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

# DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**Aluna: Juliana Cristina Brandi**

**Orientadora: Profa. Dra. Valéria Valente**

## Análise de esteroides isolados do veneno de *Rhinella marina* (Sapo-cururu) na indução de apoptose em câncer cervical associado ao Papilomavírus Humano (HPV)

**Araraquara-SP**

**2022**

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

JULIANA CRISTINA BRANDI

# Análise de esteroides isolados do veneno de *Rhinella marina* (Sapo-cururu) na indução de apoptose em câncer cervical associado ao Papilomavírus Humano (HPV)

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

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Valente

Araraquara-SP
2022

Brandi, Juliana Cristina.

**B817a** Análise de esteroides isolados do veneno de *Rhinella marina* (Sapo-cururu) na indução de apoptose em câncer cervical associado ao Papilomavírus Humano (HPV) / Juliana Cristina Brandi. – Araraquara: [S.n.], 2022.

58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Citologia Clínica e Biologia Celular.

Orientador: Valéria Valente.

1. Citotoxicidade. 2. Marinobufagina. 3. Substâncias naturais. 4. Câncer cervical. I. Valente, Valéria, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030081P7**

**Esta ficha não pode ser modificada**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Araraquara**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise de esteroides isolados do veneno de Rhinela marina (sapo cururu) na indução de apoptose em câncer cervical associado ao Papilomavirus Humano (HPV)

**AUTORA: JULIANA CRISTINA BRANDI**
**ORIENTADORA: VALERIA VALENTE**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALERIA VALENTE (Participaçao Virtual)
Departamento de Analise Clinicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. CARMEN LUCIA BASSI BRANCO (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Básicas em Saúde / Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participaçao Virtual)
Departamento de Analises Clinicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 31 de janeiro de 2023

***Projetos recebidos***

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 financiamento dos Projetos abaixo descritos:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Apoio financeiro recebido pelo Projeto INCBioNat/FAPESP (Processo n° 2014/50926-0).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil (CNPq). Projeto INCTBiNat/CNPq (Processo n° 465637/2014-0).

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”*

*Albert Einstein*

***Dedicatória***

Os esforços para a realização deste trabalho, assim como de toda a trajetória de graduações, especializações, mestrado e ainda do que está por vir se deu às custas da compreensão das pessoas ao meu redor, que souberam me apoiar, incentivar e acalentar quando necessário, assim como ceder os momentos especiais para que eu pudesse me dedicar aos estudos. Muito Obrigada!

***Agradecimentos***

*Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por todos aqueles que colocou ao meu redor, que foram responsáveis por moldar a pessoa que me tornei.*

*Agradeço aos pais maravilhosos, Célia e Claudemir, que sempre me incentivaram na educação, gentileza, caráter e determinação para cumprir meus objetivos.*

*Aos meus filhos queridos, Nicolas e João Pedro, que souberam compreender minhas ausências, dentre tantos trabalhos e obrigações, para que eu possa ser um exemplo de determinação e conquistas. Agradeço por serem meu porto seguro e pelo amor incondicional, sem críticas ou julgamentos.*

*Ao meu companheiro, parceiro e confidente Alberto Camilo Alécio Júnior, agradeço por toda paciência e ajuda, não só na conclusão do trabalho, mas em todos os aspectos da vida.*

*Agradeço à minha professora Profa. Dra. Christiane Pienna Soares, por me incentivar a encarar novos desafios e acreditar na minha capacidade.*

*À professora e orientadora Dra. Valéria Valente, pelo acolhimento e disponibilidade.*

*Aos mestres acadêmicos que passaram pela minha trajetória, e deixaram um pouco do seu conhecimento e carinho. Alguns deles já não temos mais entre nós, mas ainda assim, jamais serão esquecidos.*

*A minha família em geral, tios, primos, avô que sempre acreditaram que eu seria capaz. Aos amigos queridos, que sempre me incentivaram e me ajudaram quando eu mais precisei.*

*Aos meus amigos e amigas, por me entenderem, me incentivarem, me ajudarem com as necessidades que tinha para que eu pudesse cumprir os prazos. Obrigada!*

*Aos companheiros do Laboratório de Citologia e Biologia Celular, que sempre ofereceram auxílio, contribuindo para meu conhecimento e realização do trabalho: Luis Fernando, Natália, Karolayne, Ketlyn, Letícia, Jaqueline, Felipe, Deivys, Marcos e em especial a doutora e amiga Geovana Navegante, que dispensou muitos momentos dos seus estudos para colaborar com meus experimentos.*

## RESUMO

O câncer cervical é o terceiro tipo mais comum entre as doenças oncológicas femininas no mundo. A cada ano, mais de 300.000 mortes são registradas por câncer do colo do útero associado ao vírus do papiloma humano (HPV), que por sua vez é um dos principais agentes das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), que infectam mais de 80% das pessoas em algum momento de suas vidas. Embora 90% das infecções por HPV regridam naturalmente em dois anos, 10 a 20% terão uma infecção persistente. Considerando a baixa adesão vacinal em todo o mundo e a ausência de uma terapia antiviral comercial, o uso de compostos naturais, direcionados às vias celulares que são desreguladas pela infecção pelo HPV, pode ser relevante para a descoberta de novos fármacos. *Rhinella marina* também conhecida popularmente como sapo-cururu é uma das espécies venenosas mais encontradas no continente australiano e na América do Sul, cujo veneno é extraído para o isolamento de inúmeras substâncias puras. Vários estudos tem avaliado compostos isolados do veneno do sapo-cururu australiano, retirado da secreção da glândula parótida, que contêm compostos denominados bufadienolideos, contendo marinobufagina (MBG) ($C_{24}H_{32}O_5$), telocinobufagina (TBG) ($C_{24}H_{34}O_5$) e bufadienotoxinas como a marinobufotoxina (MBT) ($C_{38}H_{56}N_4O_9$). Neste estudo, as linhagens celulares de câncer cervical HPV positivas (SiHa e CasKi), HPV negativas (C-33A) e queratinócitos da pele imortalizados espontaneamente (HaCaT) foram tratadas com MBG, TBG e MBT. A citotoxicidade foi avaliada em diferentes concentrações (7,81uM, 15,62uM, 31,25uM, 62,50uM e 125uM), realizada pelo do ensaio MTT. Concentrações capazes de inibir a viabilidade celular em 50% das células tratadas, bem como o índice de seletividade (IS) foram calculados para todos os experimentos. Em seguida, foi avaliado o potencial apoptótico pela determinação dos níveis de caspases 3/7, por luminescência (Promega). O ensaio de MTT demonstrou menor viabilidade das células SiHa tratadas com MBG (CI50 de 12,4uM, IS de 12,89). Os níveis das caspase 3/7 foram significativamente maiores para células SiHa tratadas com MBG, quando comparados às demais linhagens celulares. Portanto, MBG foi a substância que apresentou maior capacidade de reduzir a viabilidade celular, em 24 horas de tratamento (CI50 12,4uM), induzindo apoptose dependente de caspases para células SiHa. Os resultados foram confirmados posteriormente por imagens de fluorescência utilizando Hoescht e LDR. Em conclusão, a MBG demonstrou um efeito apoptótico seletivo para células SiHa e deve ser explorado futuramente como um potencial agente terapêutico para o câncer cervical associado ao HPV16.



Palavras-chave: citotoxicidade; marinobufagina; substâncias naturais; câncer cervical

## ABSTRACT

Cervical cancer is the third most common type of female cancer in the world. Each year, more than 300,000 deaths are recorded from cervical cancer associated with the human papilloma virus (HPV), which in turn is an important sexually transmitted transmission agent (STIs) which infect more than 80% of people at some point in their lives. Although 90% of HPV infections naturally regress within years, 10 to 20% will have a persistent infection. Considering the low vaccine adherence worldwide and the absence of commercial antiviral therapy, the use of natural compounds, targeted at cellular pathways that are deregulated by HPV infection, may be relevant for the discovery of new drugs. *Rhinella marina*, also popularly known as frog-cururu, is one of the most poisonous species found on the Australian continent and in South America, whose poison is extracted for the isolation of numerous pure substances. Several studies have evaluated compounds isolated from the poison of the Australian cane toad, removed from the secretion of the parotid gland, which contain compounds called bufadienolides, containing marinobufagin (MBG) ($C_{24}H_{32}O_5$), telocinobufagin (TBG) ($C_{24}H_{34}O_5$) and bufadienotoxins suck as marinobufotoxin (MBT) ($C_{38}H_{56}N_4O_9$). In this study, HPV positive (SiHa and CasKi), HPV negative (C-33A) and spontaneously immortalized skin keratinocytes (HaCaT) cervical cancer cell lines were treated with MBG, TBG and MBT. Cytotoxicity was evaluated at different concentrations (7.81uM, 15.62uM, 31.25uM, 62.50uM and 125uM), performed using the MTT assay. Concentrations capable of inhibiting cell viability in 50% of treated cells, as well as the selectivity index (SI) were calculated for all experiments. Then, the apoptotic potential was evaluated by determining the levels of caspases 3/7, by luminescence (Promega). The MTT assay demonstrated lower viability for MBG-treated SiHa cells (IC50 12.4uM, IS 12.89). Caspase 3/7 levels were significantly higher for MBG-treated SiHa cells when compared to other cell lines. Therefore, MBG was the substance that showed the greatest capacity to reduce cell viability, in 24 hours of treatment (IC50 12.4uM), inducing caspase-dependent apoptosis for SiHa cells. Results were further confirmed by fluorescence imaging using Hoescht and LDR. In conclusion, MBG demonstrated a selective apoptotic effect for SiHa cells and should be explored in the future as a potential therapeutic agent for cervical cancer associated with HPV16.



**Keywords:** cytotoxicity; marinobufagin; natural substances; cervical cancer

## SUMÁRIO


**1. INTRODUÇÃO…….. 17**

1.1. Câncer cervical……..…… 18

1.2. Papilomavírus humano (HPV)..... 19

1.2.1. Epidemiologia do HPV……... 22

1.2.2. Genoma do HPV…… 23

1.3. Produtos naturais na medicina ……..… 25

1.3.1. Veneno de *Rhinella marina* (sapo-cururu) ……..…….. 26

1.4. Morte celular e câncer …….....…… 28

1.5. Quimioterapia e Índice de Seletividade das substâncias puras..... 30

**2. OBJETIVOS GERAIS……. 32**

2.1. Objetivos específicos…… 32

**3. MATERIAIS E MÉTODOS……. 32**

3.1. Substâncias puras isoladas do veneno de *Rhinela marina*..... 32

3.2. Linhagens celulares…….…. 33

3.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT…….…… 33

3.4. Determinação do CI50 e índice de seletividade (IS)..... 34

3.5. Ensaio de ativação de caspases…… 35

3.6. Ensaio qualitativo de morte celular por fluorescência…….…… 36

3.7. Análise estatística…….…… 36

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO……. 37**

4.1. Ensaio de viabilidade celular - MTT……..…… 37

4.2. Determinação do CI50 e Índice de seletividade (IS)..... 44

4.3. Atividade das caspases - Ensaio Caspase GLO3/7…….…….. 45

4.4. Ensaio qualitativo de morte celular por fluorescência……. 47

**5. CONCLUSÃO…….....……... 51**

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……. 51**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Distribuição de incidência estimada (2020) e mortalidade (2019) de diferentes tipos de cânceres por localização primária em mulheres no Brasil ..... 18

**Figura 2.** Representação esquemática da infecção e do ciclo de vida do HPV de alto risco e progressão tumoral..... 19

**Figura 3**. Representação esquemática da atuação das oncoproteínas E6 na degradação de p53 e E7 que se liga à pRb, liberando E2F, para que ocorra a transcrição de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular ..... 22

**Figura 4.** Representação esquemática da estrutura viral do HPV. As proteínas L1 e L2 se ligam formando os capsômeros que envolvem o genoma viral em uma estrutura icosaédrica ..... 24

**Figura 5. A**. Funções específicas de cada proteína viral; **B.** representação esquemática do genoma viral do HPV **C.** Infecção persistente e consequente integração viral, com repressão de E1 e E2, super expressão de E6 e E7, e consequente desregulação de p53 e degradação de pRb ..... 25

**Figura 6. A**. *Rhinella marina* (sapo-cururu); **B**. Veneno sendo extraído do sapo..... 27

**Figura 7.** Substâncias puras. **A.** Marinobufagina; **B.** Telocinobufagina; **C.** Marinobufotoxina ..... 28

**Figura 8.** Representação esquemática das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca.. 30

**Figura 9.** Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical SiHa tratada com MGB, MBT e TBG em 24 horas de tratamento ..... 37

**Figura 10**. Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical CasKi tratada com MGB, MBT e TBG em 24 horas de tratamento ..... 37

**Figura 11.** Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical C-33A tratada com MGB, MBT e TBG em 24 horas de tratamento ..... 38

**Figura 12.** Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical HaCaT tratada com MGB, MBT e TBG em 24 horas de tratamento ..... 39

**Figura 13.** Porcentagem de viabilidade celular (MTT). Comparação entre as linhagens SiHa, CasKi, C-33A e HaCaT tratadas com as substâncias MBG (A), MBT (B) e TBG (C) em 24 horas de tratamento ..... 39

**Figura 14.** Ensaio de apoptose por quimioluminescência: Método de ativação das Caspases 3/7 no tempo de 12 horas de tratamento com MBG ..... 45

**Figura 15.** Ensaio de ativação das Caspases 3/7. Comparação entre as linhagens no tempo de tratamento de 12 horas com MBG ..... 46

**Figura 16.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem SiHa tratada com CI50 de MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação ..... 47

**Figura 17.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem CasKi tratada com CI50 de MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação ..... 48

**Figura 18.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem C-33A tratada com CI50 de MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação ..... 49

**Figura 19.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem HaCaT tratada com MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação ..... 50

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1**. Cálculo da Concentração Inibitória de 50% (CI50) ..... 44

**Tabela 2.** Cálculo do Índice de Seletividade (IS) calculados a partir dos valores de CI50... 44

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BCL-2, BCL-W, BCL-X | Proteínas anti-apoptóticas |
| BIM, BID, PUMA, BAD, NOXA | Proteínas pró-apoptóticas |
| CI50 | Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular |
| CIN I | Neoplasia intraepitelial grau I |
| CIN II | Neoplasia intraepitelial grau II |
| CIN III | Neoplasia intraepitelial grau III |
| CO2 | Gás carbônico |
| CN | Controle negativo |
| CP | Controle positivo |
| CV | Controle de veículo |
| CSCCS | Carcinoma de células escamosas |
| C-33 A | Células de carcinoma cervical não associadas ao HPV |
| DMEM | Meio de Eagle modificado por Dulbelco (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DP | Desvio Padrão |
| *E* | *Early* |
| E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 | Proteínas virais |
| E2F | Fator de transcrição |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetraacético |
| EMT | Epitélio mesenquimal de transição |
| F10 | Mistura de nutrientes F10 de Ham (Ham's F10 Nutrient mixture) |
| HaCaT | Queratinócitos humanos imortalizados |
| HO | Hoechst 33342 |
| HPV | Papilomavírus humano |
| HSIL | Lesão de alto grau de malignidade |
| JEC | Junção escamo colunar |
| IS | Índice de seletividade |

| | |
|---|---|
| *L* | *Late* |
| L1, L2 | Proteínas de capsídeo viral |
| LDR | Live death red |
| *LCR* | *Long control region* |
| LPN | Laboratório de Produtos Naturais |
| LSIL | Lesão de baixo grau de malignidade |
| MBT | Marinobufotoxina |
| MGB | Marinobufagina |
| MTT | brometo de 3-(4,5– dimetilazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| pRb | Proteína pRb |
| p53 | Proteína p53 |
| RE | Retículo endoplasmático |
| SiHa | Linhagem de carcinoma cervical humano infectada pelo HPV-16 |
| *URR* | *Upstream regulatory region* |
| TGB | Telocinobufagina |
| T0 | Tempo 0 (células sem tratamento) |
| T1 | Tempo 1 (24h após tratamento) |
| T2 | Tempo 2 (48h após tratamento) |
| T3 | Tempo 3 (72h após tratamento) |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÂNCER CERVICAL

Câncer é um termo genérico utilizado para identificar um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal e disseminação descontrolada de células que por sua vez, apresentam manifestações patológicas, tais como perda do controle da proliferação celular e capacidade de invadir tecidos adjacentes, podendo afetar qualquer parte do corpo (TEKALEGN, 2022). Estas manifestações podem surgir a partir de uma única célula e são resultado da interação entre fatores genéticos e fatores externos, como por exemplo, exposição à radiação ultravioleta ou ionizante, agentes químicos, como tabaco, álcool, arsênio entre outros, e também, com agentes biológicos tais como infecções bacterianas, parasitárias e por alguns vírus como o Papilomavírus Humano (HPV). O HPV é reconhecidamente o principal agente etiológico relacionado ao desenvolvimento do câncer de colo de útero, porém a infecção pode também estar associada a diferentes cofatores como o uso de contraceptivos orais, tabagismo, paridade e dieta, as quais também podem contribuir para a progressão do desenvolvimento desse tipo de câncer (TEKALEGN, 2022; KHAN, 2019).

O câncer cervical é um tipo de câncer que se forma nos tecidos do colo uterino, região que liga o útero e a vagina. É uma das doenças malignas mais comuns entre mulheres, sendo classificada como o terceiro tipo de neoplasia de maior incidência e mortalidade, com cerca de 600 mil casos, e a quarta principal causa de morte por cânceres entre mulheres no mundo (TEKALEGN, 2022; YI, 2020; KHAN, 2019). A cada ano são contabilizadas mais de 300.000 mortes por câncer cervical associado ao HPV, sendo 88% dessas mortes em países subdesenvolvidos, onde sua ocorrência pode estar associada à falta de acesso a programas de saúde estruturados e dificuldade de cobertura vacinal (YI, 2021; BYCHKOVSKY, 2018; VALEA, 2018). No Brasil, estimativas indicam que o câncer cervical também é o terceiro tipo mais incidente entre as mulheres, acometendo mais de 16 mil novos casos em 2020, e o quarto tipo com maior mortalidade, atingindo cerca de 6 mil óbitos em 2019 como representado na Figura 1 (TEKALEGN, 2022; INCA, 2021).

A infecção pelo HPV é geralmente assintomática e a progressão para o câncer cervical é lenta (5 a 20 anos), pois está associada ao acúmulo de alterações no DNA das células hospedeiras e está diretamente relacionada ao sistema imunológico da mulher, diferentes cofatores e mecanismos de latência (GRAVITT, 2017).

Apesar da diminuição da incidência e da mortalidade de pacientes acometidos por câncer cervical devido à eficácia de diagnósticos e vacinas, ainda assim não é possível

eliminar o vírus, a não ser por terapia vacinal em faixa etária precoce (9 a 14 anos em meninas e 11 a 14 anos em meninos). Em contrapartida, infecções persistentes de vírus de alto risco de malignidade (HPV16 ou HPV18) levam a evolução de lesões pré-malignas a malignas. Além disso, não existem até o momento opções terapêuticas farmacológicas comercialmente disponíveis o que limita e favorece a progressão do câncer cervical invasivo ou recorrente (YI, 2020).

**Figura 1.** Distribuição de incidência estimada (2020) e mortalidade (2019) de diferentes tipos de cânceres por localização primária em mulheres no Brasil (autoria própria – Informações extraídas do site do INCA publicados em 2021. www.inca.gov.br)

| INCIDÊNCIA ESTIMADA<br>Por localização primária do tumor em mulheres | Casos Novos | % |
|---|---|---|
| Mama Feminina | 66.280 | 29,7 |
| Cólon e Reto | 20.470 | 9,2 |
| Colo de Útero | 16.710 | 7,5 |
| Traquéia, Brônquio e Pulmão | 12.440 | 5,6 |
| Glândula tireoide | 11.950 | 5,4 |
| Estômago | 7.870 | 3,5 |
| Ovário | 6.650 | 3,0 |
| Corpo do útero | 6.540 | 2,9 |
| Linfoma não-Hodgkin | 5.450 | 2,4 |
| Sistema Nervoso Central | 5.230 | 2,3 |
| Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma | 223.110 | **100,0** |
| Todas as neoplasias | 316.280 | |

| MORTALIDADE<br>Por localização primária do tumor em mulheres | Casos Novos | % |
|---|---|---|
| Mama | 18.068 | 16,4 |
| Traquéia, Brônquio e Pulmão | 12.621 | 11,4 |
| Cólon e Reto | 10.385 | 9,4 |
| Colo de Útero | 6.596 | 6,0 |
| Pâncreas | 5.893 | 5,3 |
| Estômago | 5.475 | 5,0 |
| Sistema Nervoso Central | 4.663 | 4,2 |
| Fígado e Vias Biliares Intrahepáticas | 4.584 | 4,2 |
| Ovário | 4.123 | 3,7 |
| Leucemias | 3.356 | 3,0 |
| Todas as neoplasias | 110.344 | **100,0** |

O colo uterino pode apresentar diversas patogenias como incompetência cervical, doença inflamatória pélvica (DIP), cervicite, pólipos, verrugas, lesões de baixo grau de malignidade (LSIL), alto grau (HSIL) e câncer. A infecção persistente por HPV resulta na progressão de LSIL para HSIL até carcinoma *in situ*, invasor com ou sem metástase. Wang e colaboradores (2021), relatam ainda presença de lesões precursoras do câncer cervical que são denominadas lesões malignas *in situ* e as neoplasias intraepiteliais cervicais que são classificadas em CIN I, CIN II e CIN III por grau, onde CIN I tem alta probabilidade de regressão natural (cerca de 90%), enquanto CIN II e III (lesões com alto grau de malignidade) representam uma efetiva e irreversível progressão para o câncer cervical.

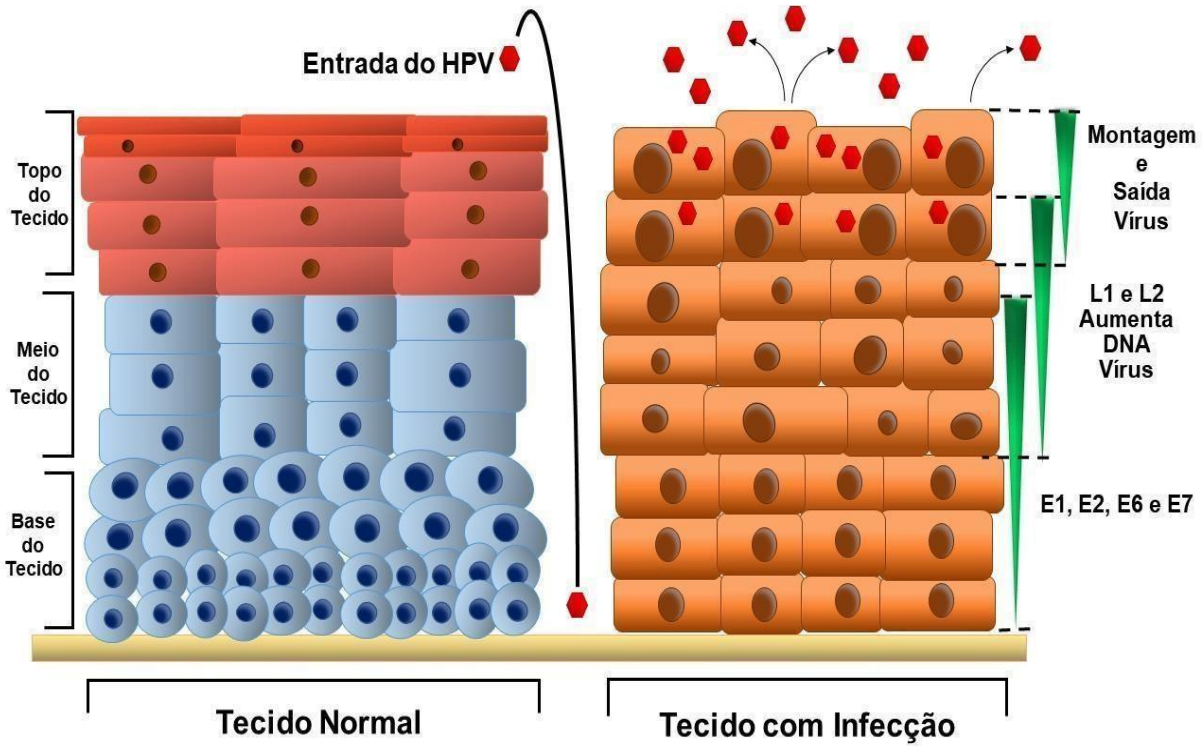
Pesquisas e medidas de precaução e rastreamento do câncer de colo uterino são regularmente realizadas através do exame de Papanicolau, que podem revelar precocemente lesões precursoras, resultando na remissão da lesão e baixo potencial de evolução para lesões malignas e assim, colaboram para o declínio dos casos de câncer cervical (TEKALEGN, 2022).

O programa de vacinação contra o HPV na adolescência, também contribui significativamente para a eliminação da transmissão viral (YI, 2020). As vacinas bivalentes e quadrivalentes, dirigidas a imunização contra o HPV 16 e 18 (bivalente – Glaxo Smith-Klein©) e HPV 6, 11, 16 e 18 (quadrivalente, Merck©) protegem com alta eficiência a infecção por estes tipos virais e no caso da vacina quadrivalente, há proteção cruzada contra três tipos virais (HPV31/33/45) antes da exposição da infecção pelo HPV. Recentemente uma vacina nonavalente (Gardasil 9, Merck ©), foi aprovada pela ANVISA e protege contra nove tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) (TSANG, 2020). Entretanto, o Sistema Único de Saúde (SUS) ainda não disponibiliza esta vacina gratuitamente (ARBY, 2020; JOURA, 2015).

## 1.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

A infecção pelo HPV é dada pelo contato sexual de pele com pele e pele e mucosa. O HPV possui um modo único de infecção quando comparado a outros vírus, pois ele penetra nas células da camada basal do epitélio a partir de microlesões, onde encontra um ambiente celular com alta atividade proliferativa. O ciclo de vida do vírus está ligado intimamente ao processo de diferenciação do tecido epitelial. Como representado na figura 2, conforme ocorre a diferenciação do epitélio (camada intermediária a superficial), o genoma viral é amplificado, o capsídeo viral que envolve seu genoma é constituído e novas partículas virais são liberadas nas camadas superficiais do epitélio (KAJITANI, 2012; WAROWICKA, 2022; ZAYATS, 2022). A região anatômica do colo uterino mais suscetível à infecção viral e carcinogênese é denominada junção escamo colunar (JEC) onde as células basais estão mais expostas o que favorece a entrada do vírus (DELLA FERA, 2021). O HPV também pode permanecer em reservatórios (pelos e glândulas), permitindo a recidiva da infecção (MCBRIDE, 2022).

**Figura 2.** Representação esquemática da infecção e do ciclo de vida do HPV de alto risco e progressão tumoral. O vírus infecta a camada basal do epitélio através de microlesões, podendo causar uma infecção episomal ou pela integração do seu material genético no DNA da célula hospedeira; novas partículas virais são montadas e liberadas pelas camadas superficiais (autoria própria)




Considerando que a infecção pelo vírus HPV é um fator causal para o desenvolvimento do câncer cervical, é importante conhecer as características específicas do vírus. O HPV pertence à família *Papillomaviridae* e são pequenos vírus, não envelopados, responsáveis por quase 5% de todos os tipos de neoplasias malignas. Os primeiros genomas do vírus foram isolados de amostras de pele de pacientes com epidermodisplasia verruciforme em meados de 1970 (GISSMANN, 1982). Atualmente, já foram identificados mais de duzentos tipos de HPV, pertencentes aos gêneros alfa, beta, gama, nu e mu (MCBRIDE, 2022). Entre os quinze tipos conhecidos de alto risco, estão os subtipos da família *Alfapapilomaviridae* que causam câncer anogenital: o HPV16 e 18. Estes dois tipos virais são responsáveis por ocasionar cerca de 80% dos cânceres de colo de útero, enquanto os tipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58 são responsáveis pela carcinogênese em 20% das pacientes com tumores de vulva, vagina, ânus, pênis e orofaringe (MCBRIDE, 2022; WAROWICKA, 2022; DONG, 2020). Sabe-se que o sistema imunológico é capaz de eliminar em meses a maioria das infecções por HPV, mas alguns subtipos considerados de alto risco, persistem e expressam seus oncogenes virais, que levam ao aumento da instabilidade genômica, acúmulo de mutações somáticas e integração do HPV no genoma do paciente infectado (REVATHIDEVI, 2021).

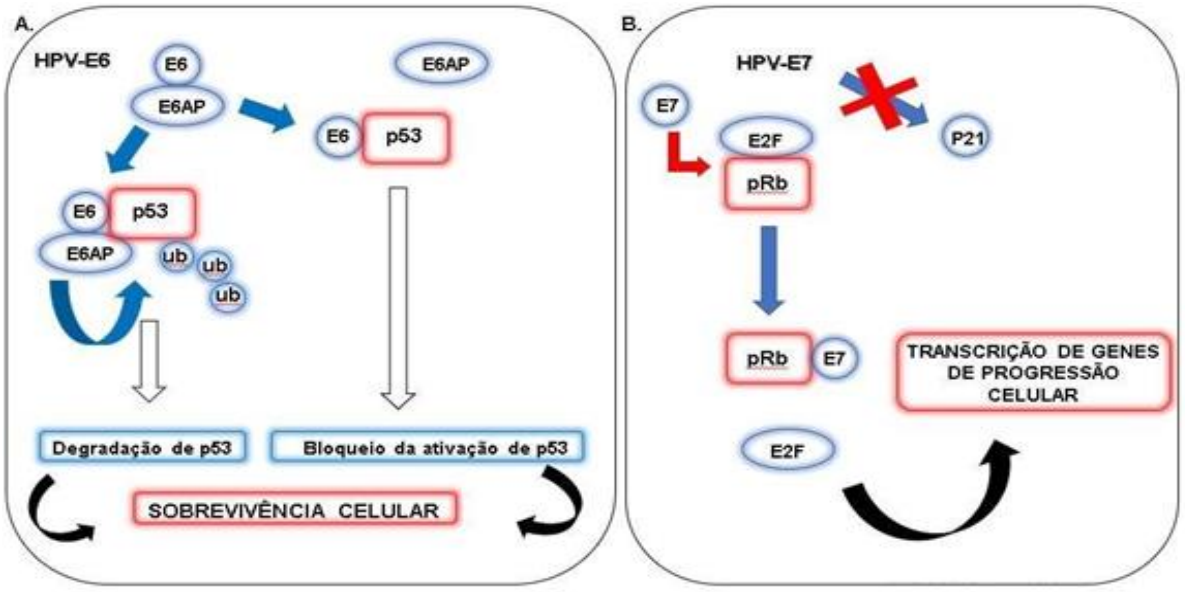
Os vírus capazes de infectar as mucosas são classificados pelo seu potencial oncogênico, sendo o grupo de baixo risco responsável pelo aparecimento de lesões benignas como condiloma acuminado (verrugas de colo uterino), e o grupo de alto risco está relacionado ao aparecimento das neoplasias malignas, das quais podem ser divididas em dois grupos distintos: carcinomas de células escamosas (CSCCs) e os adenocarcinomas. Porém,

independentemente de serem de baixo ou alto risco, o HPV infecta as células epiteliais, particularmente os queratinócitos, os imortaliza e ainda desenvolvem a capacidade de persistir e se replicar em diversos tipos de epitélios estratificados, utilizando as vias celulares de proliferação, replicação, diferenciação e defesa imunológica (MCBRIDE, 2022; REVATHIDEVI, 2021).

A carcinogênese cervical geralmente está associada à infecção persistente do HPV de alto risco, o que permite sua auto renovação nas células do hospedeiro, de modo que possa evadir-se de sua resposta imune (MCBRIDE, 2022; BORDIGNON, 2017). Após a infecção, os HPVs de alto risco, integram seu material genético ao DNA da célula hospedeira, causam perda supressora de E2 que ocorre no momento da integração dos oncogenes E6 e E7, que por sua vez, são responsáveis pela produção das oncoproteínas E6 e E7 capazes de desregular a função de duas principais proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb (retinoblastoma) respectivamente, alterando assim, os eventos de controle de ciclo celular, proliferação e apoptose (GUPTA, KUMAR e DAS, 2018; HOPPESEYLER, 2018).

Uma célula normal é capaz de reparar danos em seu DNA através de mecanismos específicos de reparo. Quando o dano não pode ser reparado, os controles de pontos de verificação do ciclo celular ativam proteínas capazes de sinalizar para que a célula entre em apoptose. As oncoproteínas E6 e E7 interrompem o controle dos pontos de verificação, inibem proteínas como p21, que atuam na parada do ciclo e sinalizam a degradação de p53 e pRb, permitindo que a célula continue se replicando. Na figura 3A, E6 se liga à p53 e recruta a proteína E6AP, responsável por promover a ubiquitinação de p53, resultando em consequente degradação proteassômica mediada por ubiquitina, ou por apenas bloqueando sua ativação. Neste momento, o HPV aproveita para produzir um grande número de DNA episssomal, necessários para que o DNA viral se integre no DNA da célula hospedeira (BALASUBRAMANIAM, 2019). Do mesmo modo, a degradação de pRb e a inativação de p21 por E7, e consequente liberação do fator de transcrição E2F (Figura 3B) promovem a entrada não programada na fase S, garantindo a proliferação, indispensável para a replicação viral. Essa modulação afeta as proteínas de controle ciclo celular (CDKA/Ciclina E), atrasando a diferenciação celular, o que torna possível a replicação viral irrestritamente (BALASUBRAMANIAM, 2019; FISCHER, 2017). Enquanto a replicação e amplificação acontecem, L1 e L2 são sintetizadas apenas nas células epiteliais mais diferenciadas da superfície e são responsáveis pelo envolvimento do DNA viral pelo capsídeo proteico (MCBRIDE, 2022; ZAYATS, 2022; BALASUBRAMANIAM, 2019).

**Figura 3.** Representação esquemática da atuação das oncoproteínas E6 na degradação de p53, E7 que se liga à pRb, liberando E2F, e inativa p21, para que ocorra a transcrição de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular (autoria própria).




Resumidamente, conforme representado na Figura 3, as transformações malignas causadas pelo HPV, são medidas pela co-expressão regular das oncoproteínas E6 e E7, que atuam na desregulação da proliferação e controle do ciclo celular por atuarem respectivamente, em p53 e pRb. Assim, estratégias terapêuticas também baseadas na restauração da função de p53, bloqueando sua degradação mediada por E6 e E6AP são atraentes no cenário atual, porém até o momento ainda não foram encontrados agentes específicos que possam bloquear a degradação da p53 mediada por E6 (YI, 2020).

### 1.2.1. EPIDEMIOLOGIA DO HPV

O papilomavírus humano (HPV) é uma das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns no mundo, com mais de 80% das pessoas infectadas em algum momento da vida. Apesar de a maioria das pessoas conseguirem eliminar uma infecção por HPV dentro de até dois anos, cerca de 10 a 20% das mulheres infectadas terão infecção persistente. Os tipos mais frequentes de HPV envolvidos são o 6 e 11, presente em cerca de 80% das lesões orais e mais de 90% das lesões genitais (MAGALHÃES, 2021, DICKEY, 2021). O HPV é responsável por diferentes tipos de tumores anogenitais, incluindo o câncer de colo de útero que representa o maior impacto epidemiológico**.**

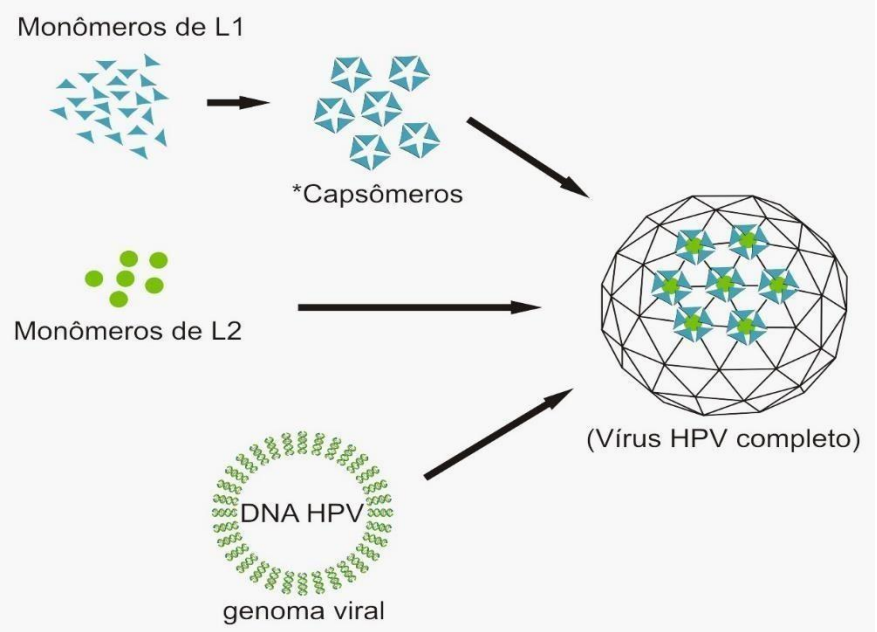
O pico de incidência de infecção pelo HPV geralmente está entre 24 e 30 anos de idade para ambos os sexos e embora a prevalência diminua com a idade, de acordo com Magalhães e colaboradores (2021) há um segundo pico tardio de infecção que ocorre em mulheres na quinta década de vida. Embora atualmente mais de 200 milhões de doses de vacinas tenham sido administradas, ainda há uma taxa significativa de infecções e a epidemiologia da doença deve continuar a ser estudada visando melhorias na saúde pública (WITTENBORN, 2021).

No Brasil, estudos anteriores mostraram uma prevalência de HPV genital variando entre 10 a 72% dependendo do sexo e uma prevalência de 6% de HPV em orofaringe sobre o total de casos de HPV no país, portanto, aparentemente a infecção varia entre os sexos e sítios anatômicos (COLPANI, 2020). Sendo o Brasil um país de proporções continentais e diferentes níveis socioeconômicos, a epidemiologia do HPV no país pode ser influenciada por essas variáveis. A vacina para HPV entrou para o Programa Nacional de Imunização (PNI) do Brasil em 2014 para meninas (9 a 14 anos) e em 2016 para meninos (11 a 14 anos) (GOMES, 2020). Entretanto, o impacto da vacinação nas taxas de infecção ainda precisa ser melhor avaliado no futuro, buscando entender a prevalência do HPV antes e depois da vacinação, a fim de compreender as mudanças relacionadas à incidência do câncer de colo uterino (COLPANI, 2020, WENTZENSEN, 2015).

### 1.2.2. GENOMA DO HPV

O genoma do HPV é agrupado em cinco diferentes gêneros de acordo com a sequência de genes da proteína L1: alfa, beta, gama, nu e mu, baseado no arranjo genético, sendo os do gênero alfa, responsáveis pelas infecções de mucosa genital, enquanto, que os outros têm a capacidade de infectar a nível cutâneo (MCBRIDE, 2022). Apesar da diversidade de tipos de HPV, estes compartilham a mesma estrutura icosaédrica (50-60 nm de diâmetro), que comporta seu genoma de DNA de fita dupla circular (forma episssomal) de aproximadamente 8.000 pares de bases, contendo oito ou nove genes (Figura 4). O capsídeo proteico é composto de 72 capsômeros, contendo 5 subunidades de proteína L1 e uma subunidade de proteína L2. Cada tipo de HPV possui menos de 90% de semelhança de nucleotídeos no gene L1, quando comparados com qualquer tipo de HPV já identificado. Para que haja uma interação entre os capsômeros, é necessário que as caudas N-terminais das proteínas L1 se estendam até os capsômeros vizinhos e se liguem através de pontes dissulfeto (MCBRIDE, 2022; DOORBAR, 2016).

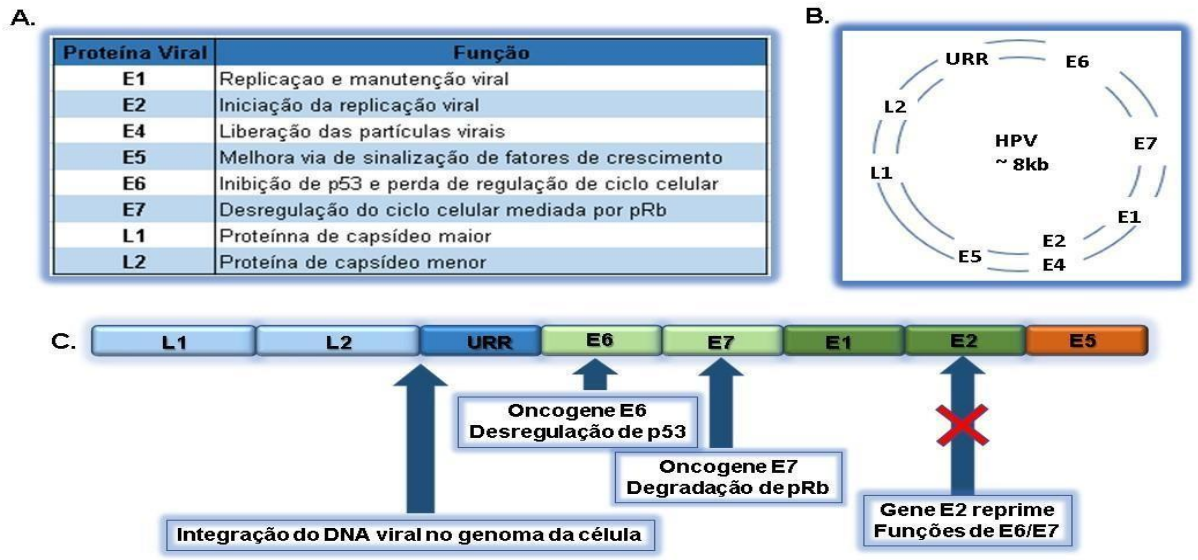
**Figura 4.** Representação esquemática da estrutura viral do HPV. As proteínas L1 e L2 se ligam formando os capsômeros que envolvem o genoma viral em uma estrutura icosaédrica. (Autoria Própria).




O HPV tem seu genoma dividido em três regiões, conforme representado na figura 5C. A região denominada *Early* (E) é aquela que codifica os genes virais precocemente transcritos e traduzidos. Esta região genômica codifica as proteínas E1 e E2, responsáveis por regular a replicação, transcrição e amplificação do DNA viral; E4, E5, E6 e E7, que desempenham um papel importante no ciclo de vida do vírus, permitindo a modificação da diferenciação celular, o ambiente favorável à replicação, o escape da resposta imune do hospedeiro e a transformação maligna, respectivamente. Por outro lado, a região denominada *Late* (L), transcreve e traduz tardiamente as proteínas L1 e L2, que formam o capsídeo do vírus. Por fim, a Região de Controle Longo (LCR), ou atualmente descrita por *Upstream Regulatory Region* (URR), contém sítios de ligação específicos para diferentes fatores reguladores de transcrição que ativam ou reprimem os promotores virais (WARWICK, 2022). As figuras 5A e 5B apresentam as proteínas virais e suas respectivas funções: E1 e E2 iniciam a replicação do DNA viral e atuam como ativadores transcricionais; a proteína E5 atua na evasão da resposta imune e transformação maligna (mais recentemente) e independência celular de fatores de crescimento, cooperando assim para a proliferação celular. A proteína E6/E6AP promove a ubiquitinação da proteína supressora de tumor celular p53, provocando sua degradação e consequente perda do controle de dano celular e indução de apoptose (Figura 3A). Por outro lado, a proteína E7 do HPV ubiquitiniza a proteína de retinoblastoma (pRb), resultando em sua degradação e consequente liberação do fator de transcrição E2F (Figura

3B), entrada irrestrita da célula na fase S do ciclo celular e consequente descontrole da proliferação celular (REVATHIDEVI, 2021).

**Figura 5.** A. Funções específicas de cada proteína viral; B. Representação esquemática do genoma viral do HPV C. Infecção persistente e consequente integração viral, com repressão de E1 e E2, super expressão de E6 e E7, e consequente desregulação de p53 e degradação de pRb (modificado de FREITAS, et al. 2021).




## 1.3 PRODUTOS NATURAIS NA MEDICINA

A utilização de compostos naturais, responsáveis por atingir alvos no sistema biológico de forma controlada é sustentada pelas suas aplicações bem-sucedidas na biologia, química e medicina, porém a busca continuada de substâncias quimicamente ativas e a descoberta de novas pequenas moléculas é um desafio essencial para o avanço da terapêutica (GRIGALIUNAS, 2022).

Diante da boa perspectiva da utilização dos produtos naturais na medicina, protocolos de fracionamento baseados na bioatividade das moléculas, permitiram o isolamento de novas substâncias puras, o que expandiu a gama de possibilidades dos produtos naturais. Apesar da taxa de descobertas de moléculas inovadoras ainda não estarem aumentando como previsto, é aceito que ao se priorizar o acesso a recursos genéticos únicos e estratégias inovadoras, é possível ainda isolar quantidades significativas de novas moléculas com propriedades biológicas interessantes. Nesse sentido, a biodiversidade do Brasil, ainda é uma fonte pouco explorada principalmente no que diz respeito a medicamentos, e a utilização de pesquisas de alta qualidade pode potencializar a descoberta de uma infinidade de novas moléculas bioativas (WILKE, 2021).

Do ponto de vista farmacológico, a diversidade química encontrada no Brasil, favorece uma infinidade de possibilidades, incentivando a busca pelo desenvolvimento de novos medicamentos para tratar todos os tipos de doenças. Hoje, mais de 50% dos medicamentos produzidos à base de pequenas moléculas, vem de produtos naturais, ao que se aplica o reconhecimento ao valor dos produtos naturais como produtos farmacêuticos (WILKE, 2021). Um exemplo clássico foi o desenvolvimento do Captopril®, medicamento sintetizado a partir de uma substância encontrada no veneno da jararaca sul-americana, capaz de potencializar a ação da bradicinina, e consequente diminuição da pressão arterial (BANFI, 2016).

Considerando a alta demanda energética que a célula tumoral necessita para sua proliferação descontrolada e infinita, é necessário que essas células desenvolvam algumas vantagens adaptativas, para que possam receber esse aporte de energia e nutrientes para suprir essa demanda. Assim a célula tumoral necessita de uma alta flexibilidade para utilizar uma variedade de substratos, sugerindo que células tumorais dependam de vias metabólicas reprogramadas para a progressão tumoral (KIESEL, 2021; SAITO, 2016). Sabe-se que as células tumorais optam pela via glicolítica (glicólise aeróbica) para obter energia suficiente para sua alta demanda proliferativa. Resultados publicados recentemente por Souza e colaboradores, (2017) que avaliaram a expressão proteômica diferencial das células tratadas com Nitensidina B, outro produto natural, revelaram que houve uma sub-expressão de proteínas da via glicolítica. Esses achados sugerem que a utilização de produtos naturais como estratégia terapêutica, pode interferir significativamente na demanda energética celular e consequentemente na progressão tumoral.

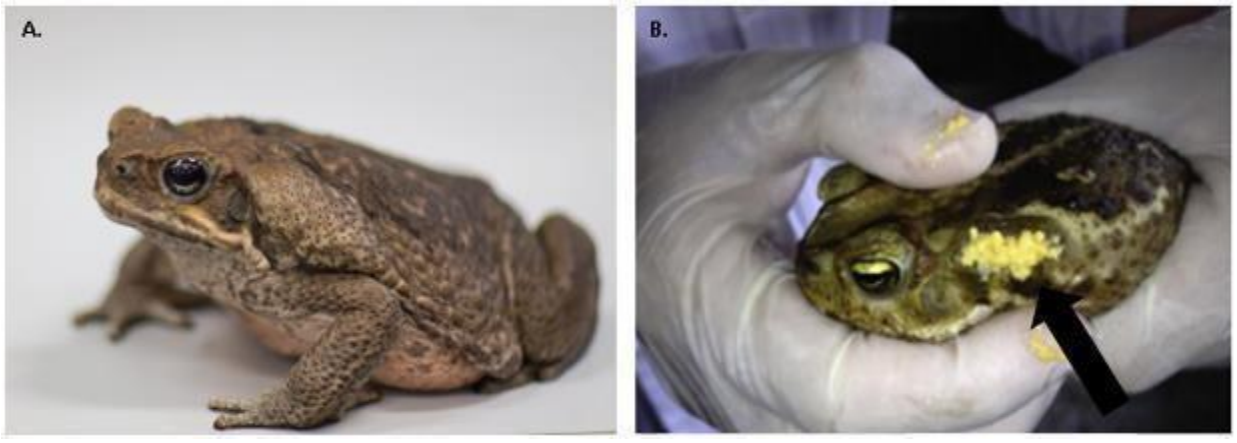
### 1.3.1 VENENO DE *Rhinella marina* (SAPO-CURURU)

A grande biodiversidade de compostos biologicamente ativos, oferecidos pela nossa flora e fauna, provenientes das plantas, fungos, bactérias e animais, é bem conhecida e estudada por nossos ancestrais e utilizada em medicamentos tradicionais. Atualmente, venenos e secreções de animais, têm despertado um interesse científico cada vez maior pois as substâncias presentes no veneno dos sapos, por exemplo, têm se mostrado bons agentes terapêuticos para diversos tipos de cânceres e doenças cardiovasculares (SOUMOY, 2020). Os bufadienolídeos presentes no veneno dos sapos da família *Bufonidae,* se caracterizam pela sua diversidade química e alto potencial farmacológico. Pesquisas realizadas por Rodriguez (2021) mostraram que os bufadienolídeos apresentaram atividade citotóxica contra células VERO epiteliais de rim e células de cânceres como MCF-7(mama), NCI-H460 (pulmão) e SF-268 (glioblastoma).

Os compostos químicos das secreções da pele de sapos são estudados há muito tempo. Historicamente, os venenos brutos eram utilizados por tribos indígenas da América do Sul no preparo de remédios para tratar cânceres e inflamação. Algumas drogas chinesas, como a ShanSu e a HuaChanSu, de uso milenar, também preparadas a partir da pele dos sapos, são amplamente usadas para tratamento de hepatite B crônica, dor, insuficiência cardíaca, inflamação e câncer (SOUMOY, 2020; RODRIGUEZ, 2021). As principais substâncias encontradas são as aminas, os bufadienolídeos, peptídeos, proteínas e alcalóides, o que representa uma gama de possíveis indicações terapêuticas como cardiotônico e antiarrítmico, antifúngico, antibacteriano, antiviral, antineoplásico, antidiabético, imunomodulador, indutor de sono, analgésico, contraceptivo e cicatrizante (SOUMOY, 2021; BANFI, 2016). Os bufodienolídeos por sua vez, são clássicos inibidores de $Na^+/K^+$ - ATPases que também exercem efeitos antineoplásicos, como indução de apoptose, interrupção do ciclo celular, indução de diferenciação e inibição da angiogênese do câncer (DENG, 2015). Além disso, já se sabe que os bufodienolídeos tem seus mecanismos de apoptose implicados em várias vias como mediada por mitocôndrias, via de sinalização PI3K/Akt, canal de cloreto CIC-3, via de sinalização IKKβ/Nf-Kb, DNA topoisomerase II e via de ligação intercalada, levando a quebras de DNA de fita dupla (DENG, 2015).

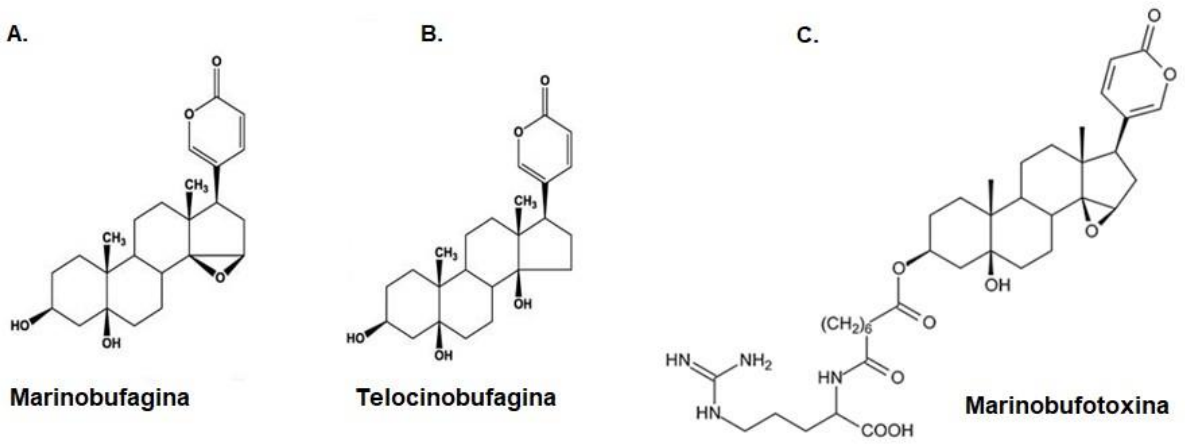
A família *Bufonidae,* pertencente à classe dos anfíbios, é representada por cerca de 471 espécies. Um gênero importante dessa família é o *Rhinella*, conhecido anteriormente como *Bufo*, que consiste em cerca de 258 espécies. *Rhinella marina* (Figura 6A) também conhecida popularmente como sapo-cururu é uma das espécies venenosas mais encontradas no continente australiano e na América do Sul, cujo veneno tem sido extraído para o isolamento de inúmeras substâncias puras (RAASCH-FERNANDES, 2019; MEDEIROS, 2019; BANFI, 2016).

**Figura 6. A**. *Rhinella marina* (sapo-cururu); **B**. Veneno sendo extraído do sapo identificado pela seta na cor preta (SOUZA, 2017).



Dentre as substâncias puras isoladas do veneno do sapo *Rhinella marina,* foram selecionadas as substâncias marinobufagina (MBG), telocinobufagina (TBG) e marinobufotoxina (MBT) para serem avaliadas neste estudo. As substâncias em questão pertencem à classe dos esteróides cardiotônicos, que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Geraldo Magela, do Departamento de Química de produtos naturais, Universidade do Piauí (UFPI).

**Figura 7.** Substâncias puras. **A.** Marinobufagina; **B.** Telocinobufagina; **C.** Marinobufotoxina (MACHADO, 2018; BANFI, 2016; SOUSA, 2017)




## 1.4 MORTE CELULAR E CÂNCER

Para manter a homeostase e a função tecidual normal, é necessário que as células danificadas e disfuncionais sejam eliminadas por um processo de morte celular programada e substituídas por outras, novas e saudáveis. A grande maioria das doenças responsáveis por causar morte ou incapacidade, incluindo doenças degenerativas, cardiovasculares, autoimunes, infecciosas e cânceres, envolvem remoção celular excessiva ou insuficiente (SINGH, 2019, NORBURY, 2001; ELMORE, 2007).

