



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	Milimetro
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 carcinogênese.....	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

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).

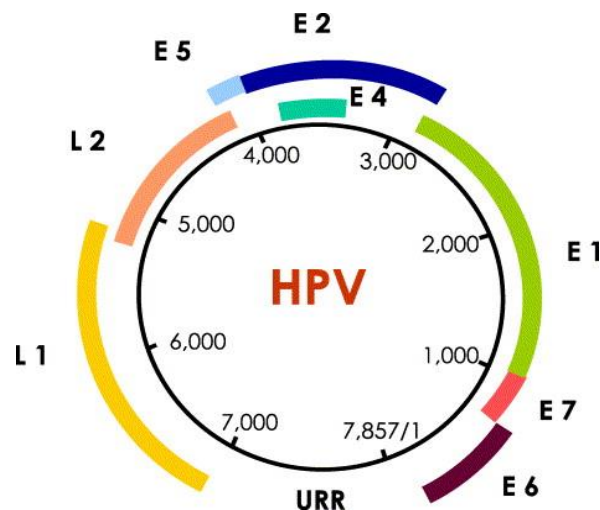
O tratamento habitual do câncer cervical é a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, no entanto, o tipo de tratamento dependerá de fatores como estadiamento da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais tais como idade e desejo de ter filhos (INCA, 2019). Para pacientes com câncer cervical em estágio 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).

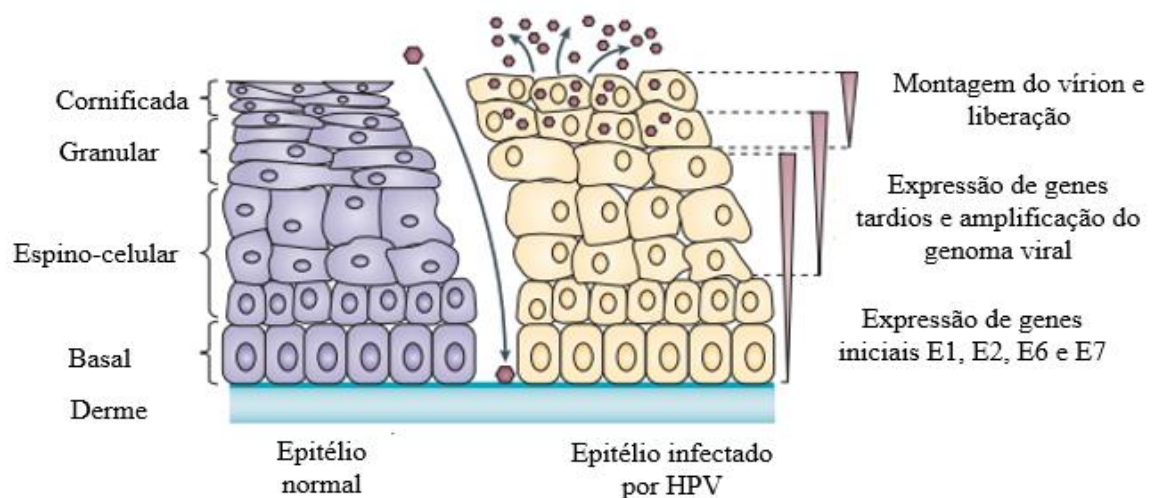
A região não codificadora denominada LCR ou URR está localizada entre os genes L1 e o início da região precoce e possui aproximadamente 1.000 pb (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; PSYRRI; DIMAIO, 2008). Esta região não tem qualquer função codificadora proteica, mas contém os elementos promotores, locais de 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).

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).

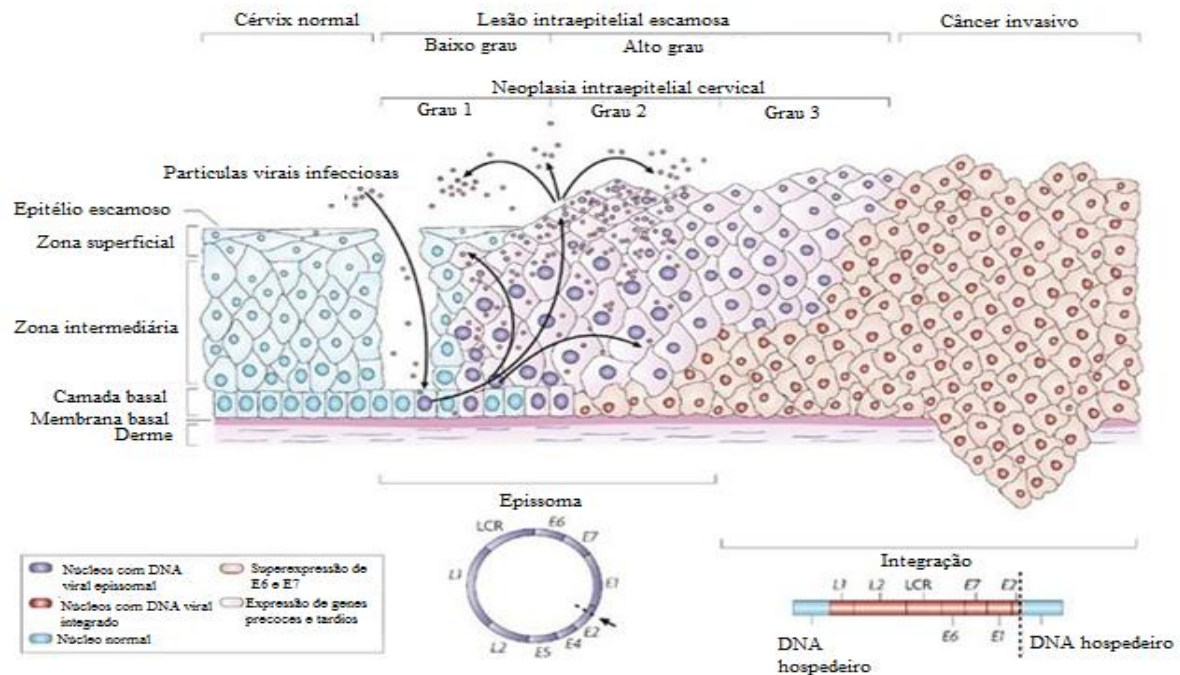
Após a internalização, ocorre a etapa de desnudamento do capsídeo e o genoma viral segue em direção ao núcleo, onde o HPV é identificado em partículas virais

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).

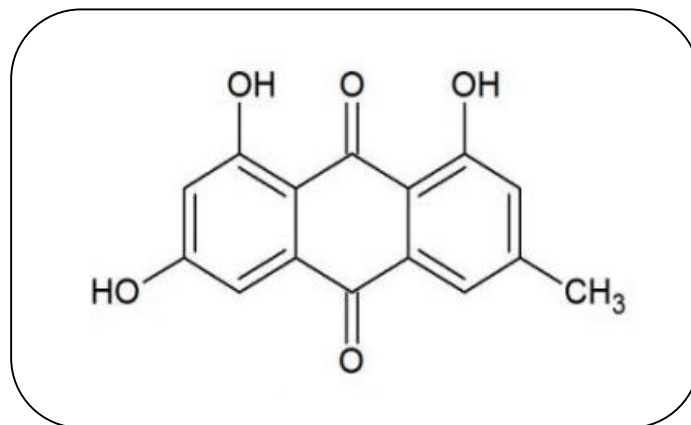
Sabe-se então que a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira pode alterar a expressão gênica viral levando ao câncer (MADKAN et al., 2007). Os estudos estão direcionados na compreensão da interação entre a célula hospedeira e o HPV mostrando como a pesquisa básica pode contribuir para o tratamento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

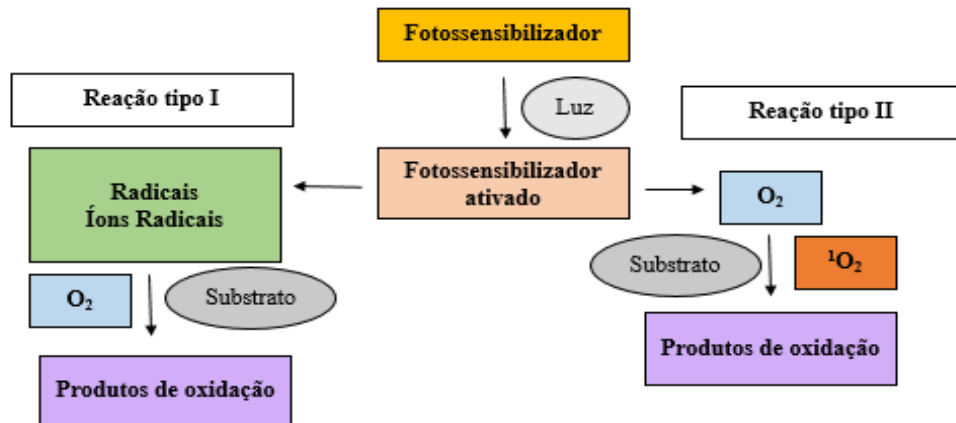
cabeça e pescoço, pulmão, colo de útero, carcinoma basocelular, entre outros (MROZ et al., 2011; CALIXTO et al., 2016). Essa técnica se baseia na administração de um composto sensível à luz, conhecido como fotossensibilizador (FS), com posterior exposição a uma fonte de luz de comprimento de onda específico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

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar a eficácia da TFD utilizando emodina como fotossensibilizador em células de carcinoma cervical infectadas por HPV-16 (SiHa), HPV-16/18 (CaSki) e queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), por meio de experimentos *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade da emodina nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT;
- Determinar a captação intracelular de emodina nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT;
- Avaliar se a TFD utilizando emodina como fotossensibilizador induz fototoxicidade nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT;
- Avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT após o tratamento com TFD utilizando emodina como fotossensibilizador;
- Avaliar quantitativamente sinais intracelulares de ativação da apoptose, verificando os níveis de caspases efetoras de apoptose (caspase-3), nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT tratadas com TFD utilizando emodina como fotossensibilizador;
- Avaliar se a TFD utilizando emodina como fotossensibilizador induz autofagia nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT;
- Analisar a expressão de genes alvo de drogas anti-câncer na linhagem SiHa, após o tratamento com TFD utilizando emodina como fotossensibilizador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação da solução estoque de emodina em DMSO

A solução estoque de emodina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparada solubilizando o composto em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração final de 12 mmol/L. As soluções de trabalho foram obtidas por diluição, em diferentes concentrações (0,47 à 120 $\mu\text{mol/L}$) no meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.2. Fonte de radiação

A fonte de radiação utilizada foi um aparelho de LED de alta potência, modelo Vet Light da DMC Enterprise (São Carlos, São Paulo, Brasil), operando a 447 (± 10) nm, com 420 mW de potência a 23 mm e 2,52W de potência total, para 209W / cm^2 de irradiância e 80J / cm^2 de fluência.

3.3. Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram: SiHa (linhagem de carcinoma cervical infectada por HPV-16; ATCC® HTB35™), CaSki (linhagem de carcinoma cervical infectada por HPV-16/18 ATCC® CRM-CRL-1550) e HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados; CLS 300493).

Estas linhagens foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA) suplementado com 100U de penicilina por mL, 100 μg de estreptomicina por mL, 1% (v/v) e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas, SP, BR). As células foram cultivadas em frascos de cultura, mantidas a 5% de CO_2 e a temperatura de 37 °C. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido até que a monocamada celular estivesse confluenta. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) e tripsinizadas com aproximadamente 2 mL de tripsina (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, USA). Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio acrescido de 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular obtida em uma garrafa foi transferida para outras garrafas, procedimento este que foi repetido até obter quantidade de células suficientes para os experimentos.

3.4. Ensaio de viabilidade celular nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT

Para determinar a citotoxicidade da emodina foi utilizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), um ensaio colorimétrico onde desidrogenases mitocondriais de células com metabolismo ativo (viáveis) clivam os anéis de tetrazólio, resultando na produção de cristais de formazana de cor púrpura que são insolúveis em soluções aquosas, mas são dissolvidos em solventes orgânicos como o DMSO com uma absorbância máxima próxima a 570 nm. Células mortas perdem a capacidade de converter o sal de MTT em cristais de formazana, e assim a formação da cor serve como um marcador útil e conveniente apenas das células viáveis (RISS et al., 2004).

Para este ensaio, 10^4 células de linhagens SiHa, CaSki e HaCaT foram plaqueadas em placas de 96 poços e foram incubadas a 37°C na estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. As células foram então tratadas com diferentes concentrações de emodina (variando de 0,47 a 120 µmol/L). O ensaio foi realizado em três diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) após incubação com emodina. Após estes períodos, o meio contendo emodina foi aspirado e foi adicionado 100 µL/poço de MTT (1mg/mL) diluído em meio DMEM e a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C na estufa com 5% de CO₂. Após esse tempo, o MTT foi aspirado e foi adicionados 100 µL de DMSO em cada poço da placa. A placa foi então colocada em agitação por 5 minutos a 200 rpm. Em seguida, foi realizada a leitura da placa em leitor de placas em comprimento de ondas de 570 nm (Fluostar Omega Labtech, Ortenberg, Alemanha). O DMSO à 1% foi utilizado como controle de veículo (afim de atestar que o solvente não altera a viabilidade celular) e células tratadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo.

O ensaio foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

Os valores obtidos foram normalizados com o controle negativo, células que foram submetidas às mesmas condições do ensaio, porém sem a adição de emodina, e expressos em valor de porcentagem de viabilidade calculados de acordo com a seguinte relação:

$$\text{Células viáveis} = (\text{D.O. amostra} / \text{D.O. controle negativo}) \times 100\%$$

3.5. Microscopia de fluorescência para análise de captação de emodina nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT

Para analisar a captação intracelular de emodina, as linhagens SiHa, CaSki e HaCaT foram plaqueadas em placas de petri de 100 mm a uma densidade de 3×10^5 células, permitindo o crescimento a níveis subconfluentes. Após a adesão, as células foram incubadas com emodina na concentração de 30 $\mu\text{mol/L}$ (concentração selecionada previamente por meio do ensaio de MTT). Após 15 min., 30 min., 1, 3, 6, 24 e 48 horas da incubação as células foram visualizadas sem fixação em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Vert. A1) em canal para FITC (espectro de excitação 495 nm). Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo.

3.6. Ensaio de fototoxicidade

Os efeitos da terapia fotodinâmica foram avaliados nas linhagens SiHa, CaSki e HaCaT, incubadas com emodina, como agente fotossensibilizante. As células foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células em placas de 96 poços durante 24 horas. Após este período, as células foram incubadas por 1 hora com emodina (tempo selecionado no ensaio de captação intracelular) na concentração de 30 $\mu\text{mol/L}$ (selecionada pelo ensaio de MTT); após a incubação o meio contendo a droga foi retirado e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS, em seguida foi adicionado 150 μL /poço de meio sem soro fetal bovino e sem vermelho de fenol. Em seguida as células foram submetidas à irradiação de laser na dose de $80\text{J}/\text{cm}^2$ por 4 minutos. Ao término da irradiação, o meio foi removido e foi adicionado meio de cultura sem vermelho de fenol e com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas foi realizado o ensaio de viabilidade celular MTT para a avaliação da viabilidade celular.

Para efeito de comparação e para determinar se as reduções nas taxas de viabilidade celular foram em decorrência do dano fotooxidativo, foram realizados tratamentos somente com emodina (grupo emodina), somente com laser (grupo laser) e células sem fotossensibilizador e sem luz, tratadas apenas com DMEM (controle negativo).

Os valores obtidos foram normalizados com o controle negativo, ou seja, células que foram tratadas apenas com meio de cultura, e expressos em valor de porcentagem e viabilidade.

O ensaio foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

3.7. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A detecção de espécies reativas de oxigênio foi realizada utilizando 2', 7'- diacetato de diclorofluorescina (DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) uma sonda não fluorescente permeável às células, que é desesterificada intracelularmente e transforma-se em 2', 7'-diclorofluoresceína altamente fluorescente após oxidação.

Para este ensaio, as células SiHa, CaSki e HaCaT foram plaqueadas em placas pretas de 96 poços de fundo transparente, próprias para leitura de fluorescência, a uma concentração de 2×10^4 cél/poço e foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o grupo emodina-TFD foi incubado com emodina (30 µmol/L) por 1 hora e após esse período, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e 150 µL de DMEM fresco sem vermelho de fenol foi adicionado a cada poço e irradiado com laser na dose de 80J/cm² por 4 minutos. Ao término da irradiação, o meio foi removido e foi adicionado meio de cultura sem vermelho de fenol e com 10% de soro fetal bovino. Os controles foram: grupo emodina (células tratadas com emodina mas não expostas à luz); grupo laser (células sem fotossensibilizador mas irradiadas com laser na dose de 80J/cm² por 4 minutos); controle negativo (células sem fotossensibilizador e sem luz) e controle positivo (peróxido de hidrogênio: 200 µmol/L para as células HaCaT e 1000 µmol/L para as células SiHa e CaSki) por 4 horas. Após os tratamentos, o meio foi substituído por DMEM sem vermelho de fenol contendo DCFDA (25 µmol/L) e incubado por 45 minutos a 37 ° C. A formação de EROs foi determinada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 nm e 535 nm, respectivamente.

O ensaio foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

3.8. Ensaio de apoptose por meio da detecção da atividade enzimática da Caspase-3

Para este ensaio foi utilizado o kit de detecção colorimétrico *Caspase-3 Assay kit* (ab39401, Abcam, Cambridge, MA, USA) um método simples e eficiente para avaliar a atividade de caspases que reconhecem a sequência DEVD. O ensaio se baseia na formação do cromóforo p-nitroanilina (p-NA) por clivagem do substrato marcado DEVD-pNA. O p-NA pode ser quantificado usando um espectrofotômetro ou um leitor de placa de microtitulação com absorvância de leitura a 400 ou 405 nm.

As linhagens SiHa, CaSki e HaCaT foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^5 cél./poço em placas de 6 poços e foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram incubadas com emodina (30 µmol/L) por 1 hora e após esse período, o meio foi removido,

as células foram lavadas com PBS e 1 mL de DMEM fresco sem vermelho de fenol foi adicionado a cada poço e irradiado com laser na dose de $80\text{J}/\text{cm}^2$ por 4 minutos (grupo emodina-TFD). Ao término da irradiação, o meio foi removido e foi adicionado meio de cultura sem vermelho de fenol e com 10% de soro fetal bovino.

A ativação de caspase-3 em células SiHa, CaSki e HaCaT também foi avaliada após o tratamento somente com emodina ($30\ \mu\text{mol}/\text{L}$) por 1 hora, mas não expostas à luz (grupo emodina) e somente com laser (células sem fotossensibilizador mas irradiadas com laser na dose de $80\text{J}/\text{cm}^2$ por 4 minutos). Células tratadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. As células foram coletadas e ressuspensas em $50\ \mu\text{L}$ de tampão de lise 30 minutos após a irradiação. O tempo após a incubação foi determinado por um ensaio de MTT realizado após 15 min., 30 min., 1 hora e 3 horas. Foi escolhido o período em que foi possível observar aproximadamente 50% de viabilidade celular. Após incubação durante 10 minutos em gelo, o lisado celular foi centrifugado a 10000 rpm durante 1 min. a 25 e a concentração de proteínas nos sobrenadantes foi medida utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 / 2000c (Thermo Fisher Scientific). A normalização da concentração das proteínas foi realizada utilizando uma solução tamponante de diluição. Em seguida, conforme instruções do fabricante, foram adicionados $25\ \mu\text{L}$ de tampão de reação (contendo $0,25\ \mu\text{L}$ DTT) e $2,5\ \mu\text{L}$ de substrato DEVD-p-NA e $25\ \mu\text{L}$ de cada amostra. Após incubação por 2 horas, a atividade da caspase-3 foi determinada medindo a absorbância a 400 nm.

O controle com células sem tratamento foi utilizado para cálculo de porcentagem da atividade de caspase-3. O ensaio foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

3.9. Ensaio de autofagia

A avaliação de autofagia foi realizada utilizando o kit *Autophagy Assay* (MAK138, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), um procedimento simples e direto para medir a autofagia em uma variedade de tipos celulares utilizando um marcador de autofagossomo fluorescente.

Para este ensaio as células SiHa, CaSki e HaCaT foram cultivados em placas pretas de 96 poços com fundo transparente a uma densidade de 2×10^4 células/poço por 24 horas. Após 24 horas, o grupo emodina-TFD foi incubado com emodina ($30\ \mu\text{mol}/\text{L}$) por 1 hora e após esse período, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e $150\ \mu\text{L}$ de DMEM fresco sem vermelho de fenol foi adicionado a cada poço e irradiado com laser na dose de $80\text{J}/\text{cm}^2$ por 4 minutos. Ao término da irradiação, o meio foi removido e foi adicionado meio de cultura sem

vermelho de fenol e com 10% de soro fetal bovino. Os controles foram: grupo emodina; grupo laser; controle negativo e controle positivo (Tricostatina A (TSA): 40 $\mu\text{mol/L}$ para SiHa e 20 $\mu\text{mol/L}$ para CaSki e HaCaT por 24 horas). Terminado os tratamentos, o meio foi removido e foi adicionado 100 μL de reagente de detecção de autofagossomo. As placas foram incubadas durante 1 hora a 37 °C com 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram lavadas com 100 μL de tampão de lavagem três vezes. A formação de autofagossomo foi determinada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 nm e 520 nm, respectivamente.

O controle com células sem tratamento foi utilizado para cálculo de porcentagem das células em autofagia. O ensaio foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes para análise estatística.

3.10. Isolamento de RNA e síntese de cDNA

Para este ensaio as células SiHa foram tratadas com emodina (30 $\mu\text{mol/L}$) por 1 hora e após esse período, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e 1 mL de DMEM fresco sem vermelho de fenol foi adicionado a cada poço e irradiado com laser na dose de 80J/cm² por 4 minutos. Ao término da irradiação, o meio foi removido e foi adicionado meio de cultura sem vermelho de fenol e com 10% de soro fetal bovino. 3 horas após a irradiação as células aderentes foram coletadas e o RNA total foi extraído utilizando o mini kit RNeasy de acordo com as instruções do fabricante. Também foi extraído RNA total das linhagens SiHa sem tratamento algum, que foi utilizada como amostra controle na análise de expressão gênica por Real Time PCR. Após esta etapa, os RNAs totais (2 μg) foram utilizados para síntese de DNA complementar (cDNA) usando first-strand cDNA synthesis kit para RT-PCR (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha)

3.11. PCR array

A qPCR foi realizada utilizando o kit Cancer Drug Targets RT Profiler PCR array (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha) contendo primers para análise de expressão de 84 genes. Para este ensaio, o cDNA amplificado foi diluído com água isenta de nuclease e foi adicionado ao RT2 qPCR SYBR green Master Mix (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha). O coquetel experimental (25 μL) foi adicionado a cada poço da matriz Human Cancer Drug Targets RT Profiler PCR array (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha).

A PCR em tempo real foi realizada no sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems, EUA). A ciclagem térmica recomendada pelo fabricante foi utilizada (desnaturação inicial de 10 minutos em 95 ° C, seguido de 40 ciclos: 15 s em 95 ° C, com 1 min de amplificação em 60 ° C). Todos os dados da PCR foram coletadas e a expressão diferencial dos genes entre os dois grupos de células SiHa (tratados e não tratados) foi analisada pelo Qiagen Web (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>).

3.12. Análises Estatísticas

Para comparar os valores das variáveis contínuas entre os grupos foram utilizados testes de Análise de Variância (ANOVA). O pós-teste de Tukey foi usado para a identificação do grupo significativamente diferente. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

REFERÊNCIAS:

ANACKER, D. C.; MOODY, C. A. Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. **Virus Res**, v. 231, p. 41-49, Mar 2 2017. ISSN 1872-7492 (Electronic)

0168-1702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27836727> >.

ARBYN, M. et al. Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? **J Pathol**, v. 234, n. 4, p. 431-435, Dec 2014. ISSN 1096-9896 (Electronic)

0022-3417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124771> >.

BACELLAR, I. O. et al. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 9, p. 20523-20559, Aug 31 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334268> >.

BARRA, F. et al. New prophylactics human papilloma virus (HPV) vaccines against cervical cancer. **J Obstet Gynaecol**, v. 39, n. 1, p. 1-10, Jan 2019. ISSN 1364-6893 (Electronic)

0144-3615 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30370796> >.

BASTO, D. L. et al. Genetic diversity of human papillomavirus types 35, 45 and 58 in cervical cancer in Brazil. **Arch Virol**, v. 162, n. 9, p. 2855-2860, Sep 2017. ISSN 1432-8798 (Electronic)

0304-8608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28597068> >.

BOULET, G. et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 11, p. 2006-2011, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17768080> >.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018. ISSN 1542-4863 (Electronic)

0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593> >.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol**, v. 5, n. 8, p. 497-508, Aug 2004. ISSN 1470-2045 (Print)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288239> >.

BURD, E. M.; DEAN, C. L. Human Papillomavirus. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 4, Aug 2016. ISSN 2165-0497 (Electronic)

2165-0497 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27726787> >.

BZHALAVA, D.; EKLUND, C.; DILLNER, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, v. 476, p. 341-344, Feb 2015. ISSN 1096-0341 (Electronic)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25577151> >.

CALIXTO, G. M. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, Mar 11 2016. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26978341> >.

CHA, T. L. et al. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. **Cancer Res**, v. 65, n. 6, p. 2287-2295, Mar 15 2005. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781642> >.

CHELIMO, C. et al. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. **J Infect**, v. 66, n. 3, p. 207-217, Mar 2013. ISSN 1532-2742 (Electronic)

0163-4453 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103285> >.

CHEN, C. et al. NMR-based Metabolomic Techniques Identify the Toxicity of Emodin in HepG2 Cells. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 9379, Jun 20 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29925852> >.

CHEN, Z. et al. Distribution of human papillomavirus genotypes and its relationship to clinicopathology in invasive cervical carcinoma in Zhejiang Province, China. **J Cancer Res Ther**, v. 14, n. 4, p. 780-784, 2018. ISSN 1998-4138 (Electronic)

1998-4138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29970652> >.

CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. **Chem Rec**, v. 17, n. 8, p. 775-802, Aug 2017. ISSN 1528-0691 (Electronic)

1528-0691 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28042681> >.

CHUN-GUANG, W. et al. Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo. **Eur J Pharmacol**, v. 627, n. 1-3, p. 33-41, Feb 10 2010. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857484> >.

COSTA, P. M. et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 4, p. 854-863, Jun 2008. ISSN 0887-2333 (Print)

0887-2333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296021> >.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 364-378, Oct 5 2014. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058905> >.

DAY, P. M.; SCHELHAAS, M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. **Curr Opin Virol**, v. 4, p. 24-31, Feb 2014. ISSN 1879-6265 (Electronic)

1879-6257 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525291> >.

DE OLIVEIRA, C. M.; FREGNANI, J.; VILLA, L. L. HPV Vaccine: Updates and Highlights. **Acta Cytol**, v. 63, n. 2, p. 159-168, 2019. ISSN 1938-2650 (Electronic)

0001-5547 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30870844> >.

DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 2-10, Oct 2013. ISSN 1096-0341 (Electronic)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683837> >.

DEBELE, T. A.; PENG, S.; TSAI, H. C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 9, p. 22094-22136, Sep 14 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389879> >.

DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7866-7873, Nov 26 2001. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753669> >.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, May 2003. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724736> >.

DONG, X. et al. Emodin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepaRG cells via the mitochondrial caspasedependent pathway. **Oncol Rep**, v. 40, n. 4, p. 1985-1993, Oct 2018. ISSN 1791-2431 (Electronic)

1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30106438> >.

DOORBAR, J.; CUBIE, H. Molecular basis for advances in cervical screening. **Mol Diagn**, v. 9, n. 3, p. 129-142, 2005. ISSN 1084-8592 (Print)

1084-8592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271014> >.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Rev Med Virol**, v. 25 Suppl 1, p. 2-23, Mar 2015. ISSN 1099-1654 (Electronic)

1052-9276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25752814> >.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F55-70, Nov 20 2012. ISSN 1873-2518 (Electronic)

0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199966> >.

GABAY, M. et al. White Paper on Natural Products. **Pharmacotherapy**, v. 37, n. 1, p. e1-e15, Jan 2017. ISSN 1875-9114 (Electronic)

0277-0008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27943330> >.

GALANI, E.; CHRISTODOULOU, C. Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 11, p. 977-981, Nov 2009. ISSN 1469-0691 (Electronic)

1198-743X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874381> >.

GHEIT, T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. **Front Oncol**, v. 9, p. 355, 2019. ISSN 2234-943X (Print)

2234-943X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31134154> >.

HARDEN, M. E.; MUNGER, K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 772, p. 3-12, Apr - Jun 2017. ISSN 1388-2139 (Electronic)

1383-5742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28528688> >.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**, v. 16, n. 2, p. 83-97, Mar-Apr 2006. ISSN 1052-9276 (Print)

1052-9276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287204> >.

HILLEMANN, P. et al. A randomized study of hexaminolevulinate photodynamic therapy in patients with cervical intraepithelial neoplasia 1/2. **Am J Obstet Gynecol**, v. 212, n. 4, p. 465 e461-467, Apr 2015. ISSN 1097-6868 (Electronic)

0002-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467012> >.

HONG, E. J.; CHOI, D. G.; SHIM, M. S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. **Acta Pharm Sin B**, v. 6, n. 4, p. 297-307, Jul 2016. ISSN 2211-3835 (Print)

2211-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471670> >.

HORVATH, C. A. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology**, v. 7, p. 11, Jan 20 2010. ISSN 1743-422X (Electronic)

1743-422X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089191> >.

HSU, C. M. et al. Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 392, n. 4, p. 473-478, Feb 19 2010. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895793> >.

HUANG, Q.; SHEN, H. M.; ONG, C. N. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 2, p. 361-371, Jul 15 2004. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194008> >.

HUANG, X. Z. et al. Emodin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in prostate cancer cells: the mechanisms involve ROS-mediated suppression of multidrug resistance and hypoxia inducible factor-1. **Cancer Biol Ther**, v. 7, n. 3, p. 468-475, Mar 2008. ISSN 1555-8576 (Electronic)

1538-4047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285700> >.

IKEDA, H. Natural products discovery from micro-organisms in the post-genome era. **Bioscience Biotechnol Biochem**, v. 81, n. 1, p. 13-22, Jan 2017. ISSN 1347-6947 (Electronic)

0916-8451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27885932> >.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 79-89, Feb 2007. ISSN 1873-5576 (Electronic)

1568-0096 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305480> >.

KERO, K.; RAUTAVA, J. HPV Infections in Heterosexual Couples: Mechanisms and Covariates of Virus Transmission. **Acta Cytol**, v. 63, n. 2, p. 143-147, 2019. ISSN 1938-2650 (Electronic)

0001-5547 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30799413> >.

KERSTEN, B. et al. The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. **Mutat Res**, v. 445, n. 1, p. 55-71, Sep 15 1999. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521691> >.

KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. **Photochem Photobiol**, v. 94, n. 2, p. 213-218, Mar 2018. ISSN 1751-1097 (Electronic)

0031-8655 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29143339> >.

KESSLER, T. A. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. **Semin Oncol Nurs**, v. 33, n. 2, p. 172-183, May 2017. ISSN 1878-3449 (Electronic)

0749-2081 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343836> >.

KRAMMER, B. Vascular effects of photodynamic therapy. **Anticancer Res**, v. 21, n. 6B, p. 4271-4277, Nov-Dec 2001. ISSN 0250-7005 (Print)

0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908681> >.

KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed Pharmacother**, v. 106, p. 1098-1107, Oct 2018. ISSN 1950-6007 (Electronic)

0753-3322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30119176> >.

LAI, J. M. et al. Emodin induces a reactive oxygen species-dependent and ATM-p53-Bax mediated cytotoxicity in lung cancer cells. **Eur J Pharmacol**, v. 623, n. 1-3, p. 1-9, Nov 25 2009. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744477> >.

LAURSON, J. et al. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 5, p. 918-926, May 2010. ISSN 1460-2180 (Electronic)

0143-3334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123756> >.

LEE, H. Z. Protein kinase C involvement in aloe-emodin- and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell. **Br J Pharmacol**, v. 134, n. 5, p. 1093-1103, Nov 2001. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682458> >.

LETO, M. et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 2, p. 306-317, Mar-Apr 2011. ISSN 1806-4841 (Electronic)

0365-0596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603814> >.

LI, X. et al. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells through ROS elevation and MRP1 downregulation. **BMC Cancer**, v. 16, p. 578, Aug 2 2016. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27485374> >.

LI, X. X. et al. Emodin as an effective agent in targeting cancer stem-like side population cells of gallbladder carcinoma. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 4, p. 554-566, Feb 15 2013. ISSN 1557-8534 (Electronic)

1547-3287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974371> >.

LI, Y.; XU, C. Human Papillomavirus-Related Cancers. **Adv Exp Med Biol**, v. 1018, p. 23-34, 2017. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29052130> >.

LIONTOS, M. et al. Systemic therapy in cervical cancer: 30 years in review. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 137, p. 9-17, May 2019. ISSN 1879-0461 (Electronic)

1040-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31014518> >.

LIU, Z. et al. Antiviral effect of emodin from *Rheum palmatum* against coxsackievirus B5 and human respiratory syncytial virus in vitro. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 35, n. 6, p. 916-922, Dec 2015. ISSN 1993-1352 (Electronic)

1672-0733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26670446> >.

MADKAN, V. K. et al. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. **Br J Dermatol**, v. 157, n. 2, p. 228-241, Aug 2007. ISSN 0007-0963 (Print)

0007-0963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553059> >.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143-148, Feb 2002. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12635177> >.

MEIER, N. et al. In-Silico UHPLC Method Optimization for Aglycones in the Herbal Laxatives *Aloe barbadensis* Mill., *Cassia angustifolia* Vahl Pods, *Rhamnus frangula* L. Bark, *Rhamnus purshianus* DC. Bark, and *Rheum palmatum* L. Roots. **Molecules**, v. 22, n. 11, Oct 27 2017. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29076992> >.

MOGHTADERI, A.; DOR, A. Immunization and Moral Hazard: The HPV Vaccine and Uptake of Cancer Screening. **Med Care Res Rev**, p. 1077558719847887, May 17 2019. ISSN 1552-6801 (Electronic)

1077-5587 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31096862> >.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-560, Aug 2010. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592731> >.

MOTOYAMA, S. et al. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. **Kobe J Med Sci**, v. 50, n. 1-2, p. 9-19, Jan 2004. ISSN 0023-2513 (Print)

0023-2513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342967> >.

MROZ, P. et al. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 7, n. 1, p. 75-91, Jan 2011. ISSN 1744-8409 (Electronic)

1744-666X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21162652> >.

MUNOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, Aug 31 2006. ISSN 0264-410X (Print)

0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949995> >.

MUSA, J. et al. Effect of cervical cancer education and provider recommendation for screening on screening rates: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0183924, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28873092> >.

NADUMANE, V. K. et al. A Novel Metabolite from *Aspergillus ochraceus* JGI 25 Showing Cytotoxicity to Hela Cells. **Indian J Pharm Sci**, v. 75, n. 5, p. 507-514, Sep 2013. ISSN 0250-474X (Print)

0250-474X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403650> >.

NOWINSKA, K. et al. The role of human papillomavirus in oncogenic transformation and its contribution to the etiology of precancerous lesions and cancer of the larynx: A review. **Adv Clin Exp Med**, v. 26, n. 3, p. 539-547, May-Jun 2017. ISSN 1899-5276 (Print)

1899-5276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28791831> >.

OLSEN, B. B.; BJORLING-POULSEN, M.; GUERRA, B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 227-237, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018259> >.

PAOLINI, F. et al. HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target of immunotherapy. **Hum Vaccin Immunother**, v. 13, n. 2, p. 291-297, Feb 2017. ISSN 2164-554X (Electronic)

2164-5515 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27929754> >.

PARFENOV, M. et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 43, p. 15544-15549, Oct 28 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313082> >.

PENG, W. et al. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: a review. **J Ethnopharmacol**, v. 148, n. 3, p. 729-745, Jul 30 2013. ISSN 1872-7573 (Electronic)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707210> >.

PETT, M.; COLEMAN, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? **J Pathol**, v. 212, n. 4, p. 356-367, Aug 2007. ISSN 0022-3417 (Print)

0022-3417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573670> >.

PRATI, B.; MARANGONI, B.; BOCCARDO, E. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 73, n. suppl 1, p. e539s, Sep 6 2018. ISSN 1980-5322 (Electronic)

1807-5932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30208168> >.

PSYRRI, A.; DIMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 5, n. 1, p. 24-31, Jan 2008. ISSN 1743-4262 (Electronic)

1743-4254 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097454> >.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM G. S. et al. (Ed.). **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD), 2004.

RODRIGUEZ, M. E. et al. Heat shock proteins in the context of photodynamic therapy: autophagy, apoptosis and immunogenic cell death. **Photochem Photobiol Sci**, v. 15, n. 9, p. 1090-1102, Aug 31 2016. ISSN 1474-9092 (Electronic)

1474-905X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471925> >.

ROSA, M. I. et al. [Human papillomavirus and cervical neoplasia]. **Cad Saude Publica**, v. 25, n. 5, p. 953-964, May 2009. ISSN 1678-4464 (Electronic)

0102-311X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19488480> >.

RYNDOCK, E. J.; MEYERS, C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 12, n. 10, p. 1165-1170, Oct 2014. ISSN 1744-8336 (Electronic)

1478-7210 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199987> >.

SABEENA, S. et al. Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 43, n. 3, p. 429-435, Mar 2017. ISSN 1447-0756 (Electronic)

1341-8076 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28165175> >.

SAITO, S. T. et al. Study of DNA-emodin interaction by FTIR and UV-vis spectroscopy. **J Photochem Photobiol B**, v. 111, p. 59-63, Jun 4 2012. ISSN 1873-2682 (Electronic)

1011-1344 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513096> >.

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecol Oncol**, v. 118, n. 1 Suppl, p. S12-17, Jun 2010. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494219> >.

SEGOVIA-MENDOZA, M. et al. Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study. **BMC Cancer**, v. 15, p. 21, Jan 27 2015. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25622528> >.

SHANMUGASUNDARAM, S.; YOU, J. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 9, n. 8, Aug 18 2017. ISSN 1999-4915 (Electronic)

1999-4915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28820433> >.

SHIEH, D. E. et al. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. **Life Sci**, v. 74, n. 18, p. 2279-2290, Mar 19 2004. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987952> >.

SO, K. A. et al. Human papillomavirus genotype-specific risk in cervical carcinogenesis. **J Gynecol Oncol**, Feb 11 2019. ISSN 2005-0399 (Electronic)

2005-0380 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31074234> >.

SOERGEL, P. et al. Effects of photodynamic therapy using topical applied hexylaminolevulinate and methylaminolevulinate upon the integrity of cