

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 16/12/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Emília Brumatti Galiardi Campoy

Estudo da ação da emodina associada à terapia fotodinâmica em células de carcinoma cervical positivas para HPV de alto risco

São José do Rio Preto

2020

Ana Emília Brumatti Galiardi Campoy

Estudo da ação da emodina associada à terapia fotodinâmica em células de carcinoma cervical positivas para HPV de alto risco

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

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto

2020

C198e

Campoy, Ana Emília Brumatti Galiardi

Estudo da ação da emodina associada à terapia fotodinâmica em células de carcinoma cervical positivas para HPV de alto risco / Ana Emília Brumatti Galiardi Campoy. -- São José do Rio Preto, 2020
81 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientadora: Marília de Freitas Calmon

1. Câncer cervical. 2. Emodina. 3. Papilomavírus Humano. 4.
Terapia Fotodinâmica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Emília Brumatti Galiardi Campoy

Estudo da ação da emodina associada à terapia fotodinâmica em células de carcinoma cervical positivas para HPV de alto risco

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

Financiadora: CAPES

Comissão examinadora

Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Simone Leite Vilamaior

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

UNESP– Araraquara

Prof^a. Dr^a. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi

Instituto Municipal de Ensino Superior – IMES Catanduva

São José do Rio Preto

16 de Dezembro de 2019

Dedico este trabalho ao meu esposo Samuel pelo incentivo e apoio incondicional. Aos meus pais Vania e Valmir, que sempre acreditaram no meu potencial, e não mediram esforços para que eu pudesse concluir mais esta etapa em minha vida. À minha irmã Maria Eliza, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, benção, proteção e por ter colocado em meu caminho pessoas boas e oportunidades.

Aos meus pais Vania e Valmir, pela educação, carinho, amor e incentivo. Obrigada por todo o esforço que fizeram para que hoje eu estivesse aqui.

Ao meu esposo Samuel, por me apoiar em todas as situações, sempre me dando forças para continuar nessa caminhada, pelo seu carinho e por fazer parte da minha vida.

À minha irmã Maria Eliza por sempre estar presente em minha vida.

À minha orientadora Dra. Marília de Freitas Calmon por todos os ensinamentos. Obrigada por me acolher e acreditar em mim.

À professora Paula Rahal por abrir as portas de seu laboratório. Tenho profunda admiração pelo seu trabalho.

A todos os amigos que estão ou já passaram pelo laboratório de Estudos Genômicos: Ágata, Bárbara (B1), Bárbara (B2), Carina, Cíntia, Dayla, Francielly, Gabriela, Guilherme, Hariel, Lenira, Lucas, Maria Letícia (Marilê), Nayara, Pâmela, Patrícia, Ricardo, Tairine e Tamara, obrigada pelo convívio e boas risadas durante todos esses anos.

Aos membros da comissão examinadora pela disponibilidade em analisar e contribuir com o meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela disponibilidade e apoio.

Ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas e ao Laboratório de Estudos Genômicos, pela infraestrutura, sem a qual esse trabalho não seria possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), código de financiamento 001, a qual agradeço pela bolsa concedida.

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

RESUMO

O câncer cervical é um problema de saúde pública mundial, especialmente devido à sua relação com a infecção prévia pelo papilomavírus humano (HPV). Os HPV são uma família de vírus de DNA com mais de 200 tipos e podem ser classificados em HPVs de baixo e alto risco. Os HPVs de alto risco mais relevantes são os HPV-16 e -18, que juntos são responsáveis por mais de 70% dos casos de carcinoma cervical. As modalidades atuais de tratamento para o câncer cervical são cirurgia, e a combinação de quimioterapia à base de cisplatina com radiação, porém apresentam efeitos adversos graves. Portanto, esforços contínuos são necessários para desenvolver novas drogas e estratégias terapêuticas eficazes para aumentar a eficácia da quimioterapia e diminuir esses efeitos colaterais. A emodina tem atraído grande atenção devido a seu efeito anti-inflamatório, antineoplásico e proapoptótico nos últimos anos. Além disso, a emodina pode ser utilizada como agente fotossensibilizador na terapia fotodinâmica. O interesse na terapia fotodinâmica no tratamento do câncer tem crescido exponencialmente, uma vez que é um tratamento minimamente invasivo, onde se erradica as células alvo, evitando-se a toxicidade sistêmica e os efeitos colaterais nos tecidos saudáveis. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da emodina associada à terapia fotodinâmica em linhagens de carcinoma cervical infectadas por HPV de alto risco (SiHa e CaSki) e queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Inicialmente, as investigações demonstraram que a emodina apresentou citotoxicidade em concentração e tempo dependentes, mostrando mais de 80% de viabilidade celular para linhagens celulares SiHa, CaSki e HaCaT em concentrações abaixo de 30 $\mu\text{mol/L}$. As imagens de microscopia de fluorescência mostraram uma internalização celular eficiente de emodina em todas as linhas celulares analisadas. Uma diminuição significativa da viabilidade celular para as linhagens celulares SiHa, CaSki e HaCaT foi observado após tratamento com emodina associada à terapia fotodinâmica. Isto foi acompanhado por um aumento na produção de EROs, aumento nas atividades de caspase-3 e aumento na intensidade de fluorescência dos vacúolos autofágicos, sugerindo morte celular por apoptose e autofagia, provavelmente devido ao aumento na produção de EROs. Além disso, 22 genes alvo de drogas anticâncer foram superexpressos e 2 genes alvo de drogas anticâncer tiveram sua expressão diminuída em células SiHa após o tratamento com terapia fotodinâmica mediada por emodina. Estes resultados mostram que a emodina em combinação com a terapia fotodinâmica tem um grande potencial terapêutico para ser utilizada como um tratamento alternativo para o câncer cervical.

Palavras-chave: Câncer cervical; Emodina; Papilomavírus Humano; Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Cervical cancer is a worldwide public health problem, especially due to its relation to the previous infection by human papillomavirus (HPV). The HPV is a family of DNA viruses with more than 200 types, and can be classified in low and high risk HPVs. The most important high risk HPVs are the HPV-16 and -18, which together are responsible for more than 70% cervical carcinoma cases. Current treatment modalities for cervical cancer are surgery, and the combination of cisplatin based chemotherapy with radiation, however they present severe adverse effects. Therefore, ongoing efforts are necessary to developed new drugs and effective therapeutic strategies to enhance chemotherapeutic efficacy and decrease these side effects. Emodin has attracted extensive attention due to its anti-inflammatory, antineoplastic, and proapoptotic effects in recent years. Furthermore, emodin may be used as a photosensitizing agent in photodynamic therapy. The interest in photodynamic therapy in the treatment of cancer has grown exponentially, since it is a minimally invasive treatment where eradicate target cells while avoiding systemic toxicity and side effects on healthy tissues. So, the aim of this study was to analyze the effect of emodin associated with photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines infected with high-risk HPV (SiHa and CaSki) and immortalized human keratinocytes (HaCaT). Initially, the investigations demonstrated that emodin presented cytotoxicity in concentration and time-dependent manner showing more than 80% of cell viability for SiHa, CaSki and HaCaT cell lines in concentrations below 30 $\mu\text{mol/L}$. The fluorescence microscopy images showed an efficient cellular uptake of emodin in all the cell lines analyzed. A significant decrease of the cell viability for SiHa, CaSki and HaCaT cell lines was observed after treatment with photodynamic therapy mediated by emodin. This was accompanied by an increase of ROS production, increase in caspase-3 activity and increase in the fluorescence intensity of autophagic vacuoles, suggesting cell death by apoptosis and autophagy probably due to the increase in production of ROS. Additionally, 22 target genes for anti-cancer drugs were overexpressed and 2 target genes for anti-cancer drugs were downregulated in SiHa cells after treatment with photodynamic therapy mediated by emodin. These results show that emodin in combination with photodynamic therapy has a great therapeutic potential to be used as an alternative treatment for cervical cancer.

Keywords: Cervical cancer; Emodin; Human papillomavirus; Photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Representação esquemática do genoma viral do HPV-16.....	19
Figura 2. Árvore filogenética dos papilomavírus.....	21
Figura 3. Ciclo viral do HPV.....	22
Figura 4. Integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira.....	24
Figura 5. Estrutura química da emodina.....	26
Figura 6. Reações tipo I e tipo II na terapia fotodinâmica.....	29

CAPÍTULO II

Figure 1. Citotoxicity of emodin incubation in cell lines.....	73
Figure 2. Emodin internalized into SiHa, CaSki and HaCaT cells.....	74
Figure 3. Phototoxicity assay in SiHa, CaSki and HaCaT 24 hours after incubation with emodin followed by irradiation.....	75
Figure 4. ROS production in SiHa, CaSki and HaCaT cells after treatment with emodin-PDT, emodin, laser and hydrogen peroxide.....	76
Figure 5. Caspase-3 activity in SiHa, CaSki and HaCaT cells after treatment with emodin-PDT, emodin and laser.....	77
Figure 6. Autophagy assay in SiHa, CaSki and HaCaT cells after treatment with emodin-PDT, emodin, laser and trichostatin A (TSA).....	78
Table 1. Differential expression of target genes of anticancer drugs in SiHa cells after treatment with emodin-PDT.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
¹ O ₂	Oxigênio singleto
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Activator protein-1 (Proteína ativadora 1)
ATCC	American Type Culture Collection
ATF2	Activating transcription factor 2 (Fator ativador de transcrição 2)
AURKA	Aurora Kinase A (Aurora quinase A)
AURKC	Aurora Kinase C (Aurora quinase C)
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5 (inibidor baculoviral de repetições de apoptose contendo 5)
CACO-2	Células de adenocarcinoma colorretal
CaSki	Células de carcinoma cervical humano infectadas pelo HPV-16/18
CDK1	Cyclin Dependent Kinase 1 (Quinase dependente de ciclina 1)
CDK7	Cyclin Dependent Kinase 7 (Quinase dependente de ciclina 7)
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTSS	Cathepsin S (catepsina S)
D.O.	Densidade ótica
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFDA	2', 7' - diacetato de diclorofluorescina
DEVD-pNA	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbelco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E	Early (Precoce)
E ₂ F	Epithelial fator 2 (Fator epitelial 2)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESR1	Estrogen Receptor 1 (Receptor de Estrogênio 1)