A apoptose é a via de morte programada importante, conservada evolutivamente, para o desenvolvimento adequado, manutenção da homeostase tecidual e prevenção do câncer. É finamente regulada à nível genético, resultando na remoção ordenada e eficiente de células com danos no DNA durante o desenvolvimento ou envelhecimento. Possui uma maquinaria complexa e envolve diversas vias de sinalização que, além de preservar o equilíbrio saudável das células, atua também na manutenção da integridade do genoma. O câncer por sua vez,

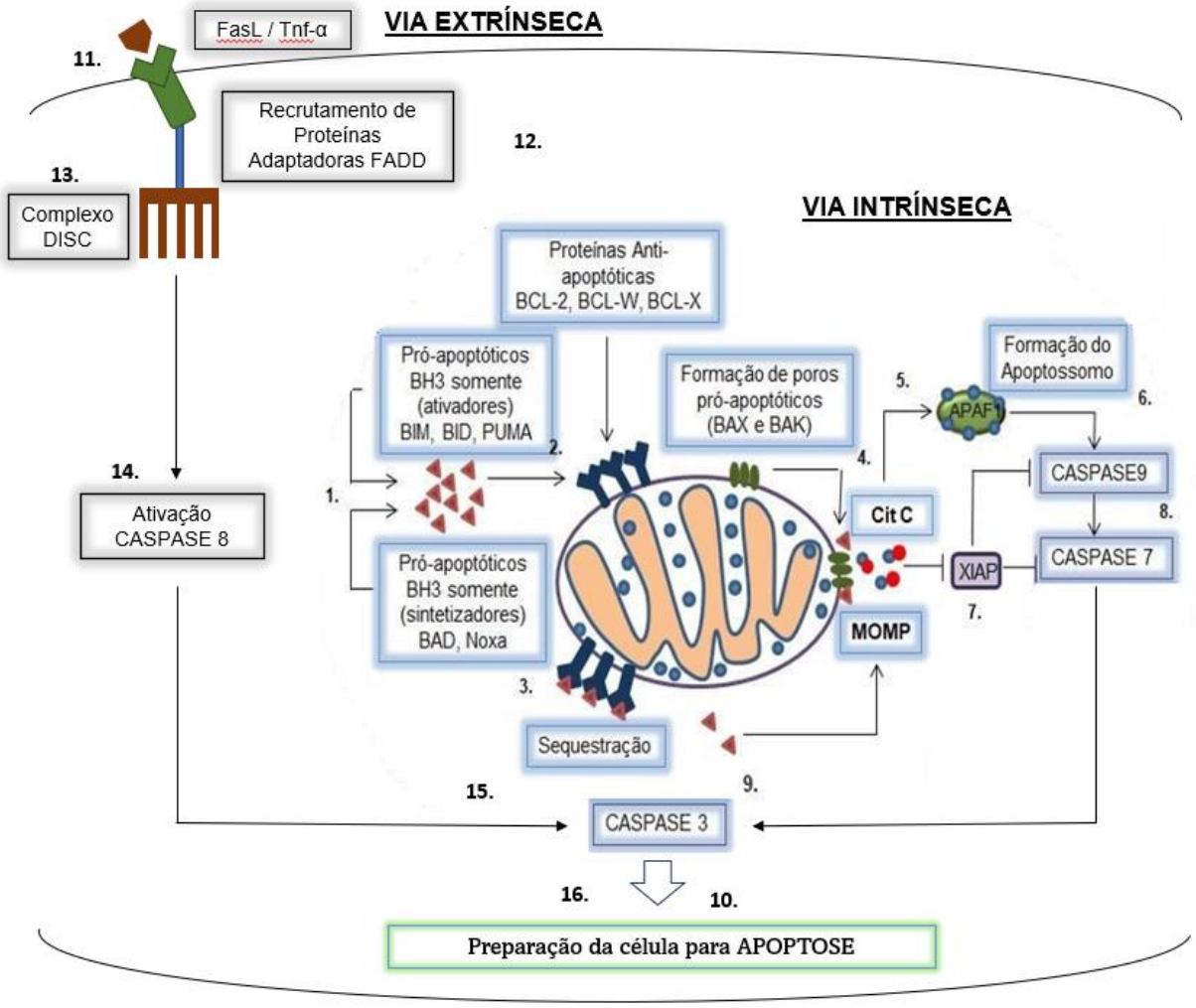
pode usar uma série de estratégias para evitar o processo apoptótico (PISTRITTO, 2016; GOLDAR, 2015).

Detalhadamente, a apoptose é iniciada por estímulos intrínsecos e extrínsecos. A via intrínseca envolve a participação de mecanismos mitocondriais com liberação de citocromo C e formação do apoptossoma, e a via extrínseca é ativada pelo sistema DISC em função da ligação de Fas e TNF-α ao seu receptor homólogo na membrana plasmática e recrutamento de proteínas adaptadoras com consequente ativação da caspase 8 a jusante, que por sua vez ativa a caspase 3 efetora e é regulada por proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas conforme representado na figura 8 (LI, 2021). Ambas as vias resultam na ativação das caspases, responsáveis por degradar os componentes celulares e preparar as células danificadas para serem fagocitadas com mínimo estresse para as células e tecidos adjacentes. As caspases por sua vez, são um conjunto de proteínas intracelulares altamente conservado que quando ativadas, clivam sistematicamente proteínas-alvo em uma cascata de eventos celulares. São produzidas como procaspases, enzimaticamente inativas, e sofrem dimerização ou oligomerização para que sejam ativadas (KESAVARDHANA, 2020). Uma vez recebidos os estímulos pró-apoptóticos (por via extrínseca ou intrínseca), inicia-se uma cascata de caspases auto-ativadas, resultando no processo de morte celular, caracterizado por alterações celulares características, como degradação do DNA, picnose e fragmentação nuclear, envoltos em pequenas membranas celular formando os corpos apoptóticos, que serão posteriormente fagocitados (KESA VARDHANA, 2020; ALBERTS, 1999).

Em contraste com a necrose, que se caracteriza por um processo de morte celular desregulada, frequentemente resultante de trauma celular agudo, a apoptose necessita de aporte de energia, sendo, portanto, um processo ativo (SINGH, 2019).

A indução de apoptose como resultado de células danificadas em lesões pré-cancerosas pode remover as células potencialmente nocivas, impedindo assim o crescimento tumoral. Assim, o descontrole da maquinaria apoptótica é o que confere às células tumorais vantagens como proliferação celular descontrolada, desenvolvimento e progressão do tumor e resistência aos tratamentos, ou seja, a desregulação dos mecanismos apoptóticos é um dos processos que favorece a carcinogênese em condições de mutações gênicas, radiação UV, infecção por HPV entre outros. Assim, estratégias terapêuticas direcionadas a alvos moleculares reguladores do mecanismo de apoptose, representam uma opção importante para restaurar o controle celular na carcinogênese (LI, 2021).

**FIGURA 8.** Representação esquemática das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca (Modificado de SINGH, 2019). Na via intrínseca, a partir de estímulos apoptóticos, as proteínas pró-apoptóticas (BIM, BID, PUMA, BAD ou Noxa) (1) podem ser inibidas pelas proteínas anti-apoptóticas (família BCL-2) (2) ou se ligam na membrana mitocondrial (3) estimulando a liberação de Citocromo C (4), ocorre a formação do apoptossomo (5), que ativa caspase 9 (6) que pode ser bloqueada pelas IAPs (7), ou por sua vez ativa as caspases efetoras 7 e 3 (8) que leva a células para o processo de fagocitose (9). Na via extrínseca, os ligantes de morte se ligam aos receptores de morte na membrana plasmática (11), ocorre o recrutamento das proteínas adaptadoras FADD (12); formação do complexo DISC (13), ativação da caspase 8 iniciadora (14) e consequente ativação da caspase 3 efetora (15) comum para ambas as vias e preparação da célula para fagocitose (9-16).




## 1.5 QUIMIOTERAPIA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DAS SUBSTÂNCIAS PURAS

O uso de medicamentos para tratamento do câncer vem de longo tempo. Um tratamento eficaz baseia-se em doses altas de um agente citotóxico, capaz de matar essas células que se dividem rapidamente, resultando na diminuição do tumor. Porém isso nem sempre ocorre,

pois muitos destes medicamentos não são específicos para células cancerígenas e geralmente causam efeitos colaterais graves. (ANTILLA, 2019). Compostos quimioterápicos como a cisplatina, por exemplo, que é uma pequena molécula de platina, destinada a princípio para controlar infecções bacterianas, parece tratar de forma eficaz o câncer cervical avançado ou recorrente, de acordo com artigos publicados por Zhu em 2016 e Corte em 2020. Os autores trazem como mecanismo de ação da cisplatina a formação de adutos covalentes DNA-cisplatina, induzindo danos ao DNA e que quando não podem ser reparados, levam a célula à apoptose. Corte traz ainda, que a associação da cisplatina com paclitaxel*,* que por sua vez atua na estabilização dos microtúbulos citoplasmáticos, estruturas importantes para a movimentação dos cromossomos e das organelas na divisão celular, fazendo com que a célula perca sua capacidade de se dividir de maneira ordenada e por consequência morte, se mostrou mais eficaz do que a monoterapia anticâncer com a cisplatina em termos de taxa de resposta ao tratamento e sobrevida livre de progressão de câncer cervical avançado.

Atualmente, uma das principais abordagens para o tratamento do câncer são procedimentos cirúrgicos associados ao tratamento medicamentoso. A quimioterapia, um método capaz de matar as células tumorais e/ou inibir seu crescimento e proliferação, tem como principal característica, a incapacidade de diferenciar células tumorais e células normais, resultando em alta toxicidade e diversos efeitos colaterais para o paciente. Nas últimas décadas houve uma mudança significativa no tratamento do câncer, no que diz respeito à utilização de medicamentos direcionados ou seletivos, ao invés de medicamentos de amplo espectro, no intuito de diminuir os efeitos colaterais pela falta de seletividade para as células tumorais (ZHONG, 2021). Nesse contexto, avaliar o grau que uma substância é seletiva apenas para as células tumorais, torna-se um importante aliado para diminuir os possíveis efeitos colaterais dos pacientes. Assim, o cálculo do índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de determinada substância entre uma linhagem neoplásica e uma linhagem normal, indicando seu potencial uso em testes clínicos. A seletividade de uma substância é de suma importância para o desenvolvimento de um medicamento, e sua falta, pode se traduzir em um aumento da toxicidade do tratamento. Assim, este parâmetro é cuidadosamente monitorado nos processos de descoberta de novos fármacos, a fim de minimizar os potenciais nocivos do medicamento. Para se obter um novo fármaco, existe uma definição de Perfil do Produto Alvo (TPP), responsável por destacar uma janela aceitável entre as atividades desejadas (alvo) e as não desejadas. Deste modo, perfis com seletividade insuficiente, remetem à várias falhas em ensaios clínicos (BOSC, 2017).

Nesse sentido, devido à alta incidência do câncer de colo de útero entre as mulheres no mundo e a baixa cobertura vacinal em países subdesenvolvidos faz-se necessário a busca de

novas terapias que atinjam alvos terapêuticos específicos desregulados na infecção por HPV de alto risco, implementando terapias farmacológicas que possam mitigar o câncer de colo uterino.

## 2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo propõe avaliar se as substâncias puras isoladas do veneno de *Rhinella marina* (sapo-cururu) são capazes de induzir seletivamente morte celular em linhagens associadas e não associadas ao HPV16.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial citotóxico das substâncias marinobufagina (MBG), telocinobufagina (TGB) e marinobufotoxina (MBT), extraídos do veneno de *Rhinella marina* (sapo-cururu), frente às linhagens associadas e não associadas ao HPV16 utilizando pelo método de MTT;
- Determinar o CI50 e o índice de seletividade (IS) das substâncias para cada linhagem;
- Avaliar o potencial apoptótico pela ativação das caspases efetoras 3/7;
- Avaliar qualitativamente a morte celular por microscopia de fluorescência das linhagens celulares tratadas com o terpeno selecionado.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. SUBSTÂNCIAS PURAS ISOLADAS DO VENENO DE *Rhinella marina* (SAPO-CURURU)

As substâncias puras denominadas marinobufagina (MBG), marinobufotoxina (MBT) e telocinobufagina (TBG) foram extraídas do veneno produzido pelo *Rhinella marina* (sapo-cururu) e subsequentemente liofilizadas, gentilmente cedidas pela Universidade Federal do Piauí – UFPI, obtidas no Laboratório de Produtos Naturais – LPN.

As substâncias foram reconstituídas em 100% de DMSO (veículo). Para os respectivos tratamentos, as soluções foram diluídas em meio de cultura para contemplar a concentração do veículo de 0,5%. As soluções foram aliquotadas e armazenadas a -20ºC sob abrigo de luz.

### 3.2. LINHAGENS CELULARES

Foram cultivadas duas linhagens de câncer cervical HPV-16 positivas: SiHa, com 1 a 2 cópias virais e CasKi com 500 a 600 cópias virais; foram também utilizadas uma linhagem de câncer cervical negativa para HPV (C-33A) e uma linhagem celular não tumoral de queratinócitos de pele espontaneamente imortalizada sem *background* genético tumoral (HaCaT), todas fornecidas pela Professora Associada Marília de Freitas Calmon (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto - São Paulo, Brasil). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies) e solução de antibiótico/antimicótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina a 100 µg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), em estufa a 37ºC e 5% de $CO^2$, até confluência de aproximadamente 80%. Após atingir confluência adequada, as células foram descoladas da garrafa de cultura com uso de tripsina 1x (Life Technologies) e transferidas para microplacas adequadas para cada ensaio.

Os experimentos de citotoxicidade (MTT) e os experimentos de luminescência para caspases foram acompanhados de controle positivo utilizando doxorrubicina 100µM, controle negativo somente com meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos e controle de veículo preparado com 0,5% de DMSO. Além disso, para os experimentos de ativação das caspases foi utilizado como controle positivo ativador de apoptose, a curcumina 100uM, além da doxorrubicina 100uM como controle positivo ativador de necrose. Para os ensaios de densidade (*Growth Rate*) foi utilizado como controle positivo, doxorrubicina 100uM e como controle negativo, células sem tratamento.

### 3.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Para avaliação da viabilidade celular, foi realizado o ensaio de brometo de 3-(4,5–dimetilazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), que quantifica indiretamente a viabilidade das células. O sal tetrazólio, de coloração amarela é reduzido pela succinato-desidrogenase mitocondrial e forma um composto de coloração violácea, sais de formazana, cuja intensidade é proporcional a quantidade de células vivas (MOSMANN, 1983; BUCH, 2012).

As células de cada linhagem foram plaqueadas em microplaca de 96 poços, na quantidade de 1,0 x $10^4$ células/poço (1,0x$10^5$ células/mL) e incubadas em estufa a 37ºC em atmosfera de 5% de $CO^2$ por 24 horas. Em seguida, foram tratadas com as três substâncias individualmente e incubadas por mais 24 horas. Ao final desse período, foi adicionado a cada

poço, 10uL de MTT, diluído em PBS (5mg/mL), e incubado de 3 a 5 horas em estufa a 37ºC com 5% de $CO^2$ sob abrigo de luz. Após o período de incubação, foi descartado o sobrenadante de cada poço, e as células foram ressuspendidas com 100uL de DMSO por poço, e as absorbâncias foram medidas a 540nm em leitor espectrofotométrico de placas e aplicadas à fórmula abaixo:

$$\textit{\% Células Vivas} = \frac{\textit{Absorbância Teste - Absorbância Branco}}{\textit{Absorbância Controle Negativo - Absorbância Branco}} \textit{ x100}$$

## 3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (CI50) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

A atividade de cada substância frente a cada linhagem testada, foi mensurada pelo ensaio de MTT, conforme descrito acima. De acordo com os resultados obtidos em triplicatas biológicas e por três experimentos independentes, foram calculadas as concentrações capazes de inibir 50% da viabilidade celular (CI50). Para isso, cada CI50 foi calculado a partir das curvas dose-resposta usando o Software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

Para o cálculo do Índice de Seletividade das substâncias (IS), ou seja, para avaliar o quanto cada substância foi seletiva para as linhagens tumorais, foi calculada a razão entre o CI50 da linhagem não tumoral/ CI50 da linhagem tumoral conforme fórmula abaixo:

$$\textit{Índice de Seletividade (IS):} \quad \frac{\textit{CI50 da Linhagem Não Tumoral}}{\textit{CI50 da Linhagem Tumoral}} \textit{ x100}$$

## 3.5. ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE CASPASES

O ensaio CASPASE GLO 3/7 é um ensaio homogêneo e luminescente que tem como finalidade medir a atividade das caspases efetoras 3 e 7, onde a luminescência é proporcional à atividade mensurada, e foram realizadas segundo protocolo do fabricante com modificações (Promega, Brasil).

As células foram cultivadas conforme protocolo de cultivo celular (Item 3.2) e em seguida plaqueadas em microplacas de 96 poços de fundo preto, com a finalidade de evitar luminosidade para que a fluorescência não fosse perdida. Foram incubadas e tratadas com MBG após 24 horas do plaqueamento, na concentração determinada pelo CI50. Para avaliação da atividade das caspases, foram realizados tratamentos de 12 horas, com a concentração determinada pelo CI50 da substância pura no ensaio de MTT.

Os reagentes foram preparados conforme o protocolo do fabricante, e após 12 horas do tratamento, foi adicionado 50uL do reagente Caspase GLO 3/7 e 50uL de PBS em cada poço. A placa foi então incubada em temperatura ambiente, protegida de luz, por um período de uma hora, para que a luminescência atingisse o pico de sinal e fosse mantido por várias horas, sem perda mínima. As leituras das placas foram realizadas no Leitor de Placas Tecan, no Laboratório de Parasitologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, sob a supervisão da Profa Dra Márcia Graminha e sua equipe. Após uma hora de incubação sob abrigo de luz, o conteúdo das placas foi homogeneizado automaticamente pelo leitor e foram realizadas leituras (360/40nm e emissão 460/4nm) de 5 em 5 minutos a 37ºC. Os experimentos foram realizados em triplicada e três experimentos independentes. Como controle branco foi utilizado poços sem células apenas com meio de cultura e como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento.

