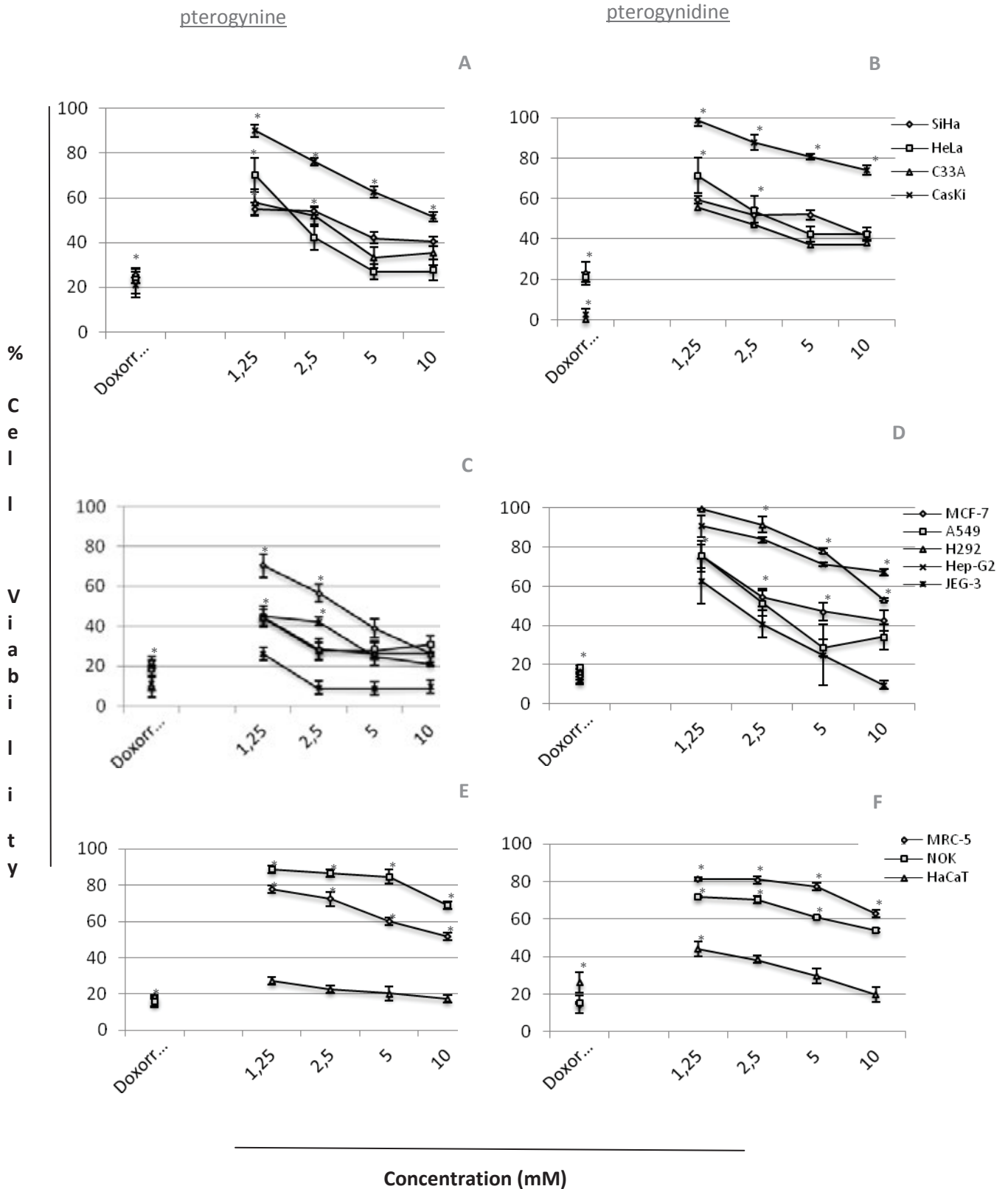
\*\*= P < 0.001 pterogynine versus pterogynidine



**Figure 3.** Assessment of cell viability after treatment for 24 hours with pterogynidine NOK (normal mouth keratinocyte) compared with MCF-7 (breast cancer).

\*=  $p < 0.005$  versus positive control

\*\*=  $P < 0.001$  MCF-7 versus NOK.



**Figure 4.** MTT cytotoxicity assay. Comparison between the treatments of the different cell groups. Treatment of 24 hours with pterogynidine and pterogynine of cervical cell carcinoma: HeLa, SiHa, C33A, CasKi (A-B); breast cancer: MCF-7, lung cancer: H292, A549, Hepatocellular carcinoma: Hep-G2, Chorioncarcinoma: JEG-3 (C-D) and

fibroblasts, mouth keratinocytes and normal skin keratinocytes, respectively: MRC-5, NOK, HaCaT (E-F). The figures are the averages of three independent experiments and standard error ( $M \pm SEM$ ). Doxorubicin (positive control). ANOVA with Tukey post test: \*  $p < 0.005$



**ALKALOIDS FROM *PTEROGYNE NITENS* PROMOTE MODULATION OF TH1/TH2 CYTOKINES AND ANTITUMORAL ACTIVITY THROUGH HLA-G: IMPLICATIONS FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER.**

Elaine R. Mello Monfré<sup>a</sup>, Tarsia G. A. Silva<sup>a</sup>, Renata Dellalibera-Joviliano<sup>b</sup>, Luis O. Regasini<sup>c</sup>, Vanderlan S. Bolzani<sup>c</sup>, Iracilda Zappone Carlos<sup>a</sup>, Eduardo Antônio Donadi<sup>b</sup>, Christiane P. Soares<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>*Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro, 14801-902, Araraquara-SP, Brazil,*

<sup>b</sup>*Faculty of Medicine of Ribeirão, University of São Paulo (USP), Av dos Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Zip Code 14041-900 - Ribeirão Preto, São Paulo – Brazil,*

<sup>c</sup>*NuBBE-Nucleus of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products, Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, São Paulo State University - UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, 14801-970, CP 355, Araraquara-SP, Brazil.*

\*Author for Correspondence:

Christiane Pienna Soares, Ph.D.

Professor and Dean

School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP

Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro. Zip Code: 14801-902, Araraquara-SP, Brazil. Phone: +55 16 3301-6554, Fax: +55 16 3301 6547, e-mail: soarescp@fcar.unesp.br.

## Abstract

The immune system, in an attempt to eliminate antigens, promotes the activation of different specialized cells and molecules, besides the involvement of substances such as cytokines, mediators and cell-specific proteins. Host immune response to human papillomavirus (HPV) is a crucial factor in viral clearance and control of persistent infections. Immune response has an important role in the natural history of HPV infection in uterine cervix and is involved in viral persistence and progression of lesions. The Th1 pattern contributes to develop cellular immunity against HPV infection and neoplasia, and is related to clearance of infection. The Th2 pattern is associated with persistence of viral infection and the progression of lesions. The study assessed the levels of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , produced by cervical cancer cells (HeLa, SiHa and C33A), and normal skin keratinocytes (HaCaT) after treatment with alkaloids (PGN and PGD) isolates from *Pterogyne nitens*. Different studies show that alkaloids have anti-tumor activity, anti-inflammatory and antioxidant activity. Immunomodulators include both immunostimulatory and immunosuppressive agents. Recently soluble forms of HLA-G (sHLA-G) have been implicated in immune regulation. Expression of HLA-G may be a way for tumor cells to escape immunosurveillance. To determine whether HLA-G is expressed on tumor cells, we studied HLA G levels using ELISA in a panel of 5 human cell line (HeLa, SiHa, C33A, HaCaT and JEG3) after treatment with PGD only. Production of levels cytokines and sHLA were analyzed after treatment and was measured in cell culture supernatants. The results showed immunomodulatory activity induced by PGN and PGD. The profile of cytokines induced by PGD was different from those seen with PGN, principally seen in SiHa and C33A cells. However, both compounds induced inflammatory cytokines being 2 to 9 times more potent compared to untreated. Among HaCaT cells, cytokines levels were absent. Significant increase to IFN- $\gamma$ , was seen at PGD alkaloid in SiHa cell line ( $p < 0.01$ ) between 0.312 and 1.25 mM. Significant decrease to TNF- $\alpha$  was also seen on both alkaloid in SiHa and C33A cell line ( $p < 0.01$ ) in 1.25 mM. Significant decrease to IL-1 $\beta$ , was seen on both alkaloids in HeLa, SiHa and C33A cell line ( $p < 0.01$ ) between 0.312 and 1.25 mM. Was observed significant increase of IL-4 only HeLa cell, after treatment PGN in 0.312 mM ( $p < 0.01$ ). IL-6 levels was decreased only C33A cell, after treatment with both alkaloids. We detect cell surface expression of HLA G using 2 specific monoclonal antibodies (mAbs; G1 and G5). However, HLA-G was significant levels detected only in the JEG-3 cell line in lower concentrations (0.312 and 0.625 mM) relative to untreated cells ( $p < 0.001$ ). These findings suggest that the alkaloids from *p. nitens* have seen to be promising, since in non-cytotoxic concentration they were able inflammatory cytokines modulate and promote anti-tumor activity, an essential for future implications in immunotherapy of cancer.

**Keywords:** *Pterogyne nitens*, cervical cancer, HPV, alkaloids, cytokines, HLA-G.

## 1. Introduction

Cervical cancer is one of the most common types of cancer in women and is second only to breast cancer in overall cancer disease burden worldwide [1]. Cervical cancer is almost exclusively (99.7%) attributable to persistent infection with high-oncogenic risk Human Papillomavirus (HPV) types, especially HPV-16 and HPV-18 [2].

Host genetic factors and immune function also appear to play a role in cervical cancer. In particular, impaired function of cell-mediated immunity and human leukocyte antigen (HLA) in response to viral antigens seem to increase the risk of cervical cancer [3]. Recently, regarding the interaction between cancer cells and the human immune system, tumor escape from host immune surveillance has been a source of concern [4].

Cytokine production by human epithelial cells and normal skin keratinocytes is of major importance in the regulation of immune and inflammatory processes in cervical cancer associated with HPV [5]. Among the cytokines, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-4, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) are believed to be most important factors involved in the pathogenesis of cervical cancer [6-8].

Th1 cells secrete IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-12 and stimulate responses mediated by phagocytes and killing of microorganisms, promoting cell-mediated immunity [9]. Th2 cells secrete IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 and stimulate immunity independent of phagocytes, mediated by eosinophils and act in the production of IgE antibodies [10-11]. For most of the duration of the HPV infectious cycle there is little or no release into the local milieu of pro-inflammatory cytokines important for dendritic cell activation and migration and the essential signals to kick start the immune response in squamous epithelia are absent [12]. However, even in the absence of viral induced cytolysis and cell death, HPV infected keratinocytes should be activated to induce

interferon responses - a powerful, generic, anti-viral, defence system [13]. The interferons, have antiviral, antiproliferative anti-angiogenic and immunostimulatory properties acting as a bridge between innate and adaptive immunity activating immature dendritic cells [12]. Most DNA viruses have mechanisms for inhibiting interferon synthesis and signalling and the papillomaviruses are no exception. [14].

In this article, we assessed the levels of interleukin-6 (IL-6) produced in human cervical cell line. This cytokine has a strong pro-tumorigenic activity due to its multiple effects on bone metabolism, tumor cell proliferation and survival, angiogenesis, and inflammation. Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine that regulates hematopoiesis, inflammation and the immune system [15]. IL-6 also plays a key role in the pathophysiology of several cancers, and its over-expression has been implicated in the tumorigenesis of multiple myeloma, ovarian, renal cell, prostate, cervical and breast carcinomas [16]. Therefore, the identification of inhibitory agents to target IL-6 signalling is currently of interest in both anti-inflammatory and anticancer drug discovery [17]. Over the last decade, IL-6 has emerged as an important contributor to the tumor microenvironment and inflammation contributing to pro-tumorigenic activity [18]. IL-6 function involves multiple cell-cell interactions and signaling pathways that together promote, tumor cell proliferation and survival, angiogenesis and vasculogenesis, and immune escape [18].

IL-4 is a cytokine secreted mainly by activated Th2 lymphocytes and exerts a variety of effects on different cell types, including monocytes, B-lymphocytes, mast cells, and keratinocytes [19]. Our recent discovery that IL-4 is a potent inhibitor of HPV-16 LCR-driven transcription [20] has added this cytokine to the list of soluble factors with the potential to control HPV infections and the growth of HPV-associated carcinomas. According Donalisio *et al.* [19] IL-4 cytokine was reported as HPV-16

LCR inhibitor for the first time. In a previous study, was reported to capacity the IL-4 reduce E6 and E7 gene expression in CaSki cells [21].

Cytokines and chemokines are considered to be of major importance in the pathogenesis of several cutaneous disorders [22]. More than any other cytokine family, the interleukin (IL)-1 family is closely linked to the innate immune response [23]. IL-1 $\beta$  a pleiotropic cytokine produced during skin inflammation, participated in the regulation of local and systemic immunologic and inflammatory reaction [24]. Keratinocytes have been reported to synthesize both IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in vitro [25].

HLA-G is a non-classical major histocompatibility complex (MHC) class I antigen with seven isoforms, including both membrane-bound forms (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) and soluble forms (HLA-G5, -G6 and -G7) [26]. HLA-G was first detected in extravillous cytotrophoblasts expressed to protect the fetus from the maternal immune system at the feto-maternal interface during pregnancy [27]. HLA-G plays an important role in immune tolerance by interacting with inhibitory receptors such as the killer Ig-like receptors (KIR) and Ig-like transcripts (ILT), which are expressed on natural killer (NK) cells and T lymphocytes [28]. Since the discovery that HLA-G is expressed in cancer cells, there has been increased focus on the role of immune tolerance in malignant melanoma [29], chronic hepatitis B[30], lung carcinoma [31] and cervical carcinoma [32-33].

Recent studies on the behavior of the HLA-G molecule in HPV-associated cervical lesion shave shown low expression of HLA-G associated with the degree of differentiation of cervical intraepithelial neoplasia (NIC1-2-3 and ICC) [32-33]. Thus, studies are aimed at evaluating the expression of HLA-G in tumors, since negative modulation could constitute a new therapeutic approach to limit tumor progression.

The control of cancer, the second leading cause of death worldwide, may benefit from the potential that resides in alternative therapies [34]. Chemotherapy is an essential strategy for the treatment of disseminated cancers. However, its efficiency is limited by both intrinsic and acquired cell resistance to drugs. To circumvent chemoresistance to conventional anticancer drugs, anticancer compounds with new cellular targets are needed. This observation stimulates the search for new anticancer agents and, in this regard, the investigation of naturally occurring compounds could be very valuable [35-36].

Plants have been an important source of anticancer agents. The use of plants as medicinal agents predates recorded history, and worldwide efforts are still ongoing to identify new anticancer compounds from plants [37-39].

*Pterogyne nitens* (Fabaceae) is the sole member of the genus *Pterogyne* (Leguminosae) and is a plant distributed in the southeast of Brazil, mainly in the Atlantic Forest and Cerrado [40]. Popularly known as “bálsamo”, “yvira-ro”, “cocal”, and “amendoinzeiro”, this plant species has been reported to contain terpenoids, guanidine alkaloids and flavonoids [41-43]. Previous studies have shown cytotoxic, antifungal, anti-inflammatory, antioxidant, mutagenic, antigenotoxic and chemoprevention activity of fractions and substances isolated from this plant [44-47]. However, the effects of these alkaloids on cancer cell lines are unknown and need further investigation.

Therefore, we investigated the *in vitro* effect of pterogynine (PGN) and pterogynidine (PGD) on the secretion of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 in HeLa, SiHa, C33A, HaCaT cells by ELISA. We assessed sHLA-G levels by ELISA, in HeLa, SiHa, C33A, HaCaT and JEG-3 cells, after treatment with only PGD.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Leaves of *Pterogyne nitens* were collected in the Botanic Garden of Sao Paulo, SP, Brazil, in May 2003, and a voucher specimen (SP204319) has been deposited in the herbarium of the Botanic Institute (SP, Brazil).

Shade-dried and powdered leaves of *P. nitens* (10.2 kg) were extracted by successive macerations with ethanol (3x) (Labsynth Ltda., São Paulo, SP, Brazil, 95%) and the combined extracts were concentrated under reduced pressure to yield 766.0 g of residue. The crude extract of *P. nitens* was analyzed by HPLC-DAD using a Phenomenex<sup>®</sup> ODS column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) eluted with water (solvent A) and methanol (solvent B) in the gradient mode (5 to 100% B, in 60 min; flow rate of 1.0 mL/min). The chromatogram showed peaks with a UV spectrum ( $\lambda_{\text{max}} = 237$  nm) characteristic of terpenoid guanidine alkaloids [24] typical for *P. nitens* leaves in addition to peaks with a UV spectrum ( $\lambda_{\text{max}} = 257$  and 349 nm) characteristic of flavonoid glucosides.

The leaves of *P. nitens* were dried, minced and extracted at room temperature, first with hexane and then with ethanol. The *P. nitens* ethanol extract was concentrated and dissolved in H<sub>2</sub>O:MeOH (1:4), and partitioned using AcOH and n-butanol. The n-butanol fraction was loaded to a reverse-phase high performance liquid chromatography RP-HPLC [MeOH :H<sub>2</sub>O:AcOH (46 : 53.5 : 0.5), column for isolation of pterogynine (PGN) and pterogynidine (PGD) (Figure 1). All alkaloids were found to be single components by thin layer chromatography (IV, UV, RMN of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, and EM).

Pterogynine (PNG, yield 4.6 %, calculated from the alkaloid fraction): yellow oil. <sup>1</sup>H NMR  $\delta_{\text{H}}$  (multiplicity; *J* in Hz; position): 7.44-7.64 (*br s*, H-1 and H-3), 3.72 (*d*;

6.5, H-1'), 5.16 (*t*, 6.5, H-2'), 1.62 (*s*, H-4'), 1.68 (*s*, H-5').  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta_{\text{C}}$  (position): 155.7 (C-2), 39.0 (C-1'), 119.2 (C-2'), 135.8 (C-3'), 17.8 (C-4'), 25.2 (C-5').

Pterogynidine (PDG, yield 3.8 %, calculated from the alkaloid fraction): yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR  $\delta_{\text{H}}$  (*multiplicity*; *J* in Hz; position): 7.72 (*t*; 6.5; H-3 and H-4), 7.20 (*br s*; H-1), 3.70 (*t*; 6.5, H-1'), 5.16 (*t*, 6.5, H-2'), 1.63 (*s*, H-4'), 1.69 (*s*, H-5').  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta_{\text{C}}$  (position): 156.9 (C-2), 38.7 (C-1'), 119.0 (C-2'), 136.0 (C-3'), 17.7 (C-4'), 25.1 (C-5').

## 2.2. Cell culture

The human cervical cancer cell lines SiHa, HeLa and C33A, the normal keratinocyte cell line HaCaT and the choriocarcinoma cell line JEG-3 were maintained in a DMEM/Ham F10 mixture (Sigma), supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco) and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin) (Sigma) at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere.

## 2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for cytokine secretion

For the cytokine immunoassay, the HeLa, SiHa, C33A and HaCaT cell lines at  $2.5 \times 10^4/\text{ml}$  were incubated for 24 h with PGN and PGD (0.312, 0.623 and 1.25 mM) at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Supernatants were removed, and IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-6 were quantified with a sandwich immunoassay kit (BD OptEIA™; BD Biosciences, San Diego, USA) following the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 490 nm in a spectrophotometer UV/visible Multiskan Ascent ELISA microplate reader (Multiskan Ascent, Labsystems) and the concentrations of cytokines were obtained using a previously established standard curve with known amounts of IL-



1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN - $\gamma$  standards. The tests were performed in triplicate and the results expressed as picograms/mL. Control: untreated cells

#### **2.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the sHLA-G molecule**

sHLA-G ELISA is a double monoclonal sandwich enzyme immunoassay for the quantitative measurement of soluble forms of Human Leukocyte Antigen-G (sHLA-G) in amniotic fluid, cell culture supernatant and serum or plasma. It is intended for research use only.

We determined sHLA-G levels in cells supernatants (HeLa, SiHa, C33A, HaCaT and JEG-3) after treatment for 24 h with PGD (0.312, 0.623 and 1.25 mM). Was used commercial ELISA kit (sHLA-G ELISA, Exbio, Praha, Czech Republic) according to the manufacturer's recommendations.

In this sHLA-G ELISA, standards and samples were incubated in microtitration wells coated with mouse monoclonal anti-sHLA-G antibody. After a thorough wash, mouse monoclonal anti-human  $\beta$ 2-microglobulin antibody labeled with horseradish peroxidase was added to the wells and incubated with the immobilized antibody-sHLA-G complex. Following another washing step, the remaining HRP-conjugated antibody was allowed to react with the substrate ( $H_2O_2$  with tetramethylbenzidine). The reaction was stopped by the addition of acidic solution, and absorbance of the resulting yellow product was measured spectrophotometrically at 450 nm on a Multiskan Ascent ELISA microplate reader (Multiskan Ascent, Labsystems). The absorbance is proportional to the concentration of sHLA-G. A standard curve was constructed by plotting absorbance values versus sHLA-G concentrations of standards, and concentrations of unknown samples were determined using this standard curve. Control: untreated cells.