FBS	Fetal bovine serum (Soro fetal bovino)
FDA	Food and Drug Administration (Administração de alimentos e drogas)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FS	Fotossensibilizador
GTSP1	Glutathione S-transferase pi 1 (Glutathione S-transferase 1)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HaCaT	Queratinócitos humanos imortalizados
HDAC4	Histone Deacetylase 4 (Histona desacetilase 4)
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Fator induzido por hipóxia 1-alfa)
HO •	Radical hidroxila
HPV	Human papillomavirus (Papilomavírus humano)
HSIL	High grade squamous intraepithelial lesion (Lesão intraepitelial escamosa de alto grau)
HSP	Heat shock proteins (proteínas do choque térmico)
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1 (Proteína de Choque Térmico 90 Família Alfa Classe A Membro 1)
HSPGs	Proteoglicanos de heparan sulfato
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Virus)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IST	Infecção sexualmente transmissível
L	Late (Tardio)
LCR	Long control region (Região de controle longa)
LDL	Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de baixa densidade)
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion (Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau)
MDM4	MDM4 Regulator of P53 (Regulador MDM4 da P53)
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MTOR	Mammalian target of rapamycin (Alvo de rapamicina em mamífero)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mW	Miliwatt
NC	Negative Control (Controle negativo)

NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
Nm	Nanômetro
O ₂ •	Ânion superóxido
ORF	Open Reading Frames (Região aberta de leitura)
p21	Proteína p21
p27	Proteína p27
p53	Proteína p53
PARP4	Poly(ADP-Ribose) Polymerase Family Member 4 (Membro 4 da família Poly(ADP-Ribose) Polimerase)
Pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PC	Positive control (Controle positivo)
PDT	Photodynamic therapy (Terapia fotodinâmica)
PDZ	PDZ protein (Proteína PDZ)
PI3K/AKT	Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B (fosfatidilinositol 3-quinases/ Proteína quinase B)
PIK3C2A	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing alpha polypeptide (Polipeptídeo alfa contendo o domínio fosfatidilinositol-4-fosfato 3-quinase)
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3 (Subunidade Catalítica de Fosfatidilinositol 3-Quinase Tipo 3)
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase subunidade alfa catalítica)
PKC	Protein kinase C (Proteína quinase C)
PLK2	Polo like kinase 2 (Polo like quinase 2)
PLK4	Polo like kinase 4 (Polo like quinase 4)
p-NA	p-nitroanilina
pRB	Proteína do retinoblastoma
OS	Photosensitizer (Fotosensibilizador)
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RHOA	Ras homolog gene family, member A (Família de genes de homólogos Ras, membro A)

RHOB	Ras homolog gene family, member B (Família de genes de homólogos Ras, membro B)
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigênio)
RT-PCR	Real time-PCR (Reação em cadeia da Polimerase em tempo real)
SD	Standard deviation (Desvio padrão)
SiHa	Linhagem de carcinoma cervical humano infectada pelo HPV-16
SUS	Sistema Único de Saúde
TFD	Terapia fotodinâmica
TNKS	Tankyrase (Tanquirase)
TOP2B	DNA topoisomerase 2-beta (Topoisomerase 2-beta do DNA)
TSA	Tricostatina A
U	Unidade
URR	Upstream regulatory region (Região reguladora a montante)
UV/UVA/UVB	Radiação ultravioleta/Radiação ultravioleta tipo A/ Radiação ultravioleta tipo B
U-87 MG	Células de glioblastoma humano
v/v	Volume/volume
VC	Vehicle control (Controle de veículo)
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
1. Introdução.....	16
1.1.Câncer cervical.....	16
1.2. Papilomavírus humano (HPV).....	19
1.2.1. Biologia do Papilomavírus humano.....	19
1.2.2. Ciclo de vida do HPV e carcinogenese.....	21
1.3. Emodina.....	26
1.4. Terapia fotodinâmica.....	27
2. Objetivos.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. Materiais e métodos.....	32
3.1. Preparação da emodina.....	32
3.2. Fonte de radiação.....	32
3.3. Cultivo e manutenção das linhagens celulares.....	32
3.4. Ensaio de viabilidade celular nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT.....	33
3.5. Microscopia de fluorescência para análise de captação de emodina nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT.....	34
3.6. Ensaio de fototoxicidade.....	34
3.7. Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	35
3.8. Ensaio de apoptose por meio da detecção enzimática da caspase-3.....	35
3.9. Ensaio de autofagia.....	36
3.10. Isolamento de RNA e síntese de cDNA.....	37
3.11. PCR array.....	37
3.12. Análises Estatísticas.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO II.....	52
Effects of photodynamic therapy mediated by emodin in cervical carcinoma cells.....	53
Abstract.....	54
1. Introduction.....	55

2. Materials and methods.....	56
2.1. Emodin.....	56
2.2. Radiation source.....	56
2.3. Cells lines and culture.....	56
2.4. Cytotoxicity analysis by MTT assay.....	57
2.5. Cellular uptake of emodin.....	57
2.6. Cell phototoxicity.....	57
2.7. Detection of reactive oxigen species (ROS).....	58
2.8. Quantification of caspase-3 activity.....	58
2.9. Autophagy assay.....	59
2.10. RNA Isolation, cDNA Synthesis and Amplification Total.....	59
2.11. PCR arrays.....	59
2.12. Statistical analysis.....	60
3. Results.....	60
3.1. Effect of emodin on cell viability.....	60
3.2. Cellular uptake of emodin.....	60
3.3. Cell phototoxicity	61
3.4. Detection of reactive oxigen species (ROS).....	61
3.5. Quantification of caspase-3 activity.....	62
3.6 Autophagy assay.....	62
3.7. PCR arrays.....	62
4. Discussion.....	63
Conflicts of interest.....	66
Acknowledgments.....	66
References.....	66
CAPÍTULO III.....	80
CONCLUSÕES.....	81

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer cervical

O câncer cervical é um sério problema de saúde entre mulheres em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento, e é causado pela infecção persistente por alguns tipos de Papilomavírus Humano (HPV) (SO et al., 2019). É o quarto tipo mais comum de câncer em mulheres no mundo, com aproximadamente 570.000 mil novos casos no ano de 2018 (BRAY et al., 2018). No Brasil, estimativas mostram que o câncer cervical é a terceira neoplasia mais comum na população feminina, atrás apenas do câncer de mama e do colorretal, e a quarta causa de morte por câncer entre mulheres de acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer divulgada pelo Instituto Nacional de Câncer. Para o biênio de 2018/2019 a estimativa é de 16.370 novos casos, com risco estimado de 15,43 novos a cada 100 mil mulheres. Por regiões é mais incidente na região Norte (25,62/100 mil), seguido da regiões Nordeste (20,43/ 100 mil), Centro-Oeste (18,32/100 mil), Sul (14,07/100 mil) e Sudeste (9,97/ 100 mil), respectivamente (INCA, 2019).

A infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical é bem estabelecida, sendo que o processo carcinogênico não ocorrerá na ausência da infecção persistente por HPVs de alto risco (GALANI; CHRISTODOULOU, 2009; SHANMUGASUNDARAM; YOU, 2017). Mais de 200 tipos de HPV já foram descritos e destes, 40 são conhecidos por infectar o trato genital, sendo classificados como HPV de “alto” ou “baixo” potencial oncogênico com base na prevalência de câncer cervical e seus precursores (TUNGTEAKKHUN; DUERKSEN-HUGHES, 2008; CHEN, Z. et al., 2018). Os HPVs de baixo risco mais relevantes são os tipos 6 e 11 que induzem verrugas anogenitais benignas (condiloma acuminado), com o mínimo risco de progressão para malignidade (BURD; DEAN, 2016). Os HPVs de alto risco são os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 e 59 (ARBYN et al., 2014). Estima-se que aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical ocorram devido à infecção pelos tipos 16 (55%) e 18 (15%) (CHELIMO et al., 2013; TSIKOURAS et al., 2016). Além do câncer cervical, a infecção por tipos de HPV de alto risco também pode causar outros tipos de câncer como câncer de vagina, vulva, orofaringe, anal, peniano e carcinoma cutâneo (LI; XU, 2017).

O HPV se destaca como uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais comuns no mundo, portanto a transmissão sexual é a via mais importante de infecção (SABEENA et al., 2017). Entretanto, estudos recentes indicam que a transmissão vertical

(durante a gravidez ou no momento do parto) também é uma fonte importante de transmissão do HPV (KERO; RAUTAVA, 2019).