### 3.6. ENSAIO QUALITATIVO DE MORTE CELULAR POR FLUORESCÊNCIA

O ensaio denominado *Growth Rate*, foi padronizado na Universidade de Harvard (Cambridge, MA, EUA) para avaliar se determinada substância causa morte celular por apoptose ou necrose, ou se apenas causa um processo citostático, em que as células voltam a se proliferar após a retirada do tratamento. Com a utilização de mecanismos automatizados, os pesquisadores fazem a retirada do sobrenadante sem que as células mortas se desprendam do fundo do poço. No presente estudo, não foi possível reproduzir a mesma técnica pela falta da automatização adequada, mesmo utilizando o agente de densidade Optprep. Assim, foi adaptado para o modelo experimental qualitativo por fluorescência, utilizando os fluorocromos Hoechst e LDR.

Após o cultivo das linhagens, para cada experimento, foram plaqueadas $1,0x10^4$ cel/mL (HaCaT) e $0,3x10^5$ (para demais linhagens) em 4 placas de 96 poços por 24 horas (identificadas como T0, T1, T2 e T3), incubadas com meio de cultura em estufa a 37ºC com atmosfera de 5% de $CO^2$. No tempo denominado T0, foram plaqueadas uma quantidade menor de células para que houvesse crescimento homogêneo até 72h de tratamento (48 horas de recuperação) com durabilidade de 4 dias de experimento. Essa estratégia experimental evita o excesso de confluência nos poços até o final do experimento. Em T0 foram avaliadas células plaqueadas sem tratamento; em T1, células tratadas após 24 horas, controle positivo com doxorrubicina e controle negativo (células sem tratamento); em T2 e T3, células tratadas após 48 horas e 72 horas respectivamente e os controles negativos. Os controles positivos foram avaliados apenas em 24 horas de tratamento. No dia seguinte (tempo 0 - 24 horas após o plaqueamento) a placa T0 foi revelada (conforme protocolo descrito abaixo), e as outras 3

placas foram tratadas com MBG na concentração determinada pelo CI50 de cada linhagem e incubadas por mais 24 horas em estufa a 37ºC com 5% de $CO^2$ sob abrigo de luz. No terceiro dia, a placa T1 (tempo 24h após o tratamento) foi revelada conforme protocolo e nas outras 2 placas foram adicionados ao tratamento, 100 uL da solução 3 (Optiprep 10% em PBS) para que as células mortas permanecessem no fundo da placa e pudessem ser fotografadas com as marcações dos fluorocromos específicos (LDR e Hoescht 33342). O LDR (*Live death red*) é um corante vermelho fluorescente responsável por corar o núcleo das células mortas; o Hoechst 33342 é um segundo corante fluorescente de cor azul responsável por corar o núcleo das células viáveis. O reagente Optiprep promove um gradiente de densidade que permite a manutenção das células vivas e mortas, sedimentadas no fundo da placa. As placas foram então incubadas por mais 30 minutos sob abrigo de luz. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente pela lateral do poço e foi adicionado 100 uL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e antibióticos e foram novamente incubadas em estufa a 37ºC com 5% de $CO^2$ sob abrigo de luz para recuperação. No quarto dia, a placa T2 (tempo 48h – 24 horas de recuperação) foi revelada conforme protocolo e a placa T3 foi novamente incubada e posteriormente revelada no quinto dia (tempo 72h – 48 horas de recuperação).

O protocolo de revelação de cada placa baseia-se na adição de 100uL da Solução 1 (1:1000 LDR / 1:1000 Hoescht 33342/ 10% Optprep em PBS), em cada poço e incubado por 30 minutos em estufa a 37ºC com 5% de $CO^2$ sob abrigo de luz. Após esse tempo, foi adicionado em cada poço a Solução 2 (formaldeído 3,7% em 20% de Optprep em PBS) para a fixação das células, uma vez que o formaldeído tem a função de fixar proteínas e inativar enzimas proteolíticas rapidamente, evitando o processo de autólise celular, e novamente incubado por mais 30 minutos nas mesmas condições. Após o tempo de incubação, o conteúdo de cada poço foi retirado gentilmente pela parede do poço e cada poço foi lavado com 100 uL de PBS, que foi posteriormente descartado. Em seguida, foi adicionado 100 uL de PBS em cada poço e foram fotografados 10 campos aleatórios de cada poço, de todas as triplicatas e três experimentos independentes, utilizando microscópio de fluorescência (Nikon, TS100F), onde foi possível visualizar as células vivas (azuis) e mortas (vermelhas). Este protocolo permitiu a validação dos resultados que serão apresentados abaixo.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de citotoxicidade calculou-se a média e ± erro padrão (média ± erro padrão). Após determinado que os resultados possuíam distribuição normal (avaliação da normalidade pelo teste estatístico de Shapiro Wilk com hemocedasticidade), foram aplicados os testes de análise de variância OneWay (ANOVA) e o pós teste de Tukey. Para a análise de

comparação entre as linhagens foi aplicado o teste de análise de variância *Two Way* ANOVA com pós teste de Bonferroni. As análises foram realizadas com software GraphPad Prism® Version 5.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para os testes estatísticos foi considerado o nível de p<0,05(*****p<0,05******p<0,01*******p<0,001).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

A citotoxicidade das substâncias MBG, TBG e MBT foram avaliadas nas diferentes concentrações de 7,81uM, 15,62uM, 31,25uM, 62,50uM e 125uM.

**Figura 9.** Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical SiHa tratada com MGB, MBT e TBG em 24 horas de tratamento. 125,0 µM (MBG: CN p<0,001, CP p<0,01; MBT: CN p<0,001, CP p=*ns;* TBG: CN p>0,001, CP p=*ns*). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, doxorrubicina a 100µM) e CV (controle de veículo – DMSO 0,5%). Oneway ANOVA com pós-teste de Tukey. %; * p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001.

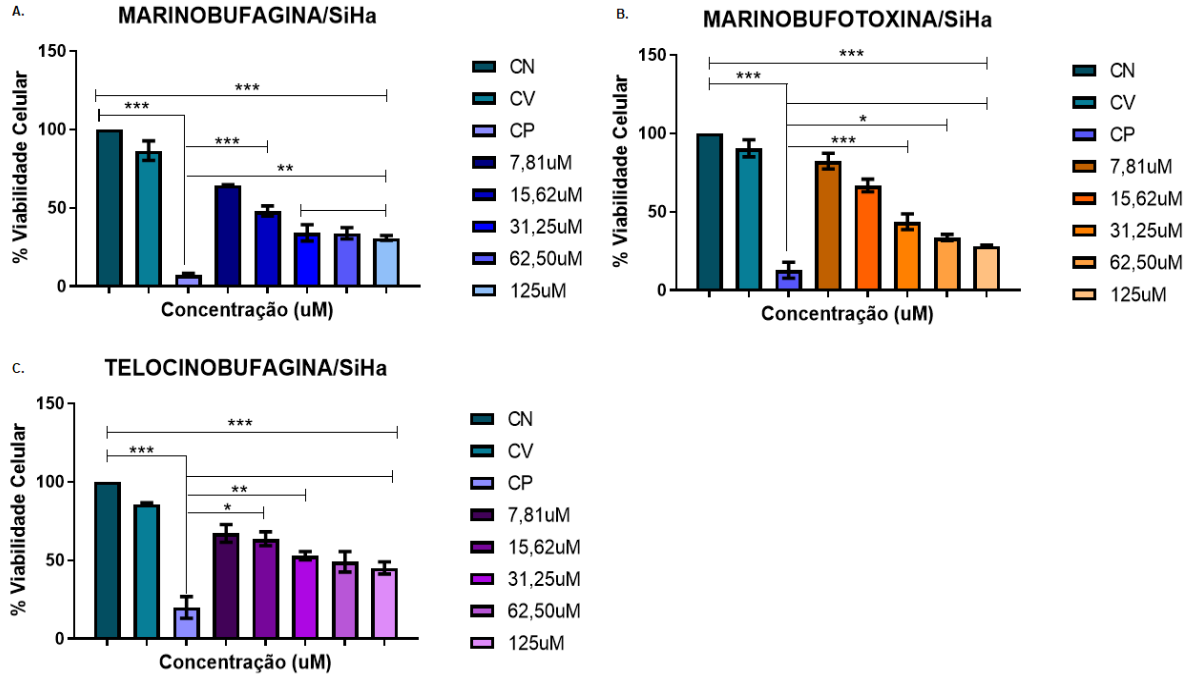



**Figura 10**. Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical CasKi tratada com MGB, MBT e TBG em 24 horas de tratamento. 125uM (MGB: CN p<0,001, CP p<0,001; MBT: CN p<0,001, CP p<0,001; TBG: CN p<0,001, CP p<0,01). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, doxorrubicina a 100µM) e CV (controle

de veículo – DMSO 0,5%). Oneway ANOVA com pós-teste de Tukey. %; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

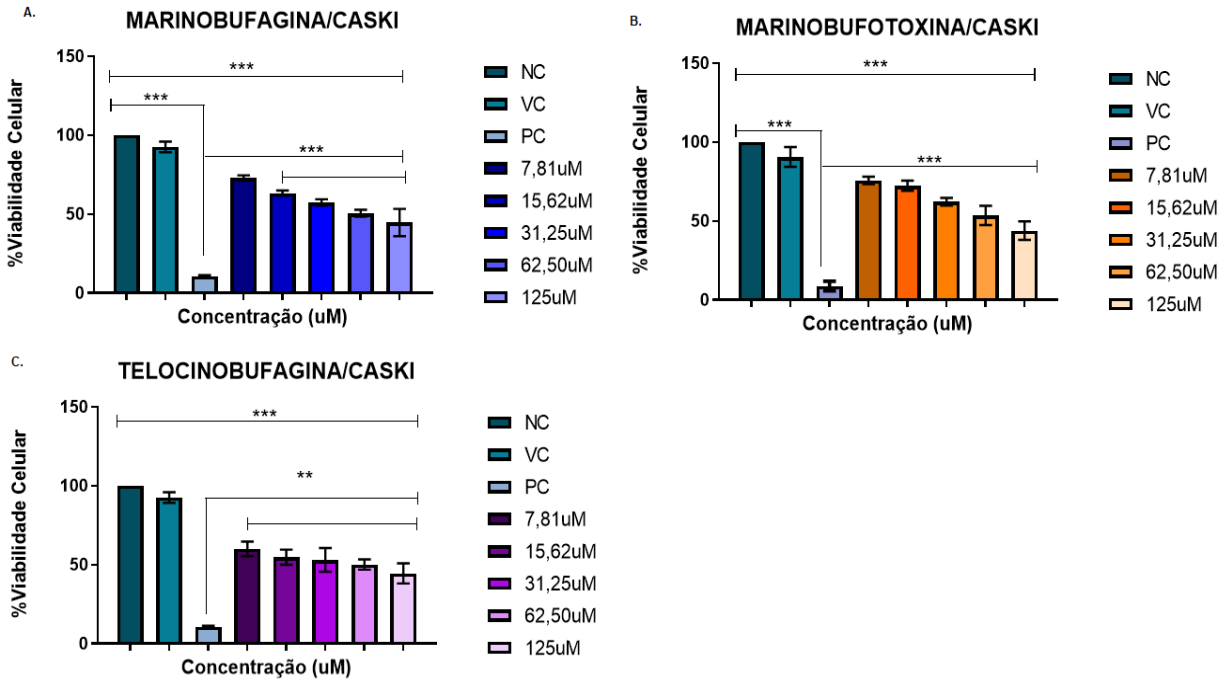



**Figura 11.** Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical C-33A tratada com MGB, BT e TBG em 24 horas de tratamento. 125uM (MBG: CN p<0,001, CP p<0,001; MBT: CN p<0,05, CP p<0,001; TBG: CN p=ns, CP p<0,01). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, doxorrubicina a 100µM) e CV (controle de veículo - DMSO 0,5%). Oneway ANOVA com pós-teste de Tukey. %; * p <0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

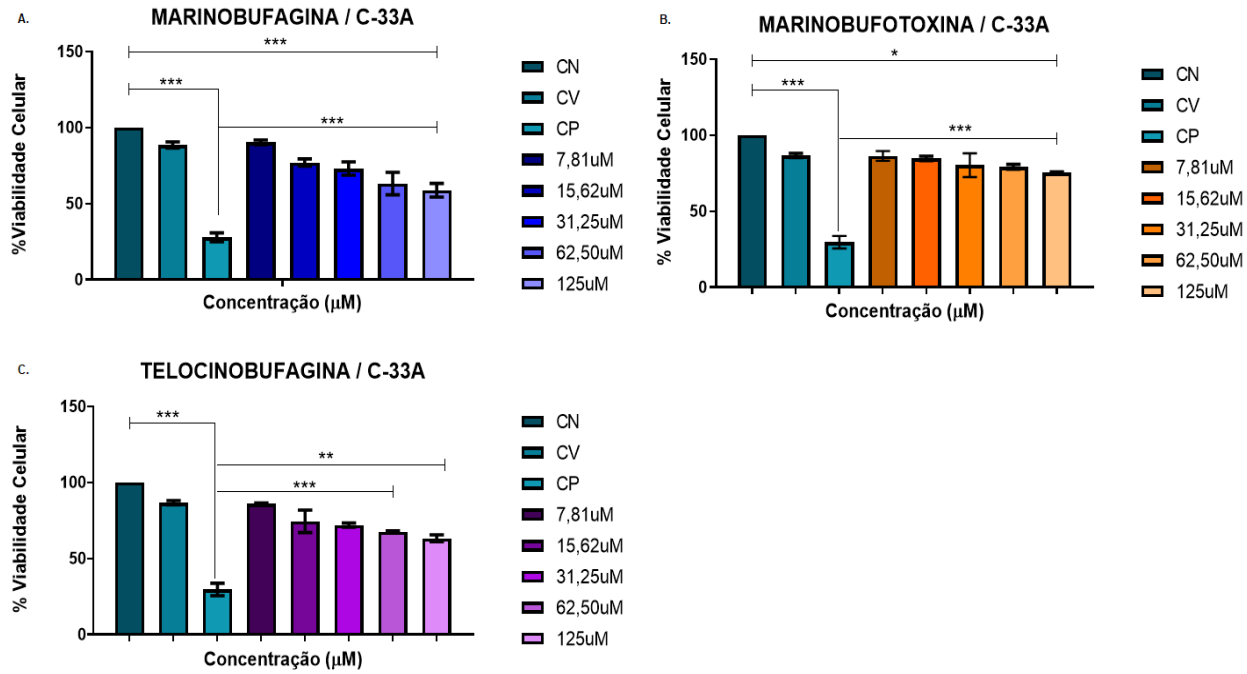


**Figura 12.** Porcentagem de viabilidade celular de linhagem de câncer cervical HaCaT tratada com MGB, MBT e TBG em 24 horas de tratamento. 125uM (MBG: CN p=ns, CP p<0,001; MBT: CN p=*ns*, CP p<0,001; TBG: CN p=*ns,* CP p<0,001). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). CP (controle positivo, doxorrubicina a 100 µM) e CV (controle de veículo – DMSO 0,5%). Oneway ANOVA com pós-teste de Tukey. %; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

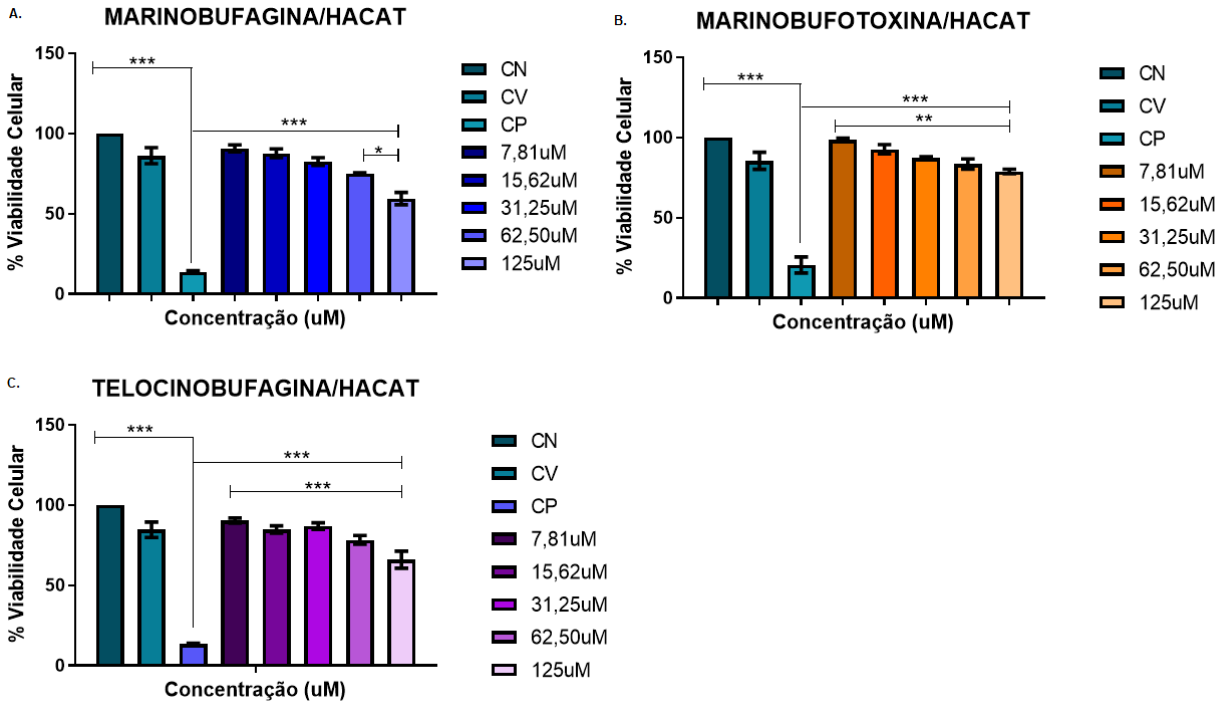
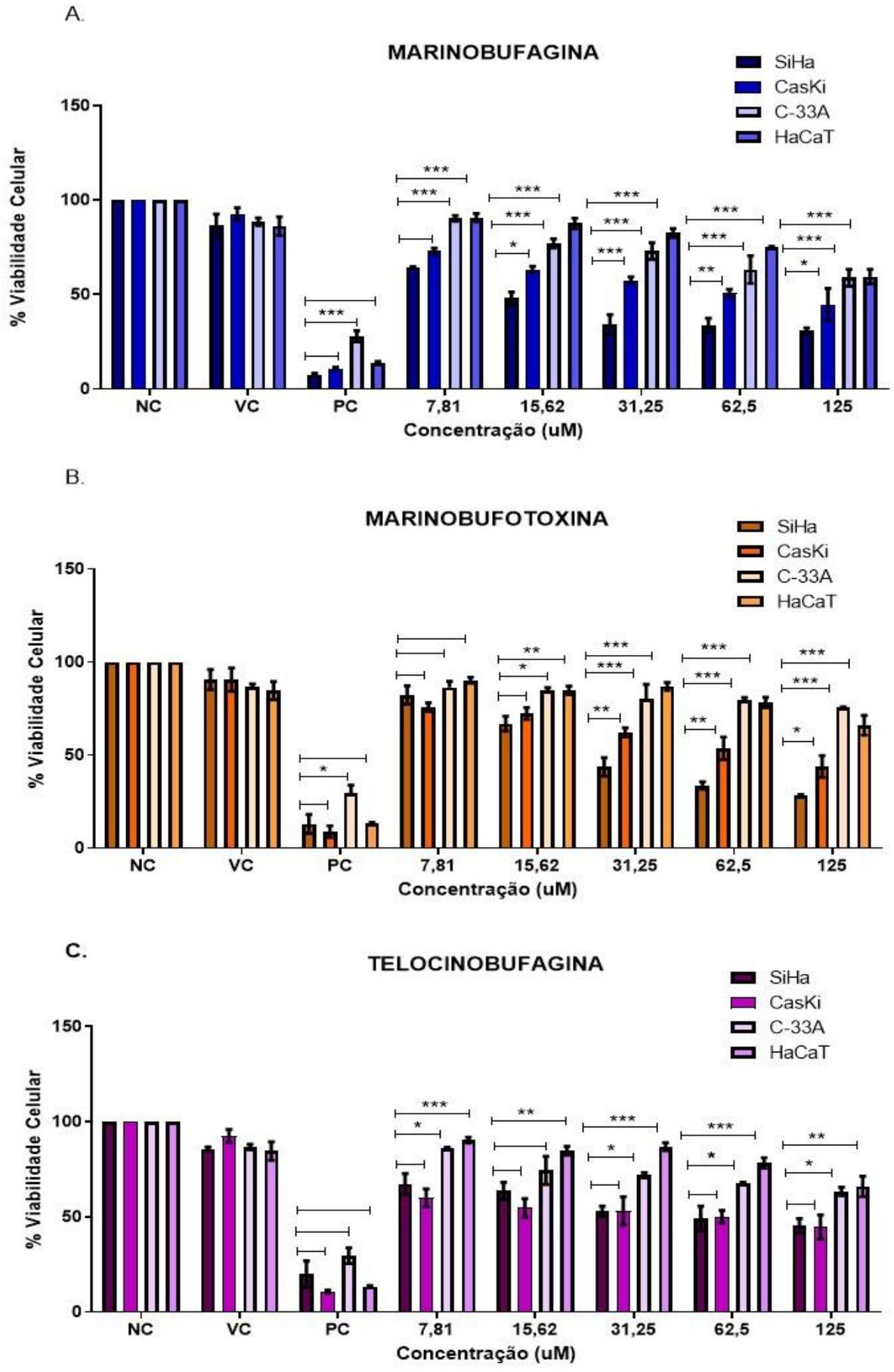