## 2.5. *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc.). Results were subjected to one-way analysis of Variance (ANOVA), and differences between means were determined by Tukey's multiple comparison test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

## 3. Results

### 3.1. *ELISA for cytokines*

To investigate the expression of Th1 and Th2 profile cytokines by cervical cancer cells, non-citotoxic concentrations (0.312 at 1.25 mM) were determined on HeLa, SiHa, C33A and HaCaT (unpublished data).

Experiments were carried out to determine the capacity of epithelial cells to produce cytokines IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  after PGN and PGD treatment *in vitro*. This study confirmed the presence of several cytokines that may be of most importance for cervical cancer immunotherapy. The results of the increase/decrease of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-6 with the use of PGN and PGD are shown in Figure 2. There was no change in the pattern of increase/decrease of cytokines for the HaCaT cell line, which was similar to that of the untreated control (Figure 2A). Comparative analysis of the results obtained with PGN and PGD for the HaCaT cell line showed absent for the cytokine increase/decrease. In contrast, for other cell lines a dose-dependent profile was observed for treatment with both compounds isolated from *P.nitens*.

In the HeLa cell line (Figure 2B) there was a statistically significant increase of IFN- $\gamma$  (treated with PGN and PGD) and IL-4 (treated with PGN) at 0.312 mM, as opposed to a slight concentration-dependent reduction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (treated with PGN and PGD) at 1.25 mM ( $p < 0.01$ ). There was a three times increase of IFN- $\gamma$  at the lowest concentration tested (0.312 mM) for HeLa cell line ( $p < 0.01$ ).

For the SiHa cell line (Figure 2C) there was a significant decrease of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (treated with PGN and PGD) at 1.25 mM ( $p < 0.01$ ) when compared to the untreated control, as well as almost nine-fold increase of INF- $\gamma$  (treated with PGD) at 0.312 mM ( $p < 0.01$ ). For the C33A cell line (Figure 2D) there was also a statistically significant concentration-dependent inhibition of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (treated with PGN) ( $p < 0.01$ ). In general, the results illustrated in Figure 2 showed a significant increase in IFN- $\gamma$  and inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-4 in the HeLa, SiHa and C33A cell lines treated with different PGN concentrations compared to the untreated control. The rate of IL-6 inhibition was higher after treatment with PGD in C33A cell ( $p < 0.01$ ), followed by IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ) from 0.312 to 1.25 mM.

### 3.2. *ELISA for sHLA-G*

Soluble HLA-G was quantified in the cell culture supernatant by ELISA and cell viability was quantified by the MTT assay.

The present study sought to establish the relationship between treatment with natural products and potential decreased levels of soluble HLA-G in tumor cell lines. A preliminary analysis of the results showed that, among the five cell lines, JEG-3 presents only the upper levels of the sHLA-G molecule in the supernatant when compared with untreated cells (Figure 3). The cervical carcinoma cell line (C33A) showed a slight increase with the lower concentration of PGD alkaloid tested (0.312

mM) but with no significant difference when compared to the rates for the chorioncarcinoma cell line (JEG-3). However, interestingly, in response to the same treatment, there was a significant increase of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (Figure 2D). Considering the relationships previously described between sHLA-G expression and both cytokines [48-50] it is a possible that sHLA-G levels may be influencing the proinflammatory cytokine profile seen in the C33A cell. The other cell lines were not evaluated further because their values were negative, including the control untreated cells.

Considering that the best results were observed for treatment with PGD, this study found the levels lower of soluble sHLA-G molecule in the JEG-3 cell line, after the treatment. At lower concentrations (0.312 and 0.625mM) decreased the levels of soluble HLA-G molecule, ( $p < 0.001$ ) compared to the negative control (untreated) expressed higher concentrations of the molecule.

Considering that the best results were observed for treatment with PGD, in the present study sHLA-G levels were determined in the JEG-3 cell line treated with PGD, which was found to have a dose-response effect. At the lowest concentrations (0.312 and 0.625 mM) there was a significant reduction of sHLA-G concentration ( $p < 0.001$ ) compared to the untreated control, which expressed higher concentrations of the molecule. Concomitantly, cell viability showed a dose-response to treatment, with  $IC_{50\%}$  at the concentration of 0.625 mM (Figure 4). However, interestingly 26% cell viability at 1.25 mM is seen, in which to the same time sHLA-G levels showed higher rate (50 pg/mL). The ELISA kit is specific to soluble HLA-G. The kit measures shedded HLA-G1 and HLA-G5 in cell culture supernatant.

The results suggest that treatment with PGD reduced the levels of sHLA-G expression at non-cytotoxic concentrations. This is the first study showing the protective effect of PGD, an alkaloid isolated from *P. nitens*, against cancer development. Interestingly, at cytotoxic concentrations there was a higher level of sHLA-G compared to lower concentrations. When compared to untreated control JEG-3 cells, no significant difference was observed, a fact that may demonstrate the continuing concentration of sHLA-G even with treatment that induced cell death by cytotoxicity.

In summary, the results obtained showed a correlation between lower sHLA-G expression and the less cytotoxic concentration of the compound, possibly indicating that the non-classical regulation of this molecule could represent a treatment strategy, contributing to protection against, and regression of, malignancy.

#### 4. Discussion

In this study, we observed that PGN and PGD isolated from *P. nitens* possess immunomodulatory activity *in vitro*. We obtained excellent results with the compounds tested, which demonstrated modulatory activity and increase and/or reduction of cytokines important in the inflammatory response. Since chronic inflammation promotes tumor development, growth and progression, one can predict that a better understanding of the mechanisms by which natural products act would lead to the development of new therapeutic compounds, targeted to the inflammatory process [51].

Regarding the anti-inflammatory activity of the substances evaluated in this study, we observed that both have the ability to stimulate and/or inhibit cytokine levels. Treatment with PGN significantly reduced TNF- $\alpha$  level in the tumor cell lines HeLa, SiHa and C33A. According to Powell *et al.*, [52], therapy involving TNF- $\alpha$  and

inhibitors of protein synthesis may be useful for the treatment of cervical cancer, and can act on the immune control of cervical dysplasia among women infected with high-risk HPV such as HPV-16 and HPV-18 [53].

The present results demonstrate that HeLa (HPV-18) did not show susceptibility to the variation in TNF- $\alpha$  level after treatment with both alkaloids, setting maximum levels of 130 pg/mL. There was no significant difference compared to the untreated control (Figures 2B and 3B). In contrast to these results, Lu *et al.* [54] found high expression of TNF- $\alpha$  mRNA (about two times more than before treatment) after 48 hour treatment with the alkaloid berberine in the supernatant of the HeLa cell line. The authors reported treatments for 12, 24 and 48 hours, with increased expression being observed only after the longest treatment (48 hours). Thus, it would be interesting to carry out trials with different treatment times in order to determine TNF- $\alpha$  expression in this cell line. TNF- $\alpha$  is an important regulatory cytokine with immunomodulatory functions in tumor development and inhibition of tumor development in keratinocytes infected with HPV, which have not yet undergone malignant transformation, suppressing the transcription of the viral oncogenes E6 and E7 [55]. An *in vivo* study conducted by Lopes *et al.* [56] on Swiss mice demonstrated the immunomodulatory activity of the ethyl acetate fraction (AGF) extracted from the plant *Alchornea glandulosa*. In this study the fraction rich in alkaloids and flavonoids was able to stimulate the production of TNF- $\alpha$ , exhibiting important anti-inflammatory activity for the regulation of neoplastic processes [56].