Por se tratar de uma IST, os principais fatores de risco para infecção pelo HPV são comportamentos relacionados à atividade sexual como o início precoce da atividade sexual e o grande número de parceiros sexuais. Mulheres que não iniciaram a atividade sexual não são infectadas pelo HPV e a detecção do DNA do HPV em homens e mulheres aumenta significativamente com o aumento do número de parceiros sexuais ao longo da vida (CHELIMO et al., 2013). Além dos aspectos relacionados à própria infecção pelo HPV, o risco de desenvolvimento de câncer cervical é agravado por fatores como uso de contraceptivos orais por longos períodos (há evidências que os hormônios presentes nos contraceptivos orais aumentem a expressão gênica do HPV no colo do útero via mecanismos de receptores de progesterona e elementos de resposta hormonal no genoma viral) (MUNOZ et al., 2006), tabaco (há evidências que o tabaco possa promover uma redução da resposta imunológica no colo do útero e possa provocar danos genéticos diretos causados pelos carcinógenos relacionados ao cigarro) (SHANMUGASUNDARAM; YOU, 2017), multiparidade (há evidências que as altas concentrações hormonais durante a gravidez e traumas cervicais relacionados ao parto possam causar ectopia do epitélio colunar sobre a ectocérvice, o que por sua vez favorece a exposição da junção escamo-colunar à infecção pelo HPV) (MUNOZ et al., 2006) e indivíduos com comprometimento da imunidade celular (a imunossupressão fornece um ambiente para a infecção persistente pelo HPV, que acarreta um risco maior de transformação maligna) (BURD; DEAN, 2016).

Embora a infecção genital pelo HPV seja muito frequente, na maioria das vezes ela não causa doença, ocorrendo resolução espontânea (INCA, 2019). Entretanto, no pequeno número de casos em que a infecção persiste conduz ao desenvolvimento de alterações celulares de baixo grau (LSIL – lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) que se caracterizam pela diferenciação anormal no terço inferior do epitélio. Este tipo de lesão pode regredir ou evoluir para displasia severa (HSIL - lesão intraepitelial escamosa de alto grau) atingindo o terço superior do epitélio pavimentoso cervical. Por fim, pode ocorrer regressão ou evoluir para carcinoma invasivo, caracterizado pela invasão do estroma pelas células neoplásicas e pela ruptura da camada basal (WOODMAN et al., 2003; WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

O exame citopatológico (Papanicolaou) continua sendo uma intervenção crítica para reduzir a incidência e mortalidade do câncer cervical, particularmente em locais com poucos recursos, pois permite a detecção de lesões precursoras e da doença em estágios iniciais (MUSA et al., 2017). Este exame consiste no estudo das células descamadas esfoliadas da parte interna

(endocérvice) e externa (ectocérvice) do colo uterino, e é o método mais utilizado na rede de atenção básica por ser barato, indolor e eficaz. O Ministério da Saúde oferece esse exame gratuitamente por meio do programa nacional de controle de colo de útero, cujo objetivo é reduzir a morbimortalidade pelo referido câncer (BEZERRA, 2005).

A vacina é uma importante ferramenta na profilaxia ao câncer cervical. Atualmente, existem três formas de vacinas profiláticas contra o HPV aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration). A vacina quadrivalente Gardasil[®] (Merck) que protege contra os tipos não oncogênicos 6 e 11 e oncogênicos 16 e 18, a vacina bivalente Cervarix[®] (GSK) que protege contra os tipos oncogênicos 16 e 18 e a vacina nonivalente Gardasil-9[®] (Merck) que protege contra os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (TUMBAN et al., 2015; DE OLIVEIRA;FREGNANI; VILLA, 2019). As vacinas são compostas por partículas semelhantes ao vírus, formadas pela proteína L1 do capsídeo do HPV, o que confere proteção restrita ao tipo viral (BARRA et al., 2019). Em 2014 o Ministério da Saúde implementou a vacina quadrivalente Gardasil[®] (Merck) no Sistema Único de Saúde (SUS). Atualmente, a vacina é indicada para meninas de 9 a 14 anos, meninos de 11 a 14 anos, pessoas transplantadas e pacientes oncológicos na faixa etária de 9 a 26 anos, sendo aplicada em duas doses, com intervalo de seis meses entre elas (BRASIL, 2019). No entanto, a vacina não protege contra todos os tipos de HPV e não é eficaz contra infecções ou lesões por HPV já existentes, portanto, não elimina ações de prevenção e de detecção precoce pelo rastreamento através do exame de Papanicolaou (MOGHTADERI; DOR, 2019).

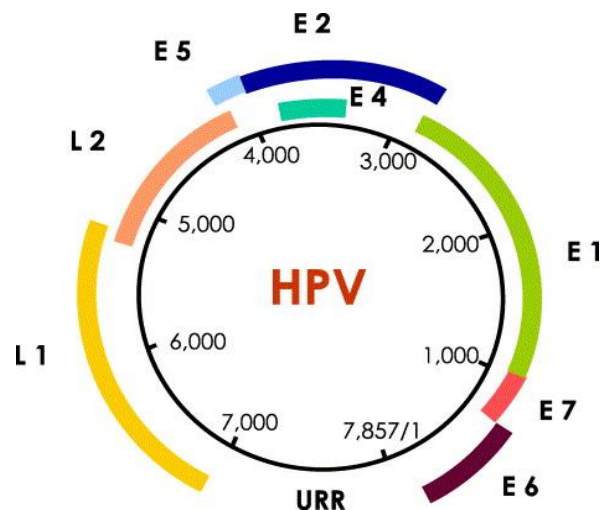
O tratamento habitual do câncer cervical é a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, no entanto, o tipo de tratamento dependerá de fatores como estadiamento da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais tais como idade e desejo de ter filhos (INCA, 2019). Para pacientes com câncer cervical em estágio inicial o tratamento convencional é histerectomia radical e/ou radiação com ou sem quimioterapia. Em pacientes com doença localmente avançada ou metastática o tratamento inclui radioterapia e quimioterapia à base de cisplatina (LIONTOS et al., 2019). Entretanto, todas essas modalidades de tratamento apresentam desvantagens. O tratamento cirúrgico é restrito para pacientes em estado inicial e pacientes jovens que perderam a fertilidade (YAOXIAN et al., 2013). A quimioterapia e a radioterapia não são específicas para as células cancerosas e muitas vezes provocam efeitos colaterais graves, como, por exemplo neurotoxicidade, nefrotoxicidade, reações alérgicas, diminuição da imunidade a infecções, distúrbios gastrointestinais, hemorragia e perda auditiva (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; SEGOVIA-MENDOZA et al., 2015). Sendo assim, novas estratégias terapêuticas devem ser avaliadas para melhorar a qualidade de vida do paciente.

1.2. Papilomavírus Humano (HPV)

1.2.1. Biologia do Papilomavirus Humano

Os Papilomavírus humano são pequenos vírus não envelopados de DNA de fita dupla, pertencentes à família *Papillomaviridae* (BURD; DEAN, 2016), que infectam o epitélio da pele e membranas mucosas (KESSLER, 2017). Possuem capsídeo protéico (composto por duas proteínas estruturais) que se organizam em 72 subunidades (capsômeros), de padrão icosaédrico, com 55 nm de diâmetro (HORVATH et al., 2010). Seu genoma apresenta 8.000 pares de bases, sendo organizado em oito *Open Reading Frames* (ORFs) e pode ser dividido em três regiões principais: *Long Control Region* (LCR) ou *Upstream Regulatory Region* (URR), região tardia ou *late* (L) e região precoce ou *early* (E) (Figura 1) (NOWINSKA et al., 2017).

Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV: genes da região precoce (E), genes da região tardia (L) e a região não codificadora (LCR ou URR).



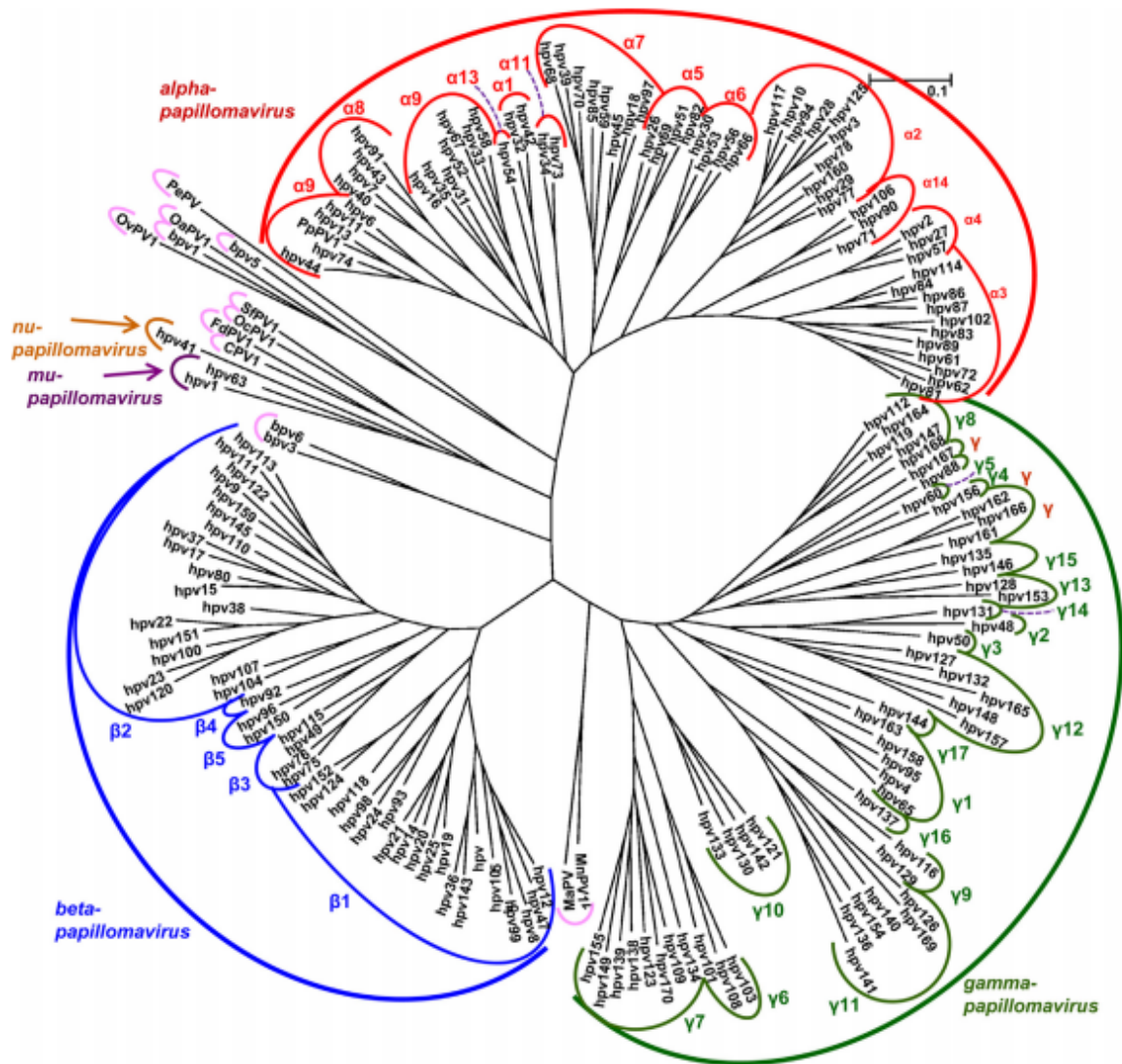
Fonte: (Munoz et al., 2006).