**Figura 13.** Porcentagem de viabilidade celular (MTT). Comparação entre as linhagens SiHa, CasKi, C-33A e HaCaT tratadas com as substâncias MBG (A) (SiHa *vs* HaCaT 125uM p< 0,001; SiHa *vs* CasKi 125uM p< 0,05; SiHa *vs* C-33A p<0,001) MBT (B) (SiHa *vs* HaCaT 125uM p< 0,05, SiHa *vs* C-33A p<0,001) e TBG (C) (SiHa *vs* HaCaT 125uM p<0,01; SiHa *vs* CasKi p=ns; SiHa *vs* C-33A p<0,05) em 24 horas de tratamento. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). 2way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. %; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.


A.
MARINOBUFAGINA
SiHa
CasKi
C-33A
HaCaT
% Viabilidade Celular
150
100
50
0
NC
VC
PC
7,81
15,62
31,25
62,5
125
Concentração (uM)
B.
MARINOBUFOTOXINA
SiHa
CasKi
C-33A
HaCaT
% Viabilidade Celular
Concentração (uM)
C.
TELOCINOBUFAGINA
SiHa
CasKi
C-33A
HaCaT
% Viabilidade Celular
Concentração (uM)

Em relação à linhagem SiHa, foi possível observar uma diminuição da viabilidade proporcional ao aumento da concentração da MBG, atingindo a inibição de 50% das células na concentração de 12,40uM (CI50) no tempo de 24 horas de tratamento. Já com as substâncias MBT e TBG, a linhagem SiHa apresentou maior viabilidade celular quando comparada ao tratamento com MGB. Apenas nas maiores concentrações testadas, atingiram as CI50 (50,73uM e 80,86uM respectivamente). Assim como no estudo de Machado (2018), a MBG apresentou alta citototoxicidade para as linhagens tumorais HL-60 e K562 (leucemia humana), HEP-2 (laringe), MDA, MB-435 (melanoma), SF-295 (glioblastoma), MCF-7 (mama), NCHI-292 (pulmão), HEPG-2 (fígado) e OVCAR-8 (ovário) com CI50 variando entre 0,15 a 7,35uM no tempo de 72 horas de tratamento. Deve-se ressaltar que não é possível estabelecer comparação com o presente estudo levando-se em conta que as linhagens supracitadas possuem diferentes *backgrounds* genéticos. Mas de forma relativa demonstram que a substância utilizada neste estudo tem ação citotóxica, tal qual demonstrado em outras linhagens tumorais.

Nos ensaios de viabilidade celular com a linhagem Caski, de câncer cervical HPV positiva com 500 a 600 cópias virais, as três substâncias testadas, MBG, MBT e TBG, apresentaram menor inibição da viabilidade celular com CI50 de 85,80uM, 92,08uM e 70,57uM respectivamente, sendo a TBG a que mostrou melhor resultado. Outros resultados publicados em 2018 por Gao e colaboradores mostraram que a TBG suprimiu significativamente em baixas doses a migração celular e a invasão do câncer de mama e em altas doses e inibiu a proliferação celular *in vitro*. Segundo Gao, a inibição da migração e invasão se deu porque a TBG desencadeou um colapso dos filamentos de actina, regulou negativamente marcadores mesenquimais incluindo vimentina e fibronectina e regulou positivamente marcadores epiteliais como E-caderina, além de regular negativamente *Snail,* um fator de transcrição crucial de EMT (Epitélio mesenquimal de transição) que é um processo que está relacionado à estimulação da migração das células cancerígenas. Assim, apesar de nossos resultados não apresentarem um CI50 relativamente baixo para a inibição das células em questão, sugere-se estudos futuros com a TBG em relação à inibição da migração destas células, que são responsáveis pelo desenvolvimento de um tipo importante de câncer entre as mulheres.

De acordo com Vieira Junior e colaboradores (2021), compostos extraídos de secreções cutâneas e bufadienolídeos isolados, alcalóides e metabólitos de *Rhinella marina (R. Bufo)* apresentaram atividade contra linhagens tumorais humanas como glioblastoma (U-373), osteossarcoma (MG-63), cólon (26-L5, HCT-116), leucemia (K-562, U937 ML-1, Jukart T, HL -60), melanoma (MDA/MB-435, SKMEL-28), bexiga (BIU-87, J-82), mama (MCF-7, MDA/MB-231, MCF10A), oligodendroglioma (Hs-683), glioblastoma (SF-295), adenocarcinoma gástrico

(AGS), próstata (DU-145, PC-3, LNCaP), ovário (OVCAR-8), carcinoma hepatocelular (HepG-2), carcinoma de pulmão (A-549, SK- MES-1, NCIH-292) e carcinoma primário de fígado (PLC/PRF/5) bem como para células de rim embrionário humano (HEK-293) não tumorais, porém por se tratar de linhagens tumorais com diferentes *backgrouds* genéticos não é possível fazer comparação com os resultados mostrados nesse estudo.

Para a linhagem C-33A (câncer cervical HPV negativa), nenhuma das substâncias testadas demonstrou ser significativamente citotóxica, com CI50 maiores do que a maior concentração testada (125uM), calculados por cálculo de progressão, o que sugere que as células associadas ao HPV 16 apresentaram maior sensibilidade ao tratamento quando comparadas com a linhagem tumoral não infectada pelo vírus na maior concentração testada (SiHa *vs* C33 $p<0,001$). Nesse sentido, um trabalho publicado em 2021 por Liu e colaboradores, comparou células de tumores cervicais HPV positivo, células de tumores cervicais HPV negativo e linhagem celular de fibroblastos de pele não tumorais e verificou que houve um aumento nos níveis das proteínas de oito genes específicos nas células C-33A, quando comparadas com SiHa, CasKi e HeLa (adenocarcinoma HPV18 positivo) que pode estar relacionado com o aumento da resistência da C-33A aos tratamentos. Segundo Liu, quando comparados com pacientes com câncer cervical HPV positivos, o câncer do colo do útero das pacientes HPV negativo, tende a se inclinar para a idade mais avançada e apresentar um resultado em geral pior, com um período de sobrevida mais curto, estágio avançado e maior prevalência de metástases linfonodais, sugerindo que cânceres cervicais sem HPV, tendem a ser mais agressivos e resistentes.

Assim, os achados deste trabalho sugerem que as linhagens celulares associadas ao HPV16, demonstraram ser mais sensíveis quando comparadas com as linhagens de câncer cervical HPV negativa (C-33A) que tem um perfil genético diferenciado como mencionado no trabalho publicado por Liu e colaboradores (2021). Nos resultados dos ensaios de MTT houve inibição da viabilidade de células tumorais associadas ao HPV preferencialmente, quando comparadas com a linhagem tumoral C-33A (HPV negativa) e HaCaT (queratinócitos de pele normais imortalizados) que se mostraram resistentes às três substâncias testadas.

De acordo com um artigo publicado em 2019 por Zhou e colaboradores, células que possuem p53 mutante, proveniente de mutações de ponto único em seu gene codificador *TP53,* mutante em cerca de 50% dos canceres humanos, estão altamente associadas à malignidade em grau avançado e à quimiorresistência. Sabe-se que a linhagem de câncer cervical C-33A possui p53 mutante, o que pode explicar o perfil de resposta resistente ao tratamento com as três substâncias testadas.

Sabendo que E6 e E7 atuam na sinalização da degradação das proteínas p53 e pRb respectivamente, considera-se que as linhagens associadas ao vírus são reguladas negativamente para p53 e pRb. Do mesmo modo, sabe-se que a linhagem C-33A possui um mutante para p53, o que impede sua expressão. Assim funcionalmente, para as três linhagens tumorais, não existe ação de p53, o que sugere que a restauração da função da proteína p53 não seja alvo da ação da MGB. No entanto, os HPVs de alto risco podem interagir com muitas outras vias relevantes para o câncer, mesmo de forma independente de p53 e pRb (FRANCONI, 2020).

Outro mecanismo proposto na literatura, por Sousa e colaboradores (2017) é que os bufadienolídeos agem inibindo o complexo da bomba Na+/K+ ATPase, que por sua vez tem como funções fisiológicas, manter o potencial de membrana celular, executar o transporte de nutrientes e aminoácidos e manter o equilíbrio osmótico. Subunidades específicas do complexo Na+/K+ ATPase estão envolvidas com o crescimento e sobrevivência celular e encontram-se superexpressas em diversos tipos de canceres. Esse mecanismo pode estar associado ao perfil seletivo de resposta entre as linhagens tumorais e a linhagem de queratinócitos neste estudo (SOUSA, 2017).

Os resultados do MTT mostraram também que a linhagem de câncer cervical SiHa foi mais sensível ao tratamento com MBG quando comparada com a linhagem CasKi. Sabe-se que E6 e E7 atuam em diferentes outros alvos, além de p53 e pRb (FRANCONI, 2020). Pode-se inferir então, que as células CasKi por possuírem uma quantidade maior de cópias virais (500 a 600 por célula) traduzem uma quantidade maior das proteínas E6 e E7, que por sua vez, atuam em vias distintas no processo de carcinogênese, o que poderia dar a essas células um perfil da resposta mais resistente ao tratamento.

Mecanismos relacionados com diversas substâncias antitumorais que tem ação de intercalantes de DNA, por formarem complexos enzimáticos de DNA pela ação nas enzimas topoisomerase I e II, também podem ser considerados. Esse mecanismo induz a quebras de fita simples de DNA (topoisomerase I) e quebras de fita dupla de DNA (topoisomerase II). Alguns novos inibidores de topoisomerases, são capazes de inibir a ação catalítica da enzima sem a formação dos complexos. Desse modo, a inibição da transcrição e replicação tem sido considerada como um dos mais prováveis mecanismos de citotoxicidade e o grau de especificidade pela clivagem do DNA é típico de cada substância ou classe de substâncias (BAGULEY, 2021). No artigo publicado por Sousa em 2017, foi descrito a inibição da enzima topoisomerase II e consequente quebra de fita dupla de DNA por diversos bufodienolideos testados, além de citar também mecanismos de inibição do complexo Na+k+ -ATPase e indução de apoptose dependente de caspases.

Assim, o presente estudo demonstrou que a MBG foi citotóxica para a linhagem de câncer cervical HPV positiva (SiHa) em baixas concentrações em 24 horas de tratamento, sugerindo que a MBG pode ser indicada como um bom agente antitumoral para cânceres de colo de útero. Desta forma, os demais experimentos foram realizados com a substância MBG pois apresentaram os melhores resultados em comparação às demais substâncias.

## 4.2. DETERMINAÇÃO DO CI50 E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

Após realizados os ensaios de citotoxicidade e feitos os cálculos de viabilidade celular de cada linhagem, foram calculados os CI50s e os IS de cada substância frente a cada linhagem:

**Tabela 1**. Cálculo da Concentração Inibitória de 50% (CI50). MGB demonstrou o menor valor de CI50 (12,4uM) para linhagem SiHa.

| CI50 CALCULADOS (uM) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Substância Pura | HaCaT | SiHa | CasKi | C-33A |
| MARINOBUFAGINA | 159,89 | **12,40** | 85,80 | 147,64 |
| MARINOBUFOTOXINA | 281,49 | 50,73 | 92,08 | 418,23 |
| TELOCINOBUFAGINA | 207,05 | 80,86 | 70,57 | 197,82 |

Vieira Junior (2021) descreveu que a maioria dos CI50 das substâncias testadas foi ≤ 4,0uM em até 72 horas de tratamento. Nossos resultados demonstram que a substância MGB para SiHa apresentou o menor CI50 (12,40uM) em 24 horas de tratamento (Tabela 1), representando uma concentração próxima da apresentada pelos autores citados.

**Tabela 2.** Cálculo do Índice de Seletividade (IS) calculados a partir dos valores de CI50, utilizando a fórmula presente no item 3.5. MGB mostrou o maior valor de seletividade (12,89) para linhagem SiHa.

| ÍNDICE DE SELETIVIDADE | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Substância Pura | HaCaT | SiHa | CasKi | C-33A |
| MARINOBUFAGINA | 1,00 | **12,89** | 1,86 | 1,08 |
| MARINOBUFOTOXINA | 1,00 | 5,55 | 3,06 | 0,67 |
| TELOCINOBUFAGINA | 1,00 | 2,56 | 2,93 | 1,05 |

Para o cálculo de índice de seletividade foram divididos os valores dos CI50 de cada substância para cada linhagem tumoral pelo CI50 de cada substância para a linhagem de queratinócitos de pele não tumorais (HaCaT). Assim, quanto maior o valor encontrado, maior seletividade. Nossos resultados demonstraram que a substância pura MBG apresentou o

maior índice de seletividade frente a linhagem SiHa (HPV+), quando comparada à linhagem CasKi e com a linhagem tumoral C-33A (HPV-) (Tabela 2).

Com base nesses resultados, a substância MBG foi selecionada dentre as outras substâncias testadas, não somente pela sua melhor atividade inibitória frente às linhagens (SiHa e CasKi), mas também pela sua disponibilidade para a realização dos demais experimentos.

## 4.3. ATIVIDADE DAS CASPASES – ENSAIO CASPASE GLO3/7

Os resultados de atividade de caspase 3/7 nas linhagens celulares tratadas com MBG estão demonstrados nas Figuras 14 e 15.

**Figura 14.** Ensaio de apoptose por quimioluminescência: Método de ativação das Caspases 3/7 no tempo de 12 horas de tratamento com MBG. Os dados referem-se à média de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). Controle Positivo: Curcumina (100uM), Doxorrubicina (100uM); Controle de veículo: DMSO (0,5%). **A**. SiHa (CP Curcumina p=ns, CN p<0,01).; **B**. CasKi (CP Curcumina p<0,001, CN p=ns); **C**. C-33A (CP Curcumina p<0,001, CN p=ns); **D**. HaCaT (CP Curcumina p<0,001, CN p=ns). Oneway ANOVA com pós-teste de Tukey. %; * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001.