In the present study, IFN- $\gamma$  levels increased after treatment of HeLa and SiHa cells with PGN and after treatment of HeLa, SiHa and C33A cells with PGD. These results agree with those reported by Fischer *et al.* [57] who used propolis, a natural product rich in flavonoids isolated from *Baccharis dracunculifolia* L., which was able to

immunomodulate the levels of IFN- $\gamma$  in a spleen cell line. According to Fernandes *et al.* [58], cervical tumorigenesis is associated with the oncogenic types HPV-16 and HPV-18 with a predominance of Th2 cytokines, as demonstrated by the reduction of IFN- $\gamma$  (Th1-type). Interferons (IFNs) are a group of proteins that are important in viral infections [59]. In the current study we evaluated IFN- $\gamma$  levels in cells transformed by HPV (SiHa), which produces 1 to 2 viral copies [60]. In the future, it would be interesting to evaluate IFN- $\gamma$  levels in CaSki cells which have about 600 viral copies of HPV-16 [60]. The HPVs have evolved a number of strategies to overcome the effects of interferon. Treatment with interferon can result in selecting cells with integrated copies of HPV DNA making it an ineffective methodology unless it can be combined with other therapeutic agents [13].

The present results indicate that neither alkaloid was able to alter the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 or IL-6 in a non-tumor epithelial cell line (HaCaT). The similarity of the cytokine levels compared to the untreated control reveals the absence of change of these mediators, which continued to be present in basal levels. Also, it should be pointed out that, at non-cytotoxic doses (0.312 mM), the non-tumor cell line (HaCaT) also did not show increased cytokine levels. Thus, it is important to note that for future trials, lower concentrations than those used in the presents study should be employed to establish the optimal dose, which should have no toxicity for non-tumor cells.

Immunomodulation was observed in the present study, demonstrating the role of the *Pterogyne nitens* compounds demonstrated both in stimulating and in suppressing certain events of the cellular immune response. These results demonstrate that treatment with these substances may be potentially applicable as an immunostimulant agent, or to fight unwanted inflammation present in tumors. The data indicate the need for expanded

studies on the bioactive properties of *P. nitens*, aiming at clarifying the structure-activity relationship.

The present study is apparently unprecedented in the evaluation of sHLA-G in cervical cell lines (HeLa, SiHa and C33A) associated with natural products (Figure 4). The HLA-G molecule can be induced in situations such as transplantation, inflammatory diseases, multiple sclerosis, and viral infections and also has immunosuppressive and immunomodulatory properties in carcinogenesis [61]. The role of HLA-G in inflammatory diseases has recently started to be studied, with emphasis on the possibility that this molecule might transform the Th1 cell response to the Th2 response, where it would act by protecting against tissue inflammation [62]. The high expression of this molecule is associated with increased Th1 cytokines such as IFN- $\gamma$ , while Th2 cytokines (IL-4, IL-10) may promote the maintenance and progression of viral infection [63].

Several mechanisms have been proposed to explain the immunomodulatory effects of HLA-G *in vitro* [64]. Thus, studies have evaluated the expression of HLA-G in tumors, since their down-regulation could be a new therapeutic approach limiting tumor progression [64]. The present results indicated significant changes in sHLA-G levels only in the choriocarcinoma cell line (JEG-3) after treatment with PGD. The other cell lines (HeLa, SiHa, and C33A HaCaT) showed no expression of this molecule. In fact, the high expression of HLA-G in the choriocarcinoma cell line (JEG-3) corresponded to that expected in the study and decreased levels of sHLA-G were observed after treatment with lower PGD concentrations.

This trophoblastic line constitutively contains high levels of HLA-G, and therefore is used in several studies as a positive control [65-67]. However, peak



expression of HLA-G were expected to occur in the cervical cell lines [66]. So far there are no studies in the literature with expression of HLA-G in the cell lines studied here. Although these cervical cell lines (HeLa, SiHa, C33A) have genotypic characteristics compatible with those of cervical tumor tissues, no difference in HLA-G levels were observed here between these cell lines [68]. In parallel to the results of HLA-G expression, the MTT cytotoxicity assay was performed. The results showed that there was a dose- response cytotoxicity of PGD, and that the expression of sHLA-G was lower at non-cytotoxic concentrations. The basal levels of HLA-G at the highest concentrations could be associated with the increased cell death. The results presented here indicate that sHLA-G levels were lower only at lower treatment concentrations with low cytotoxicity. According Dong *et al.* [68] that absent of expression of HLA-G probably reflects the culture conditions.

Active substances and other fractions of *P. nitens* have been previously tested in different tumor cell cultures (HL-60, HCT-8, MDA-MB-435, SF-295) in trials screening for new antitumor drugs, showing a good correlation in assays of cytotoxicity/growth inhibition *in vitro* [69]. The ideal property of a good anti-carcinogenic substance is the induction of cell death by apoptosis. Duarte *et al.*, [70] showed the cytotoxic activity of PGN and PGD in a breast adenocarcinoma cell line (ZR-7531) in which cell death by apoptosis was observed.

Among the compounds obtained from plants, alkaloids have traditionally been studied due to their extensive range of biological activities [71]. Guanidine alkaloids in the plant kingdom are limited to the families Euphorbiaceae and Leguminosae [42] PGD, a naturally occurring guanidine alkaloid, was isolated from the leaves of *A. glandulosa*. In a previous report, Bolzani *et al.* tested the cytotoxic activity of PGD in genetically engineered strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for mechanism-

based anticancer activity. This alkaloid was found to be active against the mutant strain RS 321, suggesting its potential as an antitumoral agent [42].

The two guanidine alkaloids differ only in the substitution of the isoprenaline type at different positions, with PGD having a substitution pattern of the *N, N*-diisoprenyl type. On this basis, the effect of PGD is suggested to be due to its higher lipophilicity conferred by the substitution pattern of the *N, N'*-diisoprenyl type compared to PGN, since the increase of this feature increases the coefficient of partition. The higher the partition coefficient, the greater the ease of passage of the compound across the biomembranes of neoplastic cells [72-73]. The modification of chemical groups or the change in the position of cis-trans groups can modify not only the polarity but also the activity of the compound [74-75].

Analysis of the results as a whole showed that the alkaloids PGN and PGD exhibit biological activities such as cytotoxicity and antiproliferative and anti-inflammatory properties. However, further studies are needed to assess whether these compounds could be combined (analysis of synergism), with a consequent more effective action as therapeutic agents. In addition, this study provides a better understanding of the pharmacological actions of *P. nitens*, highlighting the importance of biodiversity and also contributes to the understanding of the relationship between alkaloids and medicinal plants.

## Acknowledgments

The present study was supported by Sao Paulo State Research Foundation (FAPESP), Brazil, as part of the Biodiversity Virtual Institute Program (Biota-FAPESP; [www.biotasp.org.br](http://www.biotasp.org.br) and Bioprospecta Program; [www.bioprospecta.org.br](http://www.bioprospecta.org.br))

## References

- [1] Zur Hausen, H. Human papillomavirus & cervical cancer. *Indian J Med Res* 2009;130:209-219.
- [2] Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2002;2:342-350.
- [3] Stanley, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol. Oncol* 2008;109:15-21.
- [4] Rouas-Freiss, N. HLA-G in cancer: a way to turn off immune system. *Semin Cancer* 2003;13:325-336.
- [5] Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Current Cancer Drug Targets* 2007;7:79-89.
- [6] Noqueira de Souza NC, Brenna SM, Campos F, Syrjanen KJ, Baracat EC, Silva ID. Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1278–1282.
- [7] Massad LS, Mutch DG, Powell CB, Kao MS, Collins JL. Inhibition of protein synthesis increases the lytic effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in cell lines derived from gynecologic malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 1991;33:183-195.
- [8] Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, Venzon DJ, Shearer GM, De Palo G, Clerici E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:245-50.
- [9] Lee BN, Follen M, Shen DY, Malpica A, Adler-Storthz K, Shearer WT. Depressed type 1 cytokine synthesis by superantigen-activated CD4+ T cells of women with human papillomavirus-related high-grade squamous intraepithelial lesions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 2004;11:239-44.

- [10] Taylor BN, Saavedra M, Fidel PL. Local Th1/Th2 cytokine 1 production during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth factor-beta. *Med. Mycol* 2000;38:419-431.
- [11] Ohtsuka, Y Sanderson, IR. Transforming growth factor-beta: an important cytokine in the mucosal immune response. *Curr. Opin. Gastroenterol* 2000;16:541- 545.
- [12] Stanley MA.. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res* 2009;130:266-276.
- [13] Beglin M, Melar-New M, Laimonis L. Human Papillomaviruses and the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2009;9:629-35.
- [14] Zinzalla G, Haque MR, Piku BB, Anderson J, Kaye SL, Haider S, Hasan F, Antonow D, Essex S, Rahman KM, Palmer J, Morgenstern D, Wilderspin AF, Neidle S, Thurston DE. A novel small-molecule inhibitor of IL-6 signalling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010;20:7029–7032.
- [15] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:798-809.
- [16] Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 2010;1223-31.
- [17] Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563–572.
- [18] Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for Translational Therapeutics. *Cancer* 2007;110:1911–1928.
- [19] Donalisio M, Cornaglia M, Landolfo S, Lembo D. TGF- $\beta$ 1 and IL-4 downregulate human papillomavirus-16 oncogene expression but have differential effects on the malignant phenotype of cervical carcinoma cells. *Virus Research* 2008;132:253–256.
- [21] Lembo D, Donalisio M, De Andrea M, Cornaglia M, Scutera S, Musso T, Landolfo S. A cell-based high-throughput assay for screening inhibitors of human papillomavirus-16 long control region activity. *FASEB Journal* 2006;20:148–150.
- [22] Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Rev. Immunol* 1999;17:701–738.
- [23] Lotz K, Vaughall D, Carson D. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988;241:1218–20.

- [24] Matsuura K, Otsuka F, Fujisawa H. Effects of interferons on tumour necrosis factor alpha production from human keratinocytes. *Cytokine* 1998;10:500–5.
- [25] Ji-Yong Liu, Jin-Hong Hu, Quan-Gang Zhu, Feng-Qian Li, Jing Wang, Hua-Jun Sun. Effect of matrine on the expression of substance P receptor and inflammatory cytokines production in human skin keratinocytes and fibroblasts. *International Immunopharmacology* 2007;7:816–823.
- [26] Paul P. Identification of HLA-G7 as a new Splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000;61:1138-49.
- [27] Veit TD, Vianna V, Chies J.A. From fetal tolerance to a regulatory molecule in inflammatory diseases. *Curr Immunol Rev* 2010;6:1-15.
- [28] Carosella ED, Lemaoult J. HLA-G: a look back, a look forward. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;2:1-4.
- [29] Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Gal ALF, Avril MF, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED. Immunology HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:4510–4515.
- [30] Souto FJD, Crispim JCO, Ferreira SC, da Silva ASM, Bassi CL, Soares CP, Zucoloto S, Rauss-Freiss N, Moreau P, Martinelli ALC, Donadi EA. Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 2010;10:1-4.
- [31] Urosevic M, Kurrer MO, Kamarashev J, Mueller B, Weder W, Burg G, Stahel RA, Dumme RR, Trojan A. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol* 2001;59:17-24.
- [32] Gonçalves MA, Discorde LM, Simões RT, Rabreau M, Soares EG, Donadi EA, Carosella ED. Classical and non-classical HLA molecules and p16INK4a expression in precursors lesions and invasive cervical cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Biol* 2008;141: 70-74.
- [33] Guimarães MC, Soares CP, Donadi EA, Derchain SF, Andrade LA, Silva TG, Hassumi MK, Simões RT, Miranda FA, Lira RC, Crispim J, Soares EG. Low expression of human histocompatibility soluble leukocyte antigen-G (HLA-G5) in invasive cervical cancer with and without metastasis, associated with papilloma virus (HPV). *J Histochem Cytochem* 2010;58:405-11.
- [34] Reddy L, Odhava BK, Bhoola D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 2003;99:1– 13.

- [35] Giocondo MP, Bassi CL, Talascrea M, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Silva DHS, Agustoni D, Mello ER, Soares CP. Cryptomoscatone D2 from *Cryptocarya mandiocana*: cytotoxicity against human cervical carcinoma cell line. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 2010;30:315-322.
- [36] Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol.*, doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00221, 2010.
- [37] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal Natural Products* 2007;70:461-77.
- [38] Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol* 1997;53:121-133.
- [39] Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chem. Rev* 2009;109:3012–3043.
- [40] Lorenzi, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas e árvores do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992;1:352.
- [41] Bolzani VS, Young MCM, Furlan M, Cavalheiro AJ, Araújo AR, Silva DHS, Lopes MN. Search for Antifungal and Anticancer Compounds from native Plant Species of Cerrado and Atlantic Forest. *An. Acad, Brasi, Ci* 1999.
- [42] Bolzani VS, Gunatilaka AAL, Kingston DGI. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products* 1995;58:1683-1688.
- [43] Regasini LO, Fernandes DC, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Bolzani VS, Barreiro EJ, Cardoso-Lopes EM, Young MCM, Torres LB, Velloso JCR, Oliveira OMM. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). *Quim. Nova* 2008;31:802-806.
- [44] Fernandes APM, Gonçalves MAG, Duarte G, Cunha FQ, Simões RT, Donadi E A. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology* 2005;334:294-298.
- [45] Morais MCC, Luqman S, Kondratyuk TP, Petronio MS, Regasini LO, Silva DHS, Bolzani VS, Soares CP, Pezzuto JM. Suppression of TNF- $\alpha$  induced NF $\kappa$ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. *Natural Product Research*, 2010;24:1758-1765.
- [46] Regasini LO, Oliveira, CM, Velloso, JC, Rebuglio, OM, Mascarenhas FO, Silva, DHS, Bolzani VS. Free radical scavenging activity of *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae). *African Journal of Biotechnology* 2008;7:4609-4613.
- [47] Oliveira AM, Caliri CM, Regasini LO, Telascrea M, Peron MCC, Silva DHS Santos AG, Bolzani VS, Cavalheiro AJ, Soares CP. Mutagenic effect of ethanolic extracts isolated from *Cryptocarya mandiocana*, *Cryptocarya moschata* and *Pterogyne*

*nitens* in *Tradescantia pallid* micronucleus assay (Trad-MCN). Rev.Bras.Toxicol 2007;20:73-78.