A região não codificadora denominada LCR ou URR está localizada entre os genes L1 e o início da região precoce e possui aproximadamente 1.000 pb (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; PSYRRI; DIMAIO, 2008). Esta região não tem qualquer função codificadora proteica, mas contém os elementos promotores, locais de ligação do fator de transcrição e a origem de replicação viral (MUNOZ et al., 2006; DOORBAR et al., 2015).

A região precoce apresenta aproximadamente 4.000 pb e nela estão situadas as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que são responsáveis pela replicação do DNA viral e transformação celular (HORVATH et al., 2010). Mais especificamente, os genes precoces são responsáveis pela replicação do DNA e controle de transcrição de genes alvos (gene *E1*), controle de transcrição (gene *E2*), maturação do vírus e alteração da matriz intracelular (gene *E4*), e no estímulo da proliferação e manutenção da transformação celular (genes *E5*, *E6* e *E7*) (BOULET et al., 2007).

A região tardia apresenta aproximadamente 3.000 pb e é composta pelos genes L1 e L2, sendo a proteína L1 a maior proteína do capsídeo e L2 a menor (HORVATH et al., 2010; RYNDOCK; MEYERS, 2014). Os genes da região tardia formam sequências altamente conservadas em todos os papilomavírus, sendo que a classificação do HPV baseia-se na variação da sequência da proteína L1 (Figura 2) (BZHALAVA;EKLUND; DILLNER, 2015). Gêneros diferentes de HPVs compartilham menos de 60% de similaridade na sequência de nucleotídeos do capsídeo principal da proteína L1, enquanto diferentes espécies virais dentro de um mesmo gênero dividem de 60% a 70% de similaridade (LETO et al., 2011). Diferenças maiores que 10% indicam tipos diferentes de HPV (BASTO et al., 2017). Com base na sequência nucleotídica do gene da proteína L1, o Comitê Internacional de Taxonomia de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV), classificou os HPVs que infectam humanos em 5 gêneros: alfa, beta, gama, mu e nu (Figura 2). No gênero Alphapapillomavirus (Alfa HPV) são encontrados os tipos que infectam preferencialmente a mucosa oral e anogenital em humanos (GHEIT, 2019). Além disso, a proteína L1 é responsável pela imunogenicidade do vírus e a proteína L2 pela a incorporação do DNA viral no vírion (LETO et al., 2011).

Figura 2: Árvore filogenética dos papilomavírus. Filogenia baseada na sequência de L1 de 170 tipos de HPV e sequências individuais de papilomavírus animais. Os números nas pontas dos ramos identificam os tipos de HPV. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos, as espécies.



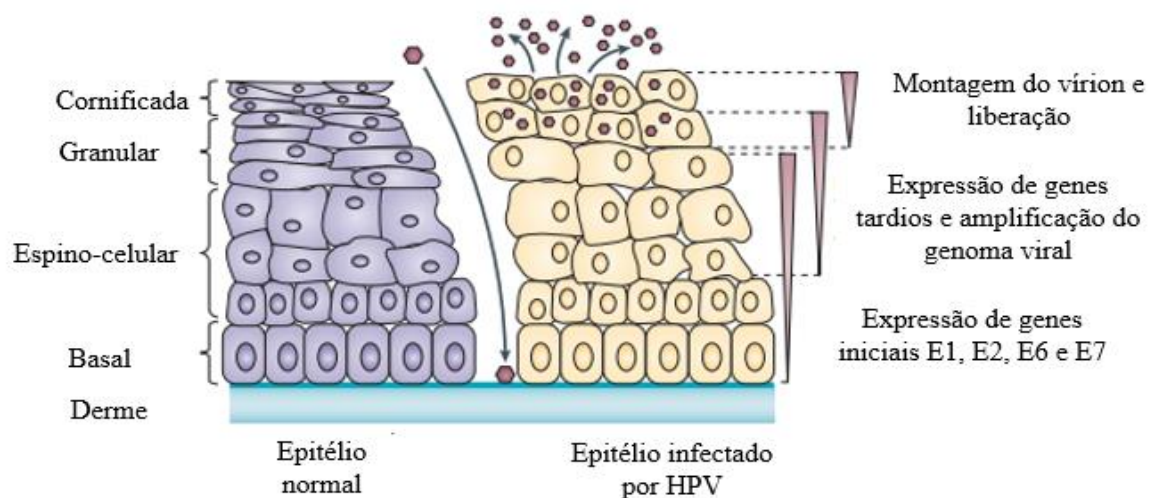
Fonte: (DE VILLIERS, 2013).

1.2.2. Ciclo de vida do HPV e carcinogênese

O ciclo de vida do HPV está diretamente ligado ao ciclo de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro infectado e inicia-se quando partículas infecciosas entram nas células da camada basal (única camada de células proliferativas indiferenciadas) das mucosas ou epiderme que são capazes de proliferação através de microlesões, de modo a criar um ambiente competente de replicação, o que permite a amplificação do genoma e acondicionamento em

partículas infecciosas (Figura 3) (BOULET et al., 2007; STANLEY, 2008; DOORBAR et al., 2015).

Figura 3: Ciclo viral do Papilomavírus Humano (HPV). O epitélio não infectado é mostrado à esquerda e o epitélio infectado pelo HPV é mostrado à direita. Através de microlesões o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio. Na infecção, os genomas virais são estabelecidos no núcleo como epissomas e genes virais precoces são expressos. Os genomas virais são replicados em sincronia com a replicação do DNA da célula hospedeira. Ao migrar para as camadas suprabasais os genes virais são ativados, o DNA do vírus é replicado e as proteínas do capsômero são sintetizadas. As partículas virais formadas são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outros tecidos.



Fonte: Adaptado de (MOODY; LAIMINS, 2010).

O vírus se liga inicialmente a proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs), que servem como receptores de ligação primários nas células da camada basal. A ligação da proteína L1 do HPV ao HSPGs da célula hospedeira induz a alterações conformacionais no capsídeo viral, resultando em perda de afinidade com o receptor primário, e expondo a proteína L2 (HARDEN; MUNGER, 2017). As alterações morfológicas no vírus permitem a internalização do vírus na célula mediante um segundo receptor, cuja natureza permanece incerta, embora integrina $\alpha 6$ já tenha sido relacionada a este processo (DOORBAR et al., 2012; DAY; SCHELHAAS, 2014). Sendo assim, uma vez aderidos à membrana plasmática, a entrada do vírus nas células da camada basal ocorre através de endocitose, um processo que pode levar horas (DAY; SCHELHAAS, 2014).

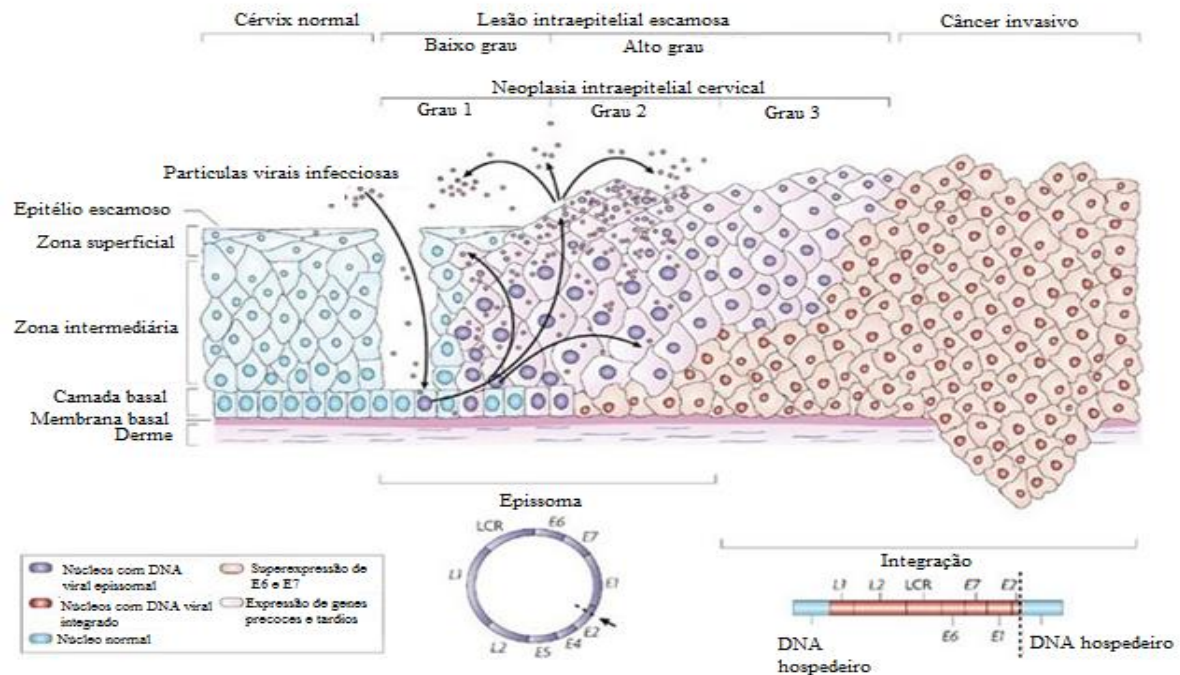
Após a internalização, ocorre a etapa de desnudamento do capsídeo e o genoma viral segue em direção ao núcleo, onde o HPV é identificado em partículas virais