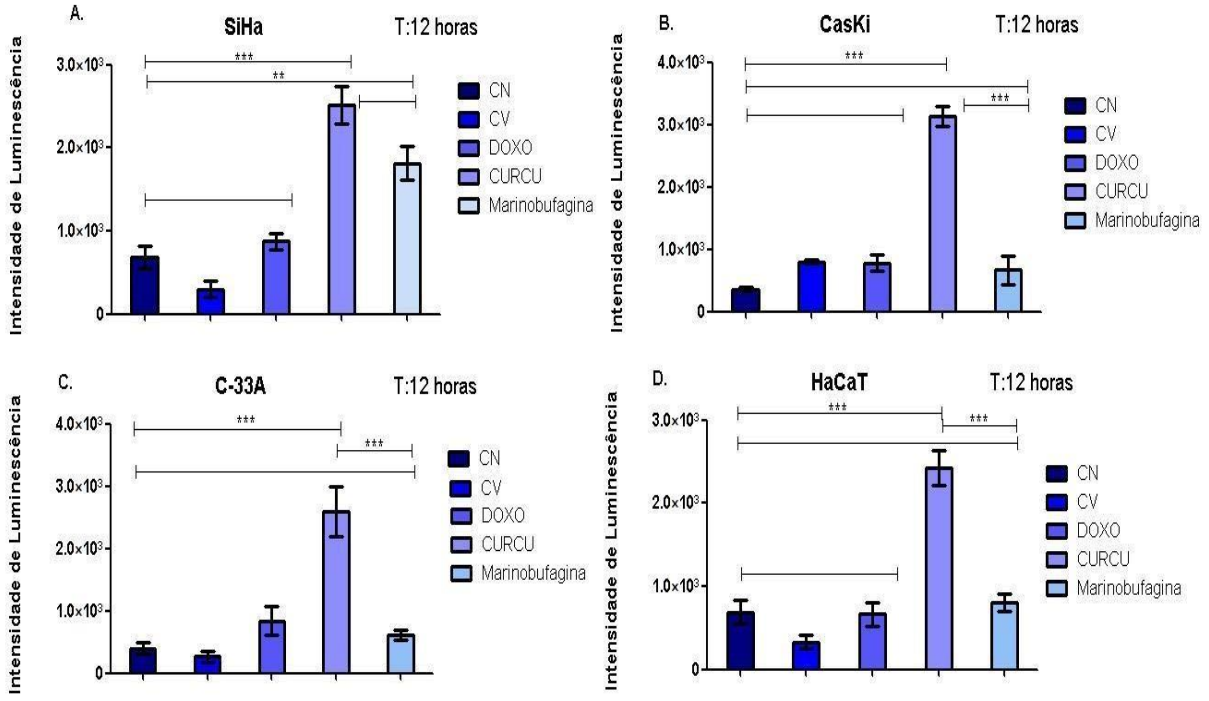
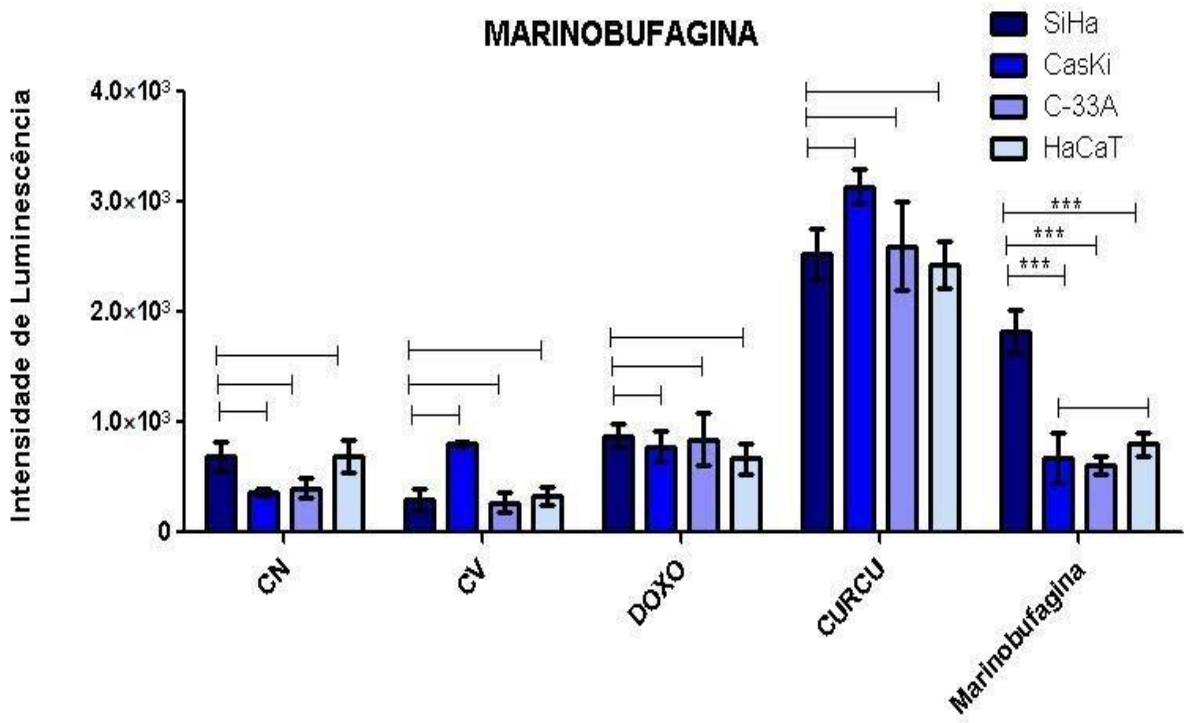


**Figura 15.** Ensaio de ativação das Caspases 3/7. Comparação entre as linhagens no tempo de tratamento de 12 horas com MBG (SiHa *vs* HaCaT p<0,001, SiHa *vs* CasKi p< 0,001, SiHa *vs* C-33A p<0,001, entre as demais linhagens p=ns). Os dados referem-se à média de três experimentos independentes e erro padrão (M ± EP). Controle Positivo: Curcumina (100uM), Doxorrubicina (100uM); Controle de veículo: DMSO (0,5%).2neway ANOVA com pós-teste de Bonferroni. %; * p <0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.



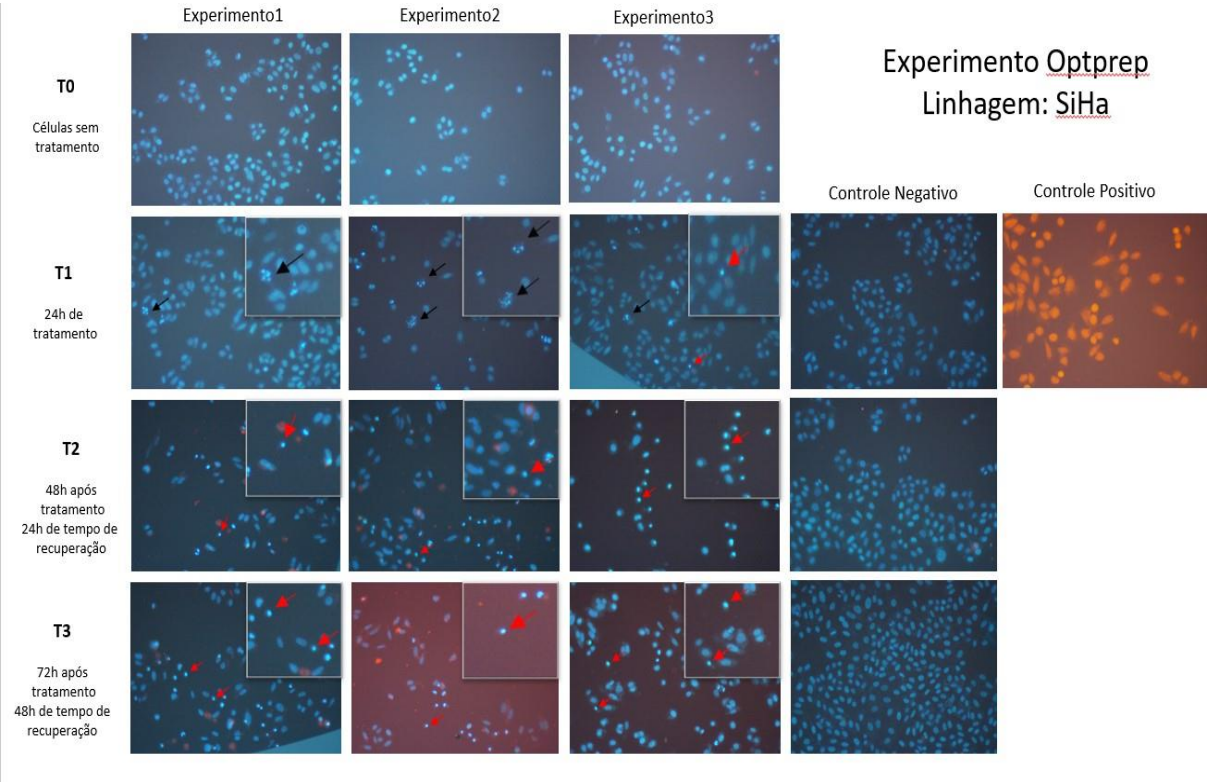

As figuras 14 e 15 representam os resultados obtidos nos experimentos da atividade de Caspase 3/7 para as quatro linhagens avaliadas tratadas com a substância pura MBG. Os resultados demonstram ativação apenas na linhagem SiHa, quando comparado com o controle positivo indutor de apoptose (curcumina 100uM) (*p=ns)*, e comparadas ao controle negativo (*p<0,01*) o que justifica a alta atividade da substância frente a linhagem de câncer cervical SiHa como apresentado nos ensaios de viabilidade celular. Os ensaios foram feitos com 12 horas de tratamento, pois ensaios prévios demonstraram que em 6 horas não houve alteração significativa, assim como ensaios feitos por outros membros do laboratório com substâncias naturais, que também demonstraram alterações apenas com 12 horas. A linhagem Caski não apresentou ativação de caspases, mesmo quando tratada com o CI50 da substância (CP *p<0,001*), e as linhagens C-33A e HaCaT também não apresentaram alterações significativas quando comparadas com o controle positivo (curcumina) (CP *p<0,001)*. Os tratamentos das linhagens C-33A e HaCaT foram feitos com CI50 pareado, ou seja, utilizado o mesmo CI50 da CasKi, pois apresentaram CI50s maiores do que a maior concentração testada.

Sousa e colaboradores (2017) publicaram que bufadienolídeos como bufalina, cinobufagina, telocinobufagina e marinobufagina apresentaram notável potencial antitumoral por apoptose dependente de caspases, o que corrobora com os resultados apresentados neste estudo.

### 4.4. ENSAIO QUALITATIVO DE MORTE CELULAR POR FLUORESCÊNCIA

Os resultados qualitativos obtidos por microscopia de fluorescência de 10 campos aleatórios por poço, em todas as triplicatas e três experimentos independentes estão demonstrados no painel representativo (Figuras 16, 17, 18 e 19). As demais imagens estão contidas no link do drive:
**https://drive.google.com/drive/u/0/folders/1EDdmQ3jkhHRuM6GZ5dJYOqglGIja3fC1**

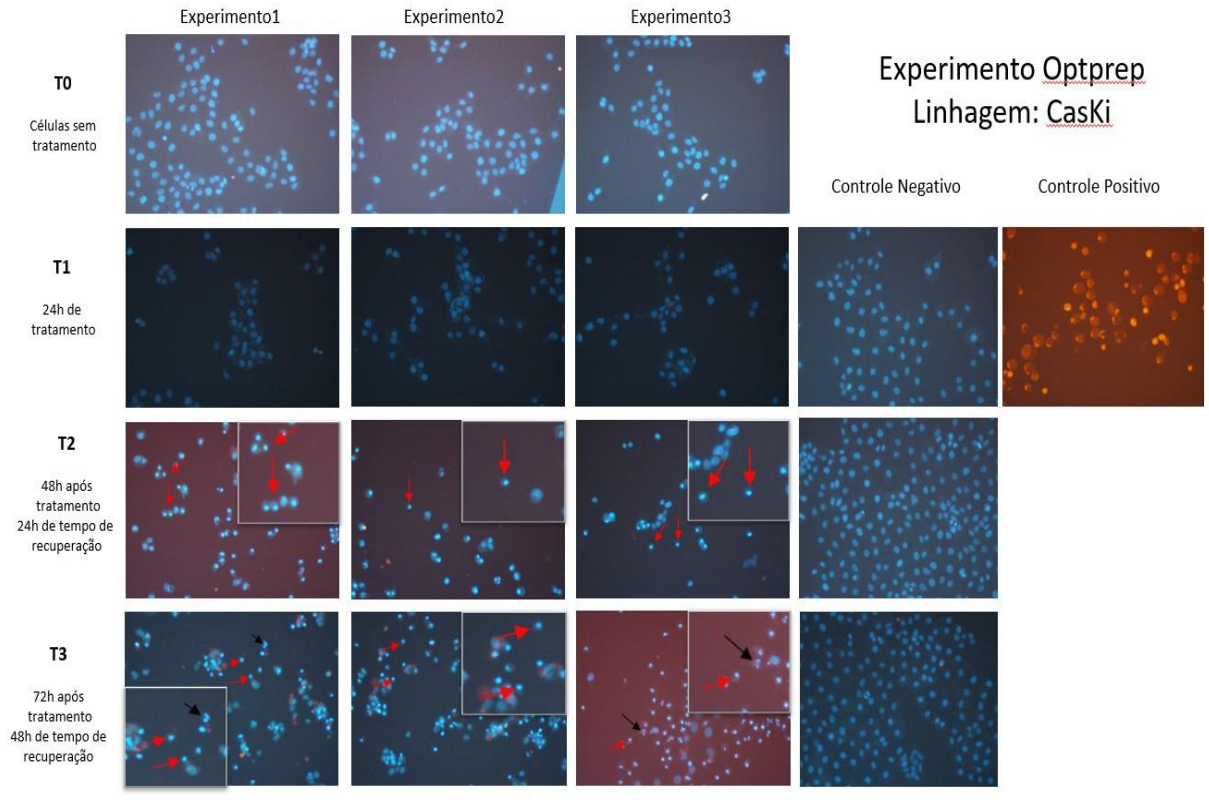
**Figura 16.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem SiHa tratada com CI50 de MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação. Os dados referem-se a três experimentos independentes. Controle Positivo: Doxorrubicina (100uM); Controle Negativo: células não tratadas. Células com fragmentação nuclear (setas pretas), células com picnose nuclear (setas vermelhas).




As imagens acima, demonstram que a linhagem HPV positiva SiHa respondeu ao tratamento com CI50 após 24 horas, apresentando células com núcleos picnóticos, cromatina densa e mais corada (seta vermelha) ou núcleos fragmentados (setas pretas) em T1, o que

difere das imagens tiradas em T0 com células não tratadas e quando comparadas ao CN, em que observam-se células com núcleos inteiros corados em azul. No T2 (48h após tratamento / 24h de recuperação) e T3 (72h após tratamento / 48h de recuperação) pode-se visualizar um aumento progressivo do número de células com núcleos fragmentados e/ou picnóticos (indicado pelas setas), que não são visualizados no CN, sugerindo que mesmo após a retirada do tratamento (24h), as células não apresentaram recuperação. Os controles positivos foram avaliados apenas em T1 de todos os experimentos, pois devido à alta eficácia da doxorrubicina, em 24 horas de tratamento todas as células apresentaram morte (coradas em vermelho) o que fez com que as células se desprendessem dos poços nos demais tempos, dificultando a captura das imagens. Porém foi possível comprovar que as linhagens estudadas apresentam morte quando tratadas com doxorrubicina. Os respectivos resultados de fluorescência corroboram com os resultados apresentados nos ensaios de MTT e caspase.

**Figura 17.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem CasKi tratada com CI50 de MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação. Os dados referem-se a três experimentos independentes. Controle Positivo: Doxorrubicina (100uM); Controle Negativo: células não tratadas. Células com fragmentação nuclear (setas pretas), células com picnose nuclear (setas vermelhas).



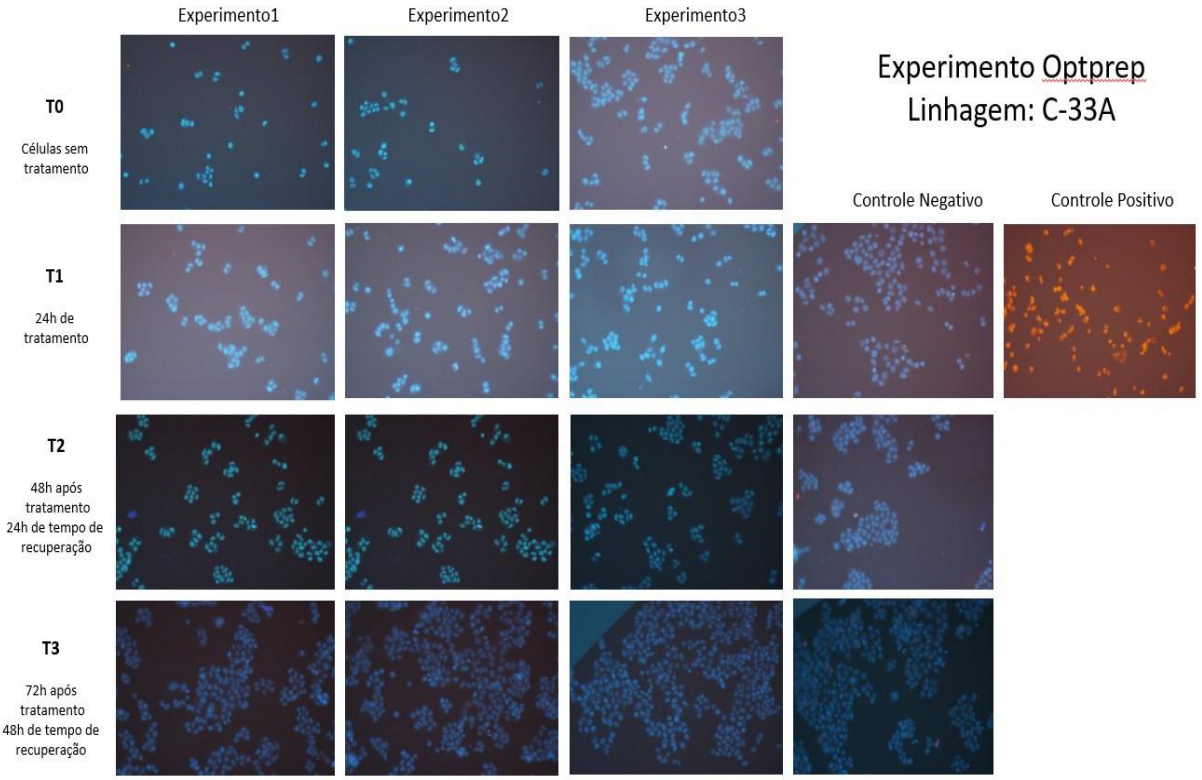
Os experimentos utilizando a CasKi (HPV 16 positiva) apresentaram resposta celular quando comparados ao T0 e ao CN. As células em T1 apresentaram núcleos com dimensões aproximadamente iguais ao CN. Em T2 e T3 é possível observar um aumento progressivo de células com os núcleos picnóticos e cromatina densa (seta na cor vermelha) corados em azul, assim como células com núcleos fragmentados (seta na cor preta), o que sugere que as células estão em processo de morte e que não se recuperaram após a retirada do tratamento.

De acordo com mecanismo já elucidado, o processo de apoptose caracteriza-se pela morte celular programada, sem que haja danos para as células adjacentes, onde pode-se visualizar alterações celulares características, como degradação do DNA, picnose e fragmentação nuclear, formação dos corpos apoptóticos, que serão posteriormente fagocitados (KESA VARDHANA, 2020; ALBERTS, 1999). De acordo com as imagens acima, podemos claramente verificar tais características após o tratamento com MBG, indicando que a substância leva à morte celular por apoptose.

No artigo publicado por Souza (2017), alguns bufodienolídeos reduziram a síntese de DNA e níveis de proteínas antiapoptóticas, levando a ativação de Bax e caspases, causando aumento da expressão do Fas - Proteína associada ao Domínio da Morte (FADD) e liberação de citocromo c, com consequentes alterações morfológicas como condensação da cromatina, fragmentação nuclear, encolhimento do citoplasma, vacúolos citoplasmáticos, redução da viscosidade e corpos apoptóticos, tais como foram visualizados nas imagens acima.

Já utilizando a linhagem C-33A, todos os tempos de tratamento com recuperação demonstraram-se iguais ao controle negativo e ao tempo zero (T0) os quais receberam apenas meio de cultura suplementado. A partir deste resultado qualitativo, pode-se inferir que o tratamento não induziu morte celular em linhagem de câncer cervical não associado ao HPV16. As células foram tratadas com CI50 pareado com o da CasKi uma vez que a maior concentração testada da substância MBG não atingiu inibição de 50% das células em questão no ensaio de MTT.

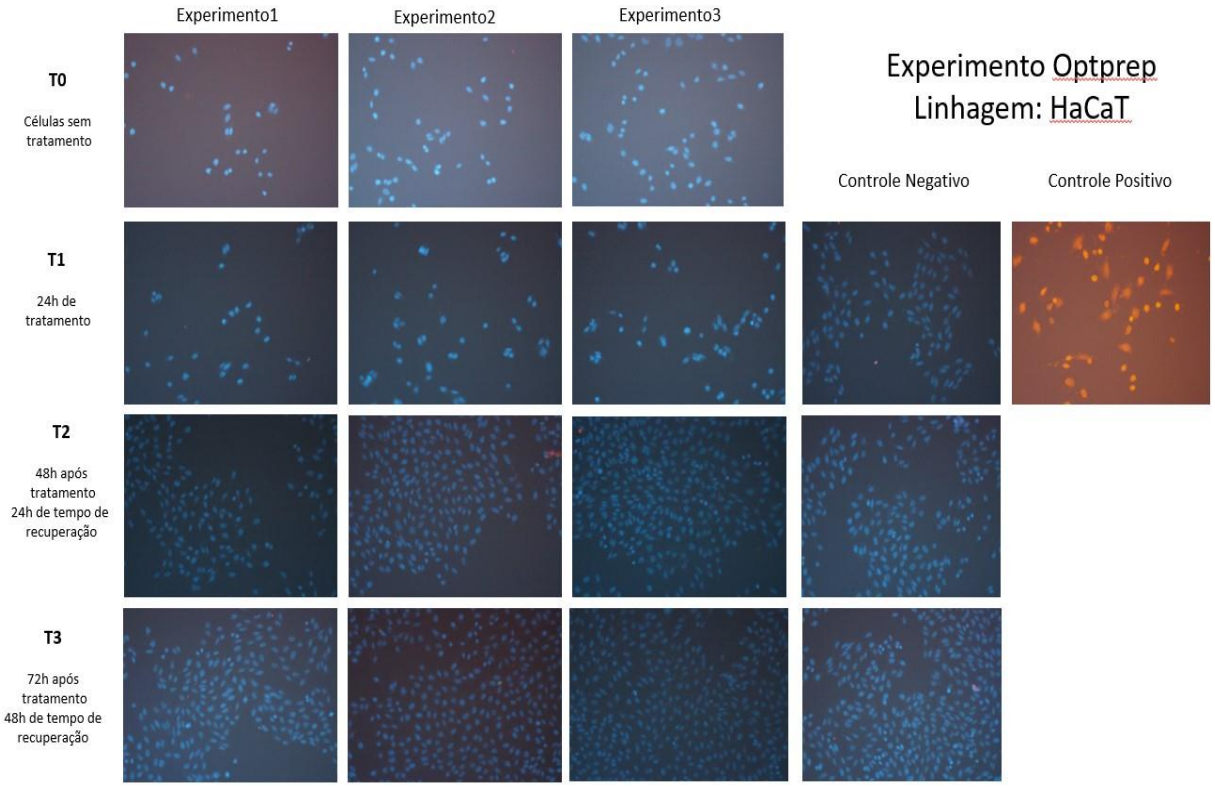
**Figura 18.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem C-33A tratada com CI50 de MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação. Os dados referem-se a três experimentos independentes. Controle Positivo: Doxorrubicina (100uM); Controle Negativo: células não tratadas.




Conforme mencionado na figura 11, a linhagem C-33A, sem HPV, apresenta um perfil genético diferente das células HPV positivas, o que pode estar relacionado com o perfil de resistência ao tratamento, porém são necessárias maiores pesquisas a respeito. Assim, com a concentração utilizada neste experimento (85,80uM) não houve resposta das células C-33A em até 72 horas. Em T3, é possível observar em alguns campos aleatórios, poucas células com núcleos picnóticos que se deve a alta confluência de células no último dia de experimento.

No experimento utilizando a linhagem HaCaT, a mesma concentração de CI50 da Caski foi usada, tal como para a linhagem C-33A (85,80uM). Não houve diferenças significativas das células nos diferentes tempos. A linhagem de fibroblastos imortalizados sem "*background"* genético tumoral não foi sensível ao tratamento com MBG em 24 horas. Assim, estes resultados de fluorescência também reafirmam os resultados anteriores, demonstrando que células não tumorais mantiveram sua viabilidade celular mesmo diante de tratamento com MBG.

**Figura 19.** Análise do potencial citotóxico por fluorescência. Linhagem C-33A tratada com MBG. T0= 24h de plaqueamento (células não tratadas); T1= 24h após tratamento; T2= células com 24h de recuperação; T3= células com 48h de recuperação. Os dados referem-se a três experimentos independentes. Controle Positivo: Doxorrubicina (100uM); Controle Negativo: células não tratadas.




As imagens acima são representativas das demais imagens contidas no drive em que os eventos se repetem em cada tempo do experimento.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a substância selecionada MBG apresentou potencial citotóxico para células associadas ao HPV preferencialmente, quando comparadas com a linhagem de câncer cervical não associada ao vírus e com a linhagem de queratinócitos não tumorais imortalizados, o que sugere que a MBG é seletivamente citotóxica em apenas 24 horas de tratamento e que as não houve recuperação das células mesmo após a retirada do tratamento. Além disso, foi demonstrado que a morte celular ocorre por apoptose dependente de caspases e as alterações morfológicas do processo apoptótico foram validadas pelas imagens de fluorescência.

Os resultados do trabalho sugerem que a linhagem SiHa respondeu bem ao tratamento com a substância pura MGB, por mecanismos ainda não elucidados, o que sustenta a realização de trabalhos futuros com o composto MGB.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


- ALBERTS, D. S. et al. Prevention of cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. **Cancer Research**, v. 59, n. 19, p. 4743–4758, 1999.

- ANTILLA, J.V. et al. Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. **PLOS Computational Biology**, v. 15, e1007493, 2019.

- ARBYN, M. et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis, **Thelancet**, v. 08, 2020.

- BAGULEY, B.C. et al. DNA-Binding Anticancer Drugs: One Target, Two Actions. **Molecules**, v. 26, p. 552, 2021, https://doi.org/10.3390/molecules26030552.

- BALASUBRAMANIAM, S.D. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development; Medicina, v. 55, p. 384, 2019, doi:10.3390/medicina55070384.

- BANFI, F.F. et al. Antiplasmodial and Cytotoxic Activities of Toad Venoms from Southern Amazon, Brazil, **Korean J Parasitol** v. 54, n. 4, 415-421, 2016.

- BORDIGNON, V. et al. How Human Papillomavirus replication and immune evasion strategies take advantage of the host DNA damage repais machinery**. Viruses,** v. 9, p. 390, 2017.

- BOSC, N. et al. The use of novel selectivity metrics in kinase research. **BMC Bioinformatics**, 2017.

- BUCH, K. et al. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - a comparative study. **Radiat Oncol.** v. 3,7,1, 2017, doi: 10.1186/1748-717X-7-1. PMID: 22214341; PMCID: PMC3274452.

- BYCHKOVSKY B.L. et al. Cervical Cancer Control in Latin America: A Call to Action. **Cancer**. v.121, n. 5, p. 502-514, 2018.

- COLPANI, V. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Plos One,** 2020

- CORTE. L.D. et al. Advances in paclitaxel combinations for treating cervical cancer. **Expert Opin Pharmacother,** v. 21,6, p. 663-677, 2020.

- DELLA FERA, A.N. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 13, p. 321, 2021.

- DENG, L. J. Arenobufagin intercalates with DNA leading to G2 cell cycle arrest via ATM/ATR pathway. Oncotarget, v. 6, n.33, 2015.

- DICKEY, B.L. et al. An Updated Systematic Review of Human Papillomavirus Genotype Distribution by Cervical Disease Grade in Women Living with Human Immunodeficiency Virus Highlights Limited Findings from Latin America. **Sex Transm Dis**. v.1,48, e248-e254, 2021, doi: 10.1097/OLQ.0000000000001412. PMID: 34110738; PMCID: PMC8525704.

- DONG, H. R. et al. Preparation, Characterization and Diagnostic Valuation of Two Novel Anti-HPV16 E7 Oncoprotein Monoclonal Antibodies. **Viruses,** v.12, E333, 2020.

- DOOBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Rev. Med**. **Virol**, v. 25: 2–23, 2016.

- ELMORE, S. et al. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Patology,** 2007.

- FILHO, E.D.S.M, et al. Cytotoxicity potential of chemical constituents isolated and derivatised from Rhinella marina venom. **Toxicon**., v. 94, p.37-43, 2021, doi: 10.1016/j.toxicon.2021.02.006. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33610630.

- FISCHER, M. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53- p21-DREAM pathway.; Scientific Reports | 7: 2603 | DOI:10.1038/s41598-017-02831-9

- FRANCONI, R. et al. Plant-Derived Natural Compounds in Genetic Vaccination and Therapy for HPV-Associated Cancers; **Cancer**, v. 12, p.3101, 2020, doi:10.3390/cancers12113101.

- FREITAS, N. L. et al. Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Interventions on Cervical Cancer Induced by Human Papillomavirus. **Frontiers Cell Dev. Biol**., 2021.

- GAO, Y. et al. Telocinobufagin inhibits the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/extracellular signal-regulated kinase/Snail signaling pathway. **Oncology Letters**, v.15, p.7837-7845, 2018.

- GISSMAN, L. et al. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. **J Virol.** v.44, p. 393-400, 1982, doi: 10.1128/JVI.44.1.393400.1982. PMID: 6292500; PMCID: PMC256274.

- GOLDAR, S. et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.16, p.2129-44, 2015.

- GOMES, J. et al. Human Papillomavirus (HPV) and the quadrivalent HPV Vaccine among Brazilian adolescents and parents: Factors associated with and divergences in knowledge and acceptance. **PLoS One**. V. 12,15, e0241674, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0241674. PMID: 33180790; PMCID: PMC7660498.

- GRAVITT, P.E. et al. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. **Viruses,** v.21,9, p. 267, 2017. doi: 10.3390/v9100267. PMID: 28934151; PMCID: PMC5691619.

- GRIGALUNAS, M. et al. Chemical Evolution of Natural Product Structure. **Journal of de American chemical society**. p.144. 2022.

- GUPTA S., KUMAR P. HPV: Molecular pathways and targets. **Curr Probl Cancer**, v.42, n.2, p.161-174, 2018.

- HOPPE-SEYLER K. et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. **Trends Microbiol**., v.26, n.2, p.158-168, 2018.

- INCA www.inca.gov.br

- JOURA, E.A. et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. **N Engl J Med**., v. 372, p. 711–23, 2015.

- KAJITANI, N. et al. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. **Front. Microbiol**., 2012.

- KHAN, I. et al. LC/MS-Based Polar Metabolite Profiling Identified Unique Biomarker Signatures for Cervical Cancer and Cervical Intraepithelial Neoplasia Using Global and Targeted Metabolomics. **Cancers**, v.11, p. 511, 2019.

- KESAVARDHANA, S. et al. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Gasdermin-Induced Pyroptosis. **Annu Rev Immunol**, v. 38, p. 567–595, 2020.

- KIESEL, V.A. et al. Pyruvate carboxylase and cancer progression. **Cancer Metab**. v. 30, 9, p. 20; 2021 doi: 10.1186/s40170-021-00256-7. PMID: 33931119; PMCID: PMC8088034.

- LI M. et al. The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases. **Apoptosis,** v. 26, p.235-247, 2021, doi: 10.1007/s10495-021-01667-z. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33783663; PMCID: PMC8197724

- LIU, Y. et al. Discovery of key genes as novel biomarkers specifically associated with HPVnegative cervical câncer. **Molecular Therapy: Methods & Clinical Development**., v. 21, 2021.

- MACHADO, K.C. et al. Marinobufagin, a molecule from poisonous frogs, causes biochemical, morphological, and cell cycle changes in human neoplasms and vegetal cells. **Toxicology Letters**, p.121-131, 2018.

- MAGALHAES, G.M; et al. Update on human papilloma virus – part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. **Anais Brasileiros de Dermatologia,** v. 96, p. 1-16, 2021.

- MCBRIDE A.A. et al. Oncogenic human papillomaviruses. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v.19, n.372, p.1-9, 2017.

- MCBRIDE A.A. e MÜNGER K. Expert Views on HPV Infection. **Viruses**. v.10, n.2, p. 1-3, 2018.

- MCBRIDE, A. et al. Human Papillomaviruses: diversity, infection and host interaction. **Nature Reviews**, v. 20, 2022.

- MEDEIROS, D.S.S. et al. Biochemical and Biological Profile of Parotoid Secretion of the Amazonian Rhinella marina (Anura: Bufonidae). **BioMed Research International,** 2019, Article ID 2492315, 15 pages.

- MOSMANN, T. et al. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 12, p. 55–63, 1983.

- NORBURY, C.J, et al. Respostas celulares a danos no DNA. **Annu Rev Pharmacol Toxicol***,* v. 41, p.367-401, 2001.

- PARK, J.H. et al. Cancer metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells**, v.9, p. 2308, 2020.

- PISTRITTO, G. et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v.8, 2016.

- QI, J. al at. The Development of Toad Toxins as Potential Therapeutic Agents. **Toxins**, v. 10, p. 336, 2018.

- RAASCH-FERNANDES, L. et al. Induction of phytoalexins and proteins related to pathogenesis in plants treated with extracts of cutaneous secretions of southern Amazonian Bufonidae amphibians. **PLoSOne**, v. 17, 14, e0211020, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0211020, PMID: 30653617; PMCID: PMC6336429.

- REVATHIDEVI, S. APOBEC: A molecular driver in cervical cancer pathogenesis. **Cancer Letters**, v. 496, p.104-116, 2021.

- RODRIGUEZ, C. et al. Bufadienolides from the Skin Secretions of the Neotropical Toad Rhinella alata (Anura: Bufonidae): Antiprotozoal Activity against Trypanosoma cruzi. **Molecules**, v. 26, p. 4217, 2021.

- SAITO, R. et al. Oncologia Molecular. **Editora Atheneu**, capítulo 8, 2016.

- SINGH, R. et al. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 20, p.175–193, 2019.

- SOUZA, F.O. et al. Nitensidine B affects proteins of the glycolytic pathway and induces apoptosis in cervical carcinoma cells imoortalized by HPV16.**Phytomedicine**. 2017.

- SOUSA, L.Q. et al. Bufadienolides from anphibians: a promising source of anticancer ptototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Naþ /Kþ ATPase inhibition. **Toxicon** 127; 63 e 76, 2017.

- SOUMOY, L. et al. Toad Venom Antiproliferative Activities on Metastatic Melanoma: BioGuided Fractionation and Screening of the Compounds of Two Different Venoms. **Biology.** 9, 218, 2020.

- TEKALEGN, Y. et al. High parity is associated with increased risk of cervical cancer: Systematic review and meta-analysis of case–control studies. **Women's Health.** 2022.

- TSANG, S.H. et al. Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. Durability of CrossProtection by Different Schedules of the Bivalent HPV Vaccine: The CVT Trial. **J Natl Cancer Inst.** 1;112(10):1030-1037. doi: 10.1093/jnci/djaa010. PMID: 32091596; PMCID: PMC7566371; 2020.

- VALEA D.B. et al. Level of human development is associated with cervical cancer stage at diagnosis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology.** v.39, n.1, p.1-5, 2018.

- VALPEL, P. et al. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. **J Physiol,** p. 1745-1757, 2021.

- VIEIRA JUNIOR, G.M. et al. Proteins from Rhinella jimi parotoid gland secretion: A comprehensive analytical approach. **Toxicon,** v. 192, p.32-39, 2021, doi: 10.1016/j.toxicon.2021.01.005. Epub 2021 Jan 16. PMID: 33465357.

- WANG, M. et al. Diagnostic value of high-risk human papillomavirus viral load on cervical lesion assessment and ASCUS triage. **Cancer Med,** v.10, p. 2482-2488, 2021, doi: 10.1002/cam4.3653. Epub 2021 Mar 7. PMID: 33682355; PMCID: PMC7982632.

- WAROWICKA, A. et al. Dual Role of YY1 in HPV Life Cycle and Cervical Cancer Development. Int. **J. Mol. Sci**. v.23, p. 3453, 2022.

- WENTZENSEN, N. et al. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. **J Clin Virol.** Suppl 1(Suppl 1): S49-S55, 2016, doi: 10.1016/j.jcv.2015.11.015. Epub 2015 Nov 28. PMID: 26643050; PMCID: PMC4789103.

- WIILKE, D.V. et al. Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. **Planta Med**, v.01,02, p. 49-70, 2021.

- WITTENBORN, N.S. et al. Epidemiology of HPV related malignacies. **Seminars in Radioation Oncology**, v. 31, I. 4, p. 286-296, 2021.

- YI, S.A, et al. HPV-mediated nuclear export of HP1γ drives cervical tumorigenesis by downregulation of p53. **Cell Death Differ, v.**10, p.1038, s41418-020-0520-5, 2020.

- ZAYATS, R. et al. HPV and the risc of HIV acquisition in women. **Frontiers Cell Dev. Biol.,** v. 12. 2022.

- ZHONG, L. et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v.6, p.201, 2021.

- ZHOU X. et al. Mutant p53 in cancer therapy-the barrier or the path. **J Mol Cell Biol.** v.1,11, p.293-305, 2019, doi: 10.1093/jmcb/mjy072. PMID: 30508182; PMCID: PMC6487791.

- ZHU, H. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug Des Devel Ther**, v.7,10, p.1885-95, 2016.