[48] Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, Taketani Y. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. Mol Hum Reprod. 2001;7:195-200.

[49] Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der Meer A, Joosten I, Long EO. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. PLoS Biol 2006;4:9.

[50] Van der Meer A, Lukassen HG, van Cranenbroek B, Weiss EH, Braat DD, an Lierop MJ, Joosten I. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. Mol Hum Reprod 2007;13:123-33.

[51] Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: How hot is the link? Biochemical Pharmacology 2006;72:1605-1621.

[52] Powell CB, Scott J, Collins JL. Comparison of TNF $\alpha$  and TNF $\beta$  Cytolytic Mechanisms in Human Ovarian and Cervical Carcinoma Cell Lines. Gynecology Oncology 1998;71:258-265.

[53] Bachmann A, Hanke B, Zawatzky R, Souto U, Van Riggelen J, Zur Hausen H. Disturbance of tumor necrosis factor alpha-mediated beta interferon signaling in cervical carcinoma cells. J. Virol 2002;76:280-291.

[54] Lu B, Hu M, Liu K, Peng J. Cytotoxicity of berberine on human cervical carcinoma HeLa cells through mitochondria, death receptor and MAPK pathways, and in-silico drug-target prediction. Toxicology in Vitro 2010;24:1482-1490.

[55] Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. Nat. Rev. Drug Discov 2003;2:736-746.

[56] Lopes FCM, Calvo TR, Vilegas W, Carlos IZ. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2005;28:1726-1730.

[57] Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Dummer LA, Vargas LD, Hübner SO, Dellagostin OA, Paulino N, Paulino AS, Vidor T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1, Vaccine 2007;25:1250-1256.

[58] Fernandes APM, Gonçalves MAG, Duarte G, Cunha FQ, Simões RT, Donadi EA. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. Virology 2005;334:294-298.



- [59] Saikia P, Fensterl V, Sen GC. The inhibitory action of P56 on select functions of E1 mediates interferon's effect on human papillomavirus DNA replication. *Journal of Virology* 2010;84:13036–13039.
- [60] Meissner JD. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *Journal of General Virology* 1999;80:725–1733.
- [61] Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Lemaoult J, Carosella ED. Expression of telarogenic HLA-G molecule in cancer prevents antitumor responses. *Semin Cancer Biol* 2007;17:413-421.
- [62] Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cell to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;95:4510-4515.
- [63] Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, Alvarez RD, Vu HL, Andrasi J, Brewer LR. Immune responses to human papilloma-virus in genital tract of women with cervical cancer. *Annu. Rev. Immunol* 2001;19:423-474.
- [64] Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Loning T, Bamberger MC. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3932-6.
- [65] Poláková K, Russ G. Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted. *Neoplasma* 2000;47:342-8.
- [66] Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Gal ALF, Avril MF, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED. Immunology HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:4510–4515.
- [67] Poláková K, Russ G. Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted. *Neoplasma* 2000;47:342-8.
- [68] Dong DD, Yang H, Li K, Xu G, Song LH, Fan XL, Jiang XL, Yie SM. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical lesions: association with cancer progression, HPV 16/18 infection, and host immune response. *Reprod Sci* 2010;17:718-23.
- [69] Regasini LO, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Barreiro EJ, Pinheiro-Ferreira PM, Pessoa C, Lotufo LVC, Moraes MO, Young MCM, BolzaniVS. Cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products* 2009;72:473-476.



[70] Duarte RA, Mello ER, Araki C, Morais MCC, Bolzani VS, Silva DHS, Regasini LO, Silva TGA, Soares CP. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induces apoptosis in malignant breast cancer cell line. *Tumor Biology* 2010;31:513-522.

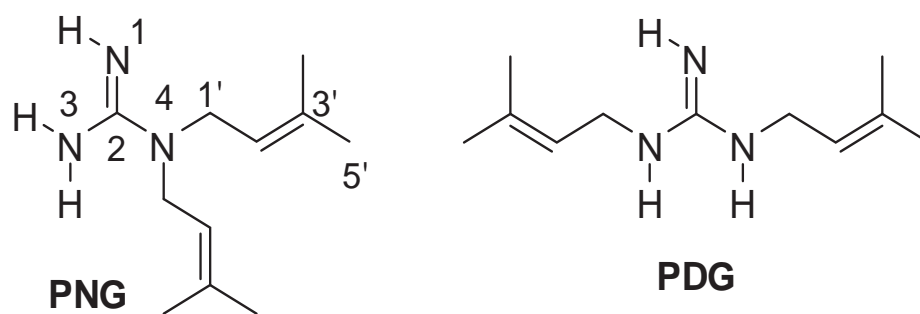
[71] Griffin C, Sharda N, Sood D, Nair J, McNulty J, Pandey S. Selective cytotoxicity of Pancratistatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell International* 2007;7: 01-07.

[72] Barreiro EJ, Fraga CAM. Química Medicinal. As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. Porte Alegre, RS: Artmed Editora, 2001