extracromossômicas (epissoma), replicando seu material genético concomitantemente com os cromossomos da célula hospedeira (SCHILLER;DAY; KINES, 2010). Nessa fase, baixos níveis de DNA viral são sintetizados nas células infectadas da camada basal, formando aproximadamente 50 a 100 cópias epissomais do genoma viral por célula (PETT; COLEMAN, 2007). Os genes virais E1 e E2 (fatores de replicação) são os primeiros a serem expressos e formam um complexo que se liga à origem de replicação e atua no sentido de recrutamento de polimerases celulares e proteínas acessórias que mediam a replicação de DNA (KANODIA;FAHEY; KAST, 2007). A proteína E1 é a única enzima codificada pelo vírus e funciona como uma helicase dependente de ATP. A E1 se liga à origem de replicação viral e é necessária para a iniciação e alongamento do DNA viral. A E2 estabiliza a ligação de E1 na origem de replicação, resultando em alta afinidade de ligação do complexo E1/E2 à origem de replicação (HARDEN; MUNGER, 2017). A infecção das células basais pelo HPV leva à ativação de uma cascata de expressão de genes virais que resulta na replicação de seu genoma, no entanto, a expressão destes genes é amplamente reprimida, existindo apenas uma limitada expressão de genes virais específicos da região precoce (KANODIA;FAHEY; KAST, 2007).

Quando uma célula basal infectada se divide, uma das células filhas permanece na camada basal, enquanto a outra se move para o próximo nível do epitélio estratificado e inicia o processo de diferenciação (ANACKER; MOODY, 2017). Após a entrada em camadas suprabasais, o genoma viral circular é então replicado e proteínas estruturais são formadas. Nas camadas superiores da epiderme ou mucosa, as partículas virais completas são montadas e liberadas, infectando assim outras células (ZUR HAUSEN, 2002). Portanto, a diferenciação desencadeia a fase produtiva do ciclo de vida viral, que resulta na expressão gênica tardia e na amplificação do genoma viral (ANACKER; MOODY, 2017). O ciclo infeccioso *in vivo* leva de 2 a 3 semanas em média. Este é o tempo necessário para o queratinócito mover-se da camada basal em direção à superfície do epitélio e diferenciar-se (STANLEY, 2010).

Um passo crucial na progressão para o câncer é a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira (PARFENOV et al., 2014) (Figura 4). Para que isto ocorra é necessário uma quebra no genoma viral, que normalmente ocorre nas regiões E1 e E2, levando a perda de função desses genes (ROSA et al., 2009). Isto constitui um passo crítico na carcinogênese, visto que a perda de E2 leva à expressão aumentada das principais oncoproteínas virais E6 e E7 (PRATI;MARANGONI; BOCCARDO, 2018).

Figura 4: Integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira. Os papilomavírus possuem cromossomos de DNA circular de fita dupla que normalmente são mantidos de maneira estável nas células basais do epitélio, replicando seu cromossomo concomitantemente com os cromossomos da célula hospedeira. Acidentes podem causar a integração de um fragmento do cromossomo dos papilomavírus ao cromossomo do hospedeiro, alterando o ambiente dos genes virais nas células basais, rompendo o controle normal da expressão gênica viral. A expressão desregulada das proteínas virais interfere com o controle da divisão celular nas células basais, ajudando no processo de carcinogênese (direita).



Fonte: Adaptado de (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

As proteínas E6 e E7 dos HPV de alto risco são essenciais na replicação viral e transformação maligna, pois inativam dois importantes genes supressores de tumor. Ambas as proteínas induzem a proliferação, imortalização e transformação maligna das células infectadas (BOULET et al., 2007). A proteína E7 associa-se com pRb, um regulador negativo do ciclo celular que normalmente previne a progressão da fase G1 para a fase S por se associar ao fator de transcrição E2F. Ao se ligar a E7, pRb é degradada liberando E2F, a qual estimulará a transcrição de genes alvos associados a replicação do DNA, resultando na proliferação celular desordenada (ZUR HAUSEN, 2002; MOTOYAMA et al., 2004). Em adição a desestabilização de pRb, a proteína E7 também altera o controle do ciclo celular através de interações com histona-desacetilases, ciclinas e inibidores de quinase dependente de ciclina (forma complexos com ciclinas A e E, bem como provoca inativação de p21 e p27) contribuindo assim para o processo de imortalização celular (MOODY; LAIMINS, 2010). Além disso, a proteína E7

também diminui a expressão de E-caderina, o que é desfavorável para a ativação do sistema imune, visto que E-caderina estimula a migração de células de Langerhans para o epitélio cervical. Acredita-se que a capacidade reduzida das células de Langerhans se infiltrarem na área infectada pelo vírus ajudaria na persistência do vírus no hospedeiro (LAURSON et al., 2010).

A proteína viral E6 completa o papel de E7, prevenindo a apoptose em resposta à entrada não programada na fase S induzida por E7. A associação da proteína E6 dos tipos de HPV de alto risco, com a proteína p53 da célula hospedeira resulta na degradação da p53, comprometendo a interrupção do crescimento celular e a ativação da apoptose induzida por erros no DNA genômico. A perda do controle do ciclo celular mediado por p53 favorece a instabilidade cromossômica e acúmulo de mutações na célula infectada (DOORBAR; CUBIE, 2005). E6 também ativa a enzima telomerase, uma enzima importante para replicar as sequências de DNA nas extremidades dos cromossomos (telomêros) cooperando para o processo de imortalização celular, além de se ligar e degradar proteínas contendo o domínio PDZ (proteínas envolvidas no processo de sinalização celular e adesão célula-célula; algumas proteínas PDZ apresentam funções supressoras de tumor) contribuindo para a tumorigênese (THOMAS et al., 2002; HEBNER; LAIMINS, 2006; MOODY; LAIMINS, 2010).

Além disso, as proteínas E6 e E7 induzem numerosos defeitos mitóticos, incluindo mitoses multipolares, pontes de anáfase e aneuploidia, contribuindo para a instabilidade cromossômica e imortalização, além de estimularem a expressão das citocinas que modulam a proliferação celular contribuindo para a evasão imune (MOODY; LAIMINS, 2010).

A proteína E5 de HPV de alto risco contribui com E6 e E7 na promoção da hiperproliferação de células infectadas levando a possível progressão ao câncer (DIMAIO; MATTOON, 2001). No entanto, a função de E5 parece estar restrita aos estágios iniciais da carcinogênese cervical, pois o gene E5 é frequentemente deletado quando o genoma do HPV é integrado durante a progressão maligna (PAOLINI et al., 2017).

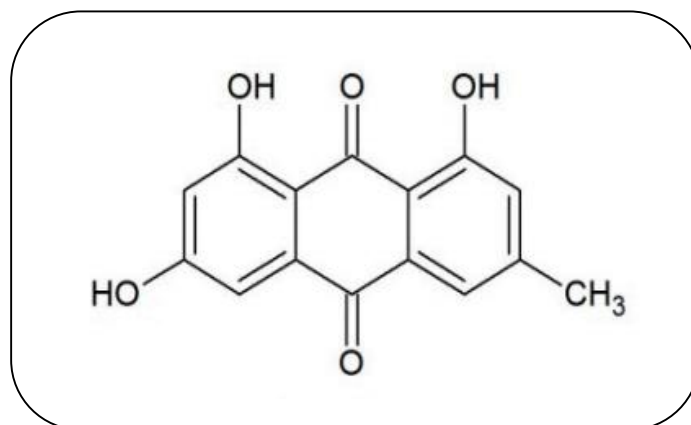
Sabe-se então que a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira pode alterar a expressão gênica viral levando ao câncer (MADKAN et al., 2007). Os estudos estão direcionados na compreensão da interação entre a célula hospedeira e o HPV mostrando como a pesquisa básica pode contribuir para o tratamento e prevenção do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 2002).

1.3. Emodina

Os produtos naturais são utilizados pelos seres humanos para tratar doenças há milhares de anos e compreendem um grupo de substâncias que são produzidos por organismos marinhos, bactérias, fungos e / ou plantas (GABAY et al., 2017; IKEDA, 2017). No câncer desempenham um papel fundamental na busca de novas drogas, uma vez que a maioria dos fármacos utilizados atualmente na clínica contra o câncer são extraídos de plantas e microrganismos (MANN, 2002; COSTA et al., 2008).

A emodina (1,3,8-tri-hidroxi-6-metilantraquinona) (Figura 5) é um produto natural, de cor amarelo-laranja, pertencente a classe das antraquinonas, presente em tradicionais ervas medicinais chinesas, especialmente em raízes e rizomas de plantas das famílias *Rhizoma e Radix*, como *Rheum officinale* e *Polygonam cuspidatum* conhecidas popularmente como ruibarbo chinês e bambu mexicano, respectivamente (WANG et al., 2012; PENG et al., 2013; LI et al., 2016). A emodina também está presente em outros gêneros de plantas como *Cassia*, *Aloe* e *Rhamnus* (SAITO et al., 2012), além de ser produzida como um metabólito secundário por algumas espécies de fungos (NADUMANE et al., 2013).

Figura 5: Estrutura química da emodina (C₁₅H₁₀O₅)



Fonte: (MEIER et al., 2017).

A emodina é utilizada na medicina tradicional há muito tempo como um componente ativo de vários laxantes à base de plantas (WU et al., 2018). Nos últimos anos, diversos efeitos biológicos já foram relatados para este composto, tais como anti-inflamatório, antibacteriano, diurético, antiviral e imunossupressor (SRINIVAS et al., 2007; HUANG et al., 2008; LI et al.,

2013; LIU et al., 2015). A emodina também tem se mostrado um potente antitumoral (LI et al., 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a citotoxicidade da emodina frente a diversos tipos de câncer, tais como câncer de pulmão (LEE, 2001; LAI et al., 2009), leucemia mielóide crônica (CHUN-GUANG et al., 2010), câncer de fígado (HSU et al., 2010) e câncer de próstata (CHA et al., 2005). Além disso, a emodina induz morte celular por apoptose por meio de um aumento da condensação nuclear e fragmentação do DNA em células de câncer cervical (SRINIVAS et al., 2003) e de fígado (WANG;GU; WU, 2007), ativação das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose em células de câncer cervical (YAOXIAN et al., 2013), parada de ciclo celular em células de câncer de fígado (SHIEH et al., 2004; ZHANG et al., 2015), aumento dos níveis de EROs em células de câncer de pulmão (SU et al., 2005), diminuição do nível de NF- κ B em células de carcinoma de células escamosas de pele (HUANG;SHEN; ONG, 2004) e câncer de esôfago (YANG et al., 2004), inibição das vias PI3K/AKT em células de câncer cervical (OLSEN;BJORLING-POULSEN; GUERRA, 2007) e via PKC em células de câncer de pulmão (LEE, 2001). Ainda, emodina demonstrou ação antitumoral sobre células de câncer de colo uterino positivas para HPV (HeLa, CasKi e SiHa) (SRINIVAS et al., 2003; YAOXIAN et al., 2013; THACKER; KARUNAGARAN, 2015).

Entretanto, apesar dos diversos efeitos biológicos, seu uso é limitado devido a sua toxicidade. Estudos recentes indicam que a emodina pode provocar hepatotoxicidade, toxicidade renal, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva se utilizada em altas doses e por longos períodos (CHEN, C. et al., 2018; DONG et al., 2018; WU et al., 2018). Felizmente, a emodina demonstrou ser excitada por luz em comprimentos de onda que variam de 390-500 nm, com pico de excitação em 465 nm, e produz efeito fototóxico em eritrócitos humanos *in vitro* quando estimulada por luz visível, essencialmente na presença de oxigênio. Este comportamento pode ser explicado pela formação de oxigênio singleto e seus subprodutos estáveis que induzem morte celular via dano oxidativo (VARGAS et al., 2002). A emodina também induziu dano fototóxico *in vitro* em células V79 de pulmão de hamster após irradiação com luz UVA e UVB o que indica pode ser utilizada como fotossensibilizador (FS) na terapia fotodinâmica (KERSTEN et al., 1999).

1.4. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) vem se mostrando uma alternativa interessante aos tratamentos atuais contra diversos tipos de câncer, tais como câncer do trato digestivo, esôfago,

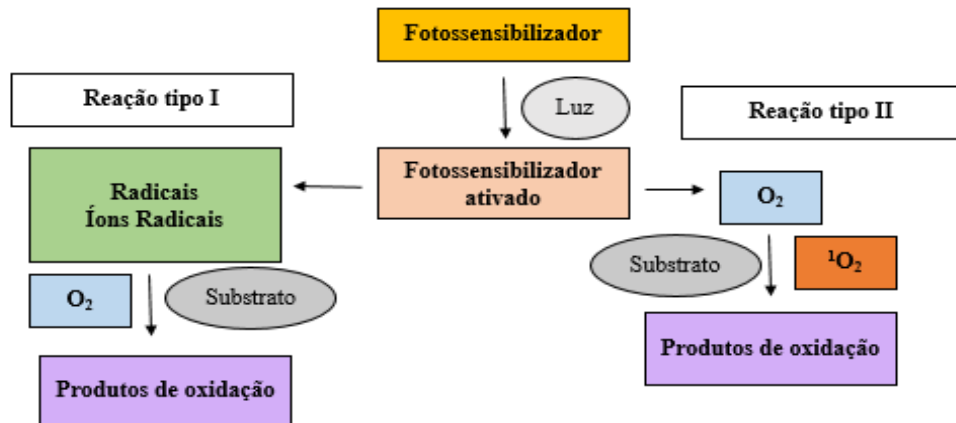
cabeça e pescoço, pulmão, colo de útero, carcinoma basocelular, entre outros (MROZ et al., 2011; CALIXTO et al., 2016). Essa técnica se baseia na administração de um composto sensível à luz, conhecido como fotossensibilizador (FS), com posterior exposição a uma fonte de luz de comprimento de onda específico que leva à morte da célula alvo via dano oxidativo (CALIXTO et al., 2016).

O FS se acumula em uma célula ou tecido alvo, preferencialmente no tecido tumoral, visto que estas células, por se dividirem mais rapidamente, apresentam aumento na expressão de receptores de lipoproteínas LDL, que agem como um “transportador” do FS para os tecidos cancerígenos (KWIATKOWSKI et al., 2018). Após ativação pela luz, o FS transfere energia para o oxigênio molecular e gera espécies reativas de oxigênio (EROs). Devido à meia-vida curta e alta reatividade das EROs, somente as células que estão próximas à área da produção de EROs (áreas em que o fotossensibilizador estão localizadas) são diretamente afetadas pela TFD. Portanto as respostas biológicas ao fotossensibilizador são ativadas apenas nas áreas específicas do tecido que foram expostas à luz, evitando efeitos sistêmicos de toxicidade (DOLMANS;FUKUMURA; JAIN, 2003).

Assim sendo, três fatores atuam concomitantemente na TFD: o fotossensibilizador (que é aplicado topicamente ou é administrado sistemicamente), a fonte de luz e o oxigênio molecular. Isoladamente, nem o FS nem a fonte de luz devem ter a capacidade de produzir efeitos prejudiciais ao tecido (WACHOWSKA;MUCHOWICZ; DEMKOW, 2015).

Quando o FS é excitado em um comprimento de onda específico, este pode desencadear reações fotoquímicas que se processam por dois mecanismos básicos (tipo I e tipo II) (Figura 6): na reação tipo I o FS no estado ativado (estado tripleto) reage diretamente com biomoléculas, gerando radicais livres tais como íon superóxido, radical hidroxila ou peróxido de hidrogênio. Estas espécies reativas de oxigênio (EROs) são responsáveis pelos danos oxidativos das proteínas, lipídeos e outras moléculas intracelulares, provocando a morte celular. Na reação do tipo II o FS no estado ativado (estado tripleto) transfere energia diretamente para o oxigênio molecular, levando a geração de oxigênio singlete altamente reativo e citotóxico (DEBELE;PENG; TSAI, 2015; WACHOWSKA;MUCHOWICZ; DEMKOW, 2015; WACHOWSKA;MUCHOWICZ; GOLAB, 2015). Ambas reações ocorrem simultaneamente e a razão desses processos vai depender do FS utilizado, das concentrações de oxigênio e substrato e da afinidade de ligação do FS ao substrato (DOLMANS;FUKUMURA; JAIN, 2003). Entretanto, o mecanismo do tipo II é o processo mais importante que condiciona a eficiência da TFD (KWIATKOWSKI et al., 2018).

Figura 6: Reações tipo I e tipo II na terapia fotodinâmica. Após a absorção de luz o fotossensibilizador passa a seu estado excitado, podendo sofrer dois tipos de reação: pode reagir diretamente com um substrato oxidável (por exemplo, a membrana plasmática) ou com uma molécula, transferindo um átomo de hidrogênio para formar radicais, os quais reagem com o oxigênio para formar produtos oxigenados (reação tipo I). De forma alternativa, o fotossensibilizador ativado por transferir sua energia diretamente ao oxigênio para formar oxigênio singleto, que oxida vários substratos (reação tipo II).



Fonte: Modificado de (DOLMANS;FUKUMURA; JAIN, 2003).

A morte celular provocada pela TFD pode ocorrer diretamente através de mecanismos como apoptose, necrose e autofagia (BACELLAR et al., 2015). A ocorrência de diferentes tipos de morte celular vai depender da localização intracelular do FS, do protocolo e dosagem utilizados, do tipo celular e nível de oxigênio (CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017). O dano à mitocôndria pode levar à apoptose, à perda da integridade da membrana pode levar à necrose e danos ao lisossomo ou ao retículo endoplasmático podem levar à autofagia (KESSEL; OLEINICK, 2018). Além disso, as células que resistem à morte através dos efeitos fototóxicos diretos, ainda podem ser destruídas pela influência indireta da TFD nos vasos sanguíneos do tumor (KRAMMER, 2001). As EROs formadas durante a TFD provocam danos as células endoteliais vasculares, ativando processos de coagulação, agregação plaquetária e bloqueando os vasos sanguíneos devido a formação de trombos. A hipóxia resultante da oclusão vascular leva a morte celular (KWIATKOWSKI et al., 2018).

A TFD vem se mostrando segura e eficaz para eliminar seletivamente células tumorais, evitando efeitos sistêmicos de toxicidade, que é o maior desafio dos tratamentos convencionais, onde o tecido saudável também é afetado (HONG;CHOI; SHIM, 2016). Sendo assim, a TFD apresenta vantagens claras em relação a outras modalidades de tratamento: não apresenta efeitos colaterais a longo prazo quando devidamente utilizada; é menos invasiva que métodos

cirúrgicos; procedimentos são realizados em ambulatorios; pode ser direcionada a um tecido alvo com muita precisão pois apresenta dupla seletividade, isto é, apenas a área irradiada recebe o FS e a luz ao mesmo tempo; pode ser repetida várias vezes num mesmo local e há pouca ou nenhuma cicatriz após a cura (CALIXTO et al., 2016). Entretanto, como toda terapia apresenta algumas limitações, sendo a mais importante delas que a TFD não deve ser utilizada em doença avançada (metástase), porque a irradiação de todo o corpo com doses apropriadas de luz não é possível com as tecnologias atuais, embora possa melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência do paciente (BROWN; BROWN; WALKER, 2004). Portanto, a terapia fotodinâmica é um tratamento antitumoral indicado para neoplasias em estágios iniciais e tratamento paliativo de pacientes em estágio avançado (RODRIGUEZ et al., 2016).

Vários estudos envolvendo a TFD e lesões precursoras, bem como o câncer cervical positivo para HPV vêm sendo realizados e demonstram que essa terapia não provoca danos ao tecido cervical normal e não está associada à incompetência cervical característica dos procedimentos cirúrgicos padrão utilizados em pacientes com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (TRUSHINA et al., 2008; SOERGEL et al., 2010; HILLEMANN et al., 2015).

Sendo assim, a associação de emodina e TFD poderia diminuir a concentração de emodina necessária para os efeitos antitumorais, evitando efeitos sistêmicos de toxicidade causados pelos tratamentos convencionais.

ATF2 (activating transcription factor 2) a subfamily member of activator protein-1 (AP-1) was another gene that had its expression increased in SiHa cells after emodin-PDT treatment. *ATF2* exhibits both oncogenic and tumor-suppressor functions and regulates the transcription of various genes, including genes associated with cell growth, cell cycle, maintenance and physiological homeostasis, as well stress and DNA damage response (66). Agents causing DNA damage and other types of cellular stress as ultraviolet (UV) light promote increased expression of *ATF2*. Paclitaxel and adriamycin, chemotherapeutic drugs widely used in hepatocellular carcinoma therapy increase expression of *ATF2* in human hepatoma cells in response to cellular stress (67).

In summary, our results demonstrated the potential anticancer activity of emodin-PDT relies on different cellular and molecular mechanisms, including induction of apoptosis and autophagy through the generation of ROS, and differential expression of genes related to apoptosis, autophagy, oxidative stress, cell cycle, inhibition of angiogenesis, migration, invasion and metastasis formation. In conclusion, this study points out the importance of the photodynamic therapy mediated by emodin as a potential treatment of cervical cancer.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of the Brazilian agencies CAPES and FAPESP. Also, they would like to thank the DMC Equipamentos LTDA (São Carlos, Brazil) for developing the LED system used in this study.

REFERENCES

1. Komarova NL, Boland CR. Cancer: calculated treatment. *Nature*. 2013 Jul 18;499(7458):291-2. PubMed PMID: 23868257. Pubmed Central PMCID: 3831845.
2. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet*. 2019 Jan 12;393(10167):169-82. PubMed PMID: 30638582.

3. Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutation research Reviews in mutation research*. 2017 Apr - Jun;772:23-35. PubMed PMID: 28528687.
4. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(11):2006-11. PubMed PMID: 17768080.
5. Small W, Jr., Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017 Jul 1;123(13):2404-12. PubMed PMID: 28464289.
6. Yaoxian W, Hui Y, Yunyan Z, Yanqin L, Xin G, Xiaoke W. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer cell international*. 2013 Jul 16;13(1):71. PubMed PMID: 23866157. Pubmed Central PMCID: 3722080.
7. de Matos RPA, Calmon MF, Amantino CF, Villa LL, Primo FL, Tedesco AC, et al. Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines. *BioMed research international*. 2018;2018:4057959. PubMed PMID: 29581972. Pubmed Central PMCID: 5822824.
8. Ahn TG, Jung JM, Lee EJ, Choi JH. Effects of cisplatin on photosensitizer-mediated photodynamic therapy in breast tumor-bearing nude mice. *Obstetrics & gynecology science*. 2019 Mar;62(2):112-9. PubMed PMID: 30918879. Pubmed Central PMCID: 6422844.
9. Calcabrini C, Catanzaro E, Bishayee A, Turrini E, Fimognari C. Marine Sponge Natural Products with Anticancer Potential: An Updated Review. *Marine drugs*. 2017 Oct 13;15(10). PubMed PMID: 29027954. Pubmed Central PMCID: 5666418.
10. Greenwell M, Rahman PK. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*. 2015 Oct 1;6(10):4103-12. PubMed PMID: 26594645. Pubmed Central PMCID: 4650206.
11. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature reviews Cancer*. 2002 Feb;2(2):143-8. PubMed PMID: 12635177.
12. Costa PM, Ferreira PM, Bolzani Vda S, Furlan M, de Freitas Formenton Macedo Dos Santos VA, Corsino J, et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2008 Jun;22(4):854-63. PubMed PMID: 18296021.
13. Li X, Wang H, Wang J, Chen Y, Yin X, Shi G, et al. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells through ROS elevation and MRP1 downregulation. *BMC cancer*. 2016 Aug 2;16:578. PubMed PMID: 27485374. Pubmed Central PMCID: 4971704.
14. Saito ST, Silva G, Pungartnik C, Brendel M. Study of DNA-emodin interaction by FTIR and UV-vis spectroscopy. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2012 Jun 4;111:59-63. PubMed PMID: 22513096.

15. Lee HZ, Hsu SL, Liu MC, Wu CH. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *European journal of pharmacology*. 2001 Nov 23;431(3):287-95. PubMed PMID: 11730720.
16. Lai JM, Chang JT, Wen CL, Hsu SL. Emodin induces a reactive oxygen species-dependent and ATM-p53-Bax mediated cytotoxicity in lung cancer cells. *European journal of pharmacology*. 2009 Nov 25;623(1-3):1-9. PubMed PMID: 19744477.
17. Srinivas G, Anto RJ, Srinivas P, Vidhyalakshmi S, Senan VP, Karunakaran D. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *European journal of pharmacology*. 2003 Jul 25;473(2-3):117-25. PubMed PMID: 12892828.
18. Thacker PC, Karunakaran D. Curcumin and emodin down-regulate TGF-beta signaling pathway in human cervical cancer cells. *PloS one*. 2015;10(3):e0120045. PubMed PMID: 25786122. Pubmed Central PMCID: 4365016.
19. Vargas F, Fraile G, Velasquez M, Correia H, Fonseca G, Marin M, et al. Studies on the photostability and phototoxicity of aloe-emodin, emodin and rhein. *Die Pharmazie*. 2002 Jun;57(6):399-404. PubMed PMID: 12116877.
20. Mroz P, Hashmi JT, Huang YY, Lange N, Hamblin MR. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert review of clinical immunology*. 2011 Jan;7(1):75-91. PubMed PMID: 21162652. Pubmed Central PMCID: 3060712.
21. Hong EJ, Choi DG, Shim MS. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2016 Jul;6(4):297-307. PubMed PMID: 27471670. Pubmed Central PMCID: 4951583.
22. Calixto G, Bernegossi J, Fonseca-Santos B, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:3719-35. PubMed PMID: 25143724. Pubmed Central PMCID: 4134022.
23. Wachowska M, Muchowicz A, Golab J. Targeting Epigenetic Processes in Photodynamic Therapy-Induced Anticancer Immunity. *Frontiers in oncology*. 2015;5:176. PubMed PMID: 26284197. Pubmed Central PMCID: 4519687.
24. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular biology*. 2011;731:237-45. PubMed PMID: 21516412.
25. Zhu S, Wu F, Wang K, Zheng Y, Li Z, Zhang X, et al. Photocytotoxicity, cellular uptake and subcellular localization of amidinophenylporphyrins as potential photodynamic therapeutic agents: An in vitro cell study. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2015 Oct 15;25(20):4513-7. PubMed PMID: 26338364.
26. Su J, Yan Y, Qu J, Xue X, Liu Z, Cai H. Emodin induces apoptosis of lung cancer cells through ER stress and the TRIB3/NF-kappaB pathway. *Oncology reports*. 2017 Mar;37(3):1565-72. PubMed PMID: 28184934.

27. Dong X, Ni B, Fu J, Yin X, You L, Leng X, et al. Emodin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepaRG cells via the mitochondrial caspasedependent pathway. *Oncology reports*. 2018 Oct;40(4):1985-93. PubMed PMID: 30106438. Pubmed Central PMCID: 6111625.
28. Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X, Lin L, et al. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytotherapy research : PTR*. 2016 Aug;30(8):1207-18. PubMed PMID: 27188216.
29. Xie MJ, Ma YH, Miao L, Wang Y, Wang HZ, Xing YY, et al. Emodin-provoked oxidative stress induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through a p53-mitochondrial apoptotic pathway. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(13):5201-5. PubMed PMID: 25040975.
30. Huang PH, Huang CY, Chen MC, Lee YT, Yue CH, Wang HY, et al. Emodin and Aloe-Emodin Suppress Breast Cancer Cell Proliferation through ER alpha Inhibition. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013;2013:376123. PubMed PMID: 23864887. Pubmed Central PMCID: 3707228.
31. Sui JQ, Xie KP, Zou W, Xie MJ. Emodin inhibits breast cancer cell proliferation through the ERalpha-MAPK/Akt-cyclin D1/Bcl-2 signaling pathway. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15(15):6247-51. PubMed PMID: 25124606.
32. Zhuo Z, Song Z, Ma Z, Zhang Y, Xu G, Chen G. Chlorophyllin e6mediated photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human bladder cancer cells. *Oncology reports*. 2019 Feb 14. PubMed PMID: 30816498.
33. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science*. 2009 Mar;24(2):259-68. PubMed PMID: 18247081.
34. Teng ZH, Zhou SY, Ran YH, Liu XY, Yang RT, Yang X, et al. Cellular absorption of anthraquinones emodin and chrysophanol in human intestinal Caco-2 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2007 Jul;71(7):1636-43. PubMed PMID: 17617731.
35. Balint S, Rao S, Sanchez MM, Huntosova V, Miskovsky P, Petrov D. Diffusion and cellular uptake of drugs in live cells studied with surface-enhanced Raman scattering probes. *Journal of biomedical optics*. 2010 Mar-Apr;15(2):027005. PubMed PMID: 20459279.
36. Lin HD, Li KT, Duan QQ, Chen Q, Tian S, Chu ESM, et al. The effect of aloe-emodin-induced photodynamic activity on the apoptosis of human gastric cancer cells: A pilot study. *Oncology letters*. 2017 May;13(5):3431-6. PubMed PMID: 28521449. Pubmed Central PMCID: 5431202.
37. Chen Q, Tian S, Zhu J, Li KT, Yu TH, Yu LH, et al. Exploring a Novel Target Treatment on Breast Cancer: Aloe-emodin Mediated Photodynamic Therapy Induced Cell Apoptosis and Inhibited Cell Metastasis. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2016;16(6):763-70. PubMed PMID: 26295333.

38. Lee HZ, Yang WH, Hour MJ, Wu CY, Peng WH, Bao BY, et al. Photodynamic activity of aloe-emodin induces resensitization of lung cancer cells to anoikis. *European journal of pharmacology*. 2010 Dec 1;648(1-3):50-8. PubMed PMID: 20840846.
39. Tu P, Huang Q, Ou Y, Du X, Li K, Tao Y, et al. Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG63 through the ROS/JNK signaling pathway. *Oncology reports*. 2016 Jun;35(6):3209-15. PubMed PMID: 27035222. Pubmed Central PMCID: 4872276.
40. Zhu B, Li S, Yu L, Hu W, Sheng D, Hou J, et al. Inhibition of Autophagy with Chloroquine Enhanced Sinoporphyrin Sodium Mediated Photodynamic Therapy-induced Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. *International journal of biological sciences*. 2019;15(1):12-23. PubMed PMID: 30662343. Pubmed Central PMCID: 6329935.
41. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*. 2015 Feb 21;14:48. PubMed PMID: 25743109. Pubmed Central PMCID: 4343053.
42. Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry Biokhimiia*. 2005 Feb;70(2):231-9. PubMed PMID: 15807663.
43. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *Journal of cellular physiology*. 2017 Nov;232(11):2977-84. PubMed PMID: 28067409.
44. Shi Y, Zhang B, Feng X, Qu F, Wang S, Wu L, et al. Apoptosis and autophagy induced by DVDMs-PDT on human esophageal cancer Eca-109 cells. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2018 Dec;24:198-205. PubMed PMID: 30268863.
45. Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2017 Nov;22(11):1321-35. PubMed PMID: 28936716.
46. Zhou Z, Song J, Nie L, Chen X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chemical Society reviews*. 2016 Nov 21;45(23):6597-626. PubMed PMID: 27722328. Pubmed Central PMCID: 5118097.
47. Lossi L, Castagna C, Merighi A. Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. *International journal of molecular sciences*. 2018 Dec 12;19(12). PubMed PMID: 30545052. Pubmed Central PMCID: 6321612.
48. Savitskaya MA, Onishchenko GE. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry Biokhimiia*. 2015 Nov;80(11):1393-405. PubMed PMID: 26615431.
49. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2005 Feb;25(3):1025-40. PubMed PMID: 15657430. Pubmed Central PMCID: 543994.
50. Huang Q, Ou YS, Tao Y, Yin H, Tu PH. Apoptosis and autophagy induced by pyropheophorbide-alpha methyl ester-mediated photodynamic therapy in human osteosarcoma

MG-63 cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2016 Jun;21(6):749-60. PubMed PMID: 27108344. Pubmed Central PMCID: 4853452.

51. Hsin MC, Hsieh YH, Wang PH, Ko JL, Hsin IL, Yang SF. Hispolon suppresses metastasis via autophagic degradation of cathepsin S in cervical cancer cells. *Cell death & disease*. 2017 Oct 5;8(10):e3089. PubMed PMID: 28981104. Pubmed Central PMCID: 5680581.

52. Gautam J, Banskota S, Lee H, Lee YJ, Jeon YH, Kim JA, et al. Down-regulation of cathepsin S and matrix metalloproteinase-9 via Src, a non-receptor tyrosine kinase, suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis. *Experimental & molecular medicine*. 2018 Sep 5;50(9):118. PubMed PMID: 30185799. Pubmed Central PMCID: 6123788.

53. Wang X, Xiong L, Yu G, Li D, Peng T, Luo D, et al. Cathepsin S silencing induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *American journal of translational research*. 2015;7(1):100-10. PubMed PMID: 25755832. Pubmed Central PMCID: 4346527.

54. Zhang L, Wang H, Xu J, Zhu J, Ding K. Inhibition of cathepsin S induces autophagy and apoptosis in human glioblastoma cell lines through ROS-mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and JNK signaling pathways. *Toxicology letters*. 2014 Aug 4;228(3):248-59. PubMed PMID: 24875536.

55. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2015 Aug;29(4):557-68. PubMed PMID: 26303083.

56. Ranhotra HS. Estrogen-related receptor alpha and cancer: axis of evil. *Journal of receptor and signal transduction research*. 2015;35(6):505-8. PubMed PMID: 26446880.

57. Marlow LA, Bok I, Smallridge RC, Copland JA. RhoB upregulation leads to either apoptosis or cytotaxis through differential target selection. *Endocrine-related cancer*. 2015 Oct;22(5):777-92. PubMed PMID: 26206775. Pubmed Central PMCID: 4559850.

58. Wei LJ, Li JA, Bai DM, Song Y. miR-223-RhoB signaling pathway regulates the proliferation and apoptosis of colon adenocarcinoma. *Chemico-biological interactions*. 2018 Jun 1;289:9-14. PubMed PMID: 29660302.

59. Ansari SS, Akgun N, Berger MR. Erufosine increases RhoB expression in oral squamous carcinoma cells independent of its tumor suppressive mode of action - a short report. *Cellular oncology*. 2017 Feb;40(1):89-96. PubMed PMID: 27812856.

60. Matthew EM, Yang Z, Peri S, Andrade M, Dunbrack R, Ross E, et al. Plk2 Loss Commonly Occurs in Colorectal Carcinomas but not Adenomas: Relationship to mTOR Signaling. *Neoplasia*. 2018 Mar;20(3):244-55. PubMed PMID: 29448085. Pubmed Central PMCID: 5849802.

61. Winkles JA, Alberts GF. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene*. 2005 Jan 10;24(2):260-6. PubMed PMID: 15640841.

62. Munson MJ, Ganley IG. MTOR, PIK3C3, and autophagy: Signaling the beginning from the end. *Autophagy*. 2015;11(12):2375-6. PubMed PMID: 26565689. Pubmed Central PMCID: 4835211.
63. Ghosh AK, Mau T, O'Brien M, Yung R. Novel role of autophagy-associated Pik3c3 gene in gonadal white adipose tissue browning in aged C57/B16 male mice. *Aging*. 2018 Apr 25;10(4):764-74. PubMed PMID: 29695642. Pubmed Central PMCID: 5940123.
64. Ronan B, Flamand O, Vescovi L, Dureuil C, Durand L, Fassy F, et al. A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nature chemical biology*. 2014 Dec;10(12):1013-9. PubMed PMID: 25326666.
65. Willinger T, Flavell RA. Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 May 29;109(22):8670-5. PubMed PMID: 22592798. Pubmed Central PMCID: 3365213.
66. Liu S, Wang F, Liu J, Jin P, Wang X, Yang L, et al. ATF2 partly mediated the expressions of proliferative factors and inhibited pro-inflammatory factors' secretion in arsenite-treated human uroepithelial cells. *Toxicology research*. 2017 Jul 1;6(4):468-76. PubMed PMID: 30090515. Pubmed Central PMCID: 6062379.
67. Li Q, Gao WQ, Dai WY, Yu C, Zhu RY, Jin J. ATF2 translation is induced under chemotherapeutic drug-mediated cellular stress via an IRES-dependent mechanism in human hepatic cancer Bel7402 cells. *Oncology letters*. 2016 Dec;12(6):4795-802. PubMed PMID: 28105187. Pubmed Central PMCID: 5228440.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

- Emodina é citotóxica em relação as linhagens SiHa, CaSki e HaCaT apenas em concentrações maiores que 30 $\mu\text{mol/L}$, e a citotoxicidade é concentração e tempo dependente.
- Emodina é eficientemente internalizada pelas três linhagens celulares.
- A terapia fotodinâmica mediada por emodina reduz significativamente a viabilidade celular nas três linhagens celulares.
- A terapia fotodinâmica mediada por emodina induz a geração de espécies reativas de oxigênio, o que provavelmente ocasionou a morte celular por apoptose (através da ativação de caspase-3) nas células tumorais e autofagia nas três linhagens celulares.
- A terapia fotodinâmica mediada por emodina induz a expressão diferencial de genes relacionados à apoptose, autofagia, estresse oxidativo, ciclo celular, inibição da angiogênese, migração, invasão e formação de metástases em células SiHa.

Dessa forma, podemos concluir que a emodina gera resposta fotodinâmica satisfatória em linhagens celulares de carcinoma cervical positivas para HPV de alto risco (SiHa e CaSki), demonstrando seu potencial para atuar como fotossensibilizador em um sistema de terapia fotodinâmica.