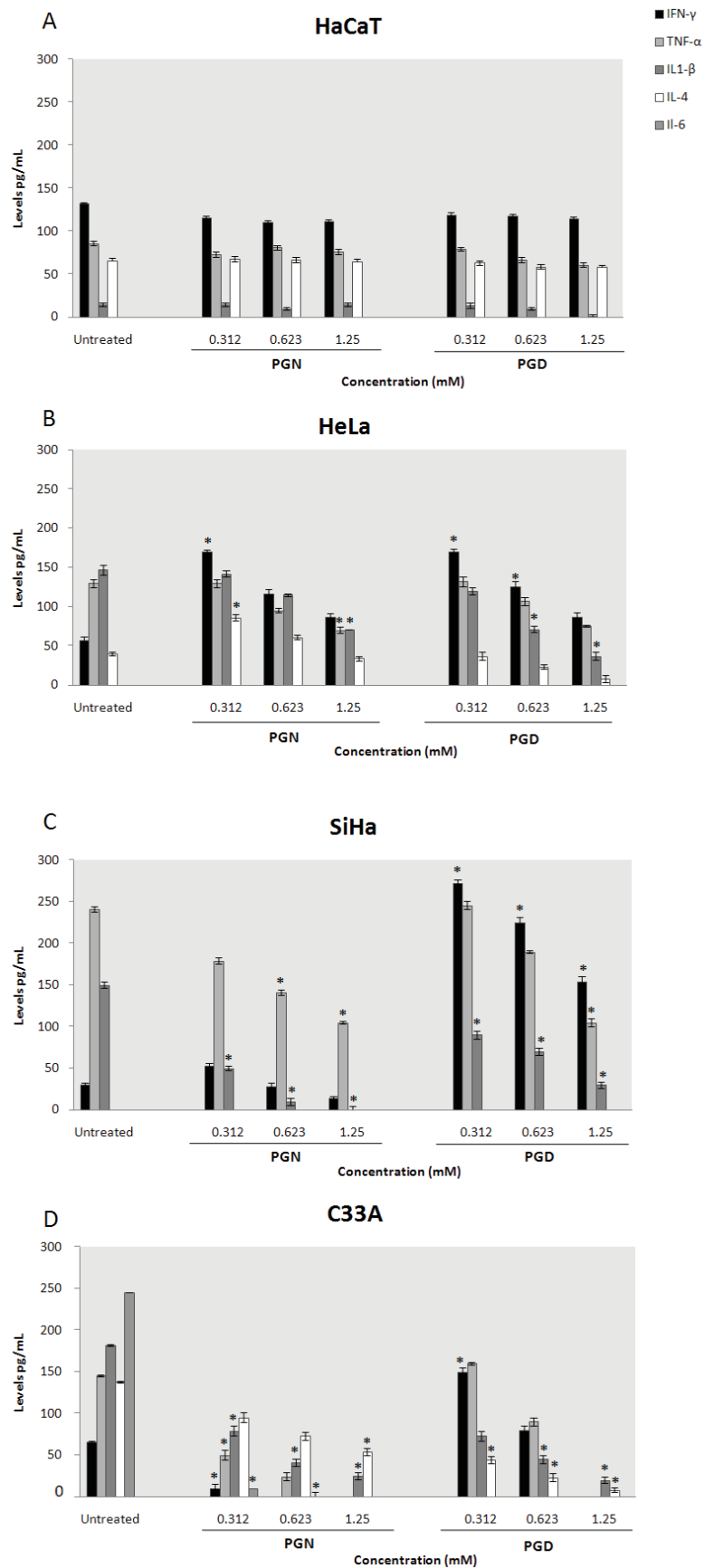
[73] Bogo D. Avaliação in vitro da atividade antineoplásica do ácido lacanórico e de seus produtos de modificação estrutural. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

[74] Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 2002;80:67-73.

[75] Regasini LO, Rebuglio Velloso JC, Silva DHS, Furlan M, Mascarenhas DE Oliveira OM, Khalil NM, Brunetti IL, Marx Young MC, Barreiro EJ, Bolzani VS. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 2008;69:1739-1744.

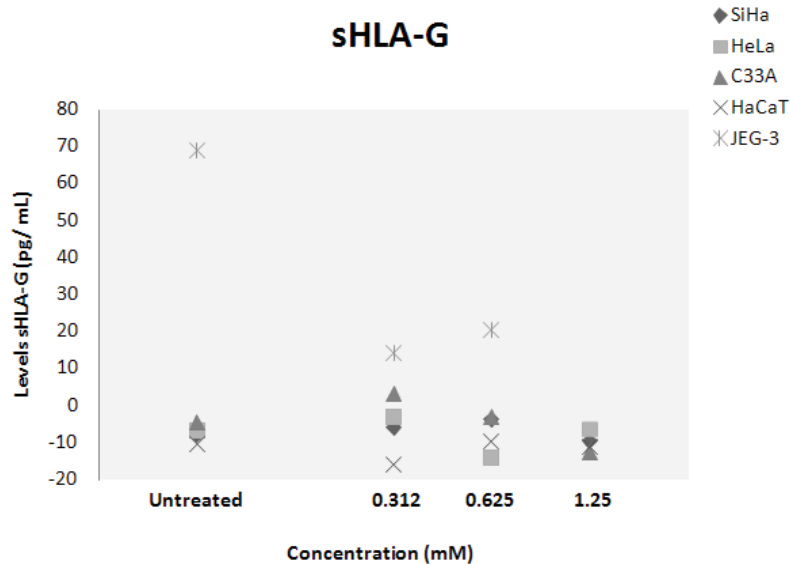


**Figure 1.** Chemical structure of the guanidine alkaloids pterogynine (PGN) and pterogynidine (PGD) isolated from *Pterogyne nitens*.

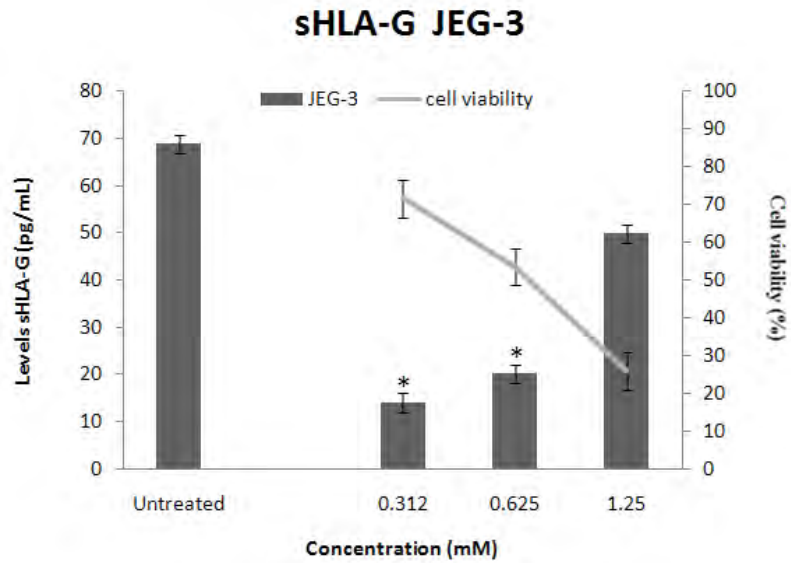


**Figure 2.** Effect of the pterogynine (PGN) and pterogynidine (PGD) alkaloids on the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-6 in human cell lines HaCaT (A), HeLa (B),

SiHa (C) and C33A (D) cultured for 24 h. The cell culture supernatants were collected for the measurement of cytokines by ELISA. Untreated: cells in culture medium (DMEM F10). Data are reported as means  $\pm$  SEM of three independent experiments. One-way ANOVA followed by the Tukey post-test. \*  $p < 0.01$  vs. Untreated control.



**Figure 3.** sHLA-G levels determined by ELISA. Cell culture supernatants (SiHa, HeLa, C33A, HaCaT and JEG-3) treated for 24 h with PGD. Untreated: cells in culture medium (DMEM F10). Data are reported as means  $\pm$  SEM of three independent experiments.



**Figure 4.** Levels of sHLA-G in the JEG-3 line and cell viability determined by the MTT method using treatment with PGD. Untreated: cells in culture medium (DMEM F10). Data are reported as means  $\pm$  SEM of three independent experiments. One-way ANOVA followed by the Tukey post-test. \*  $p < 0.001$  vs. Untreated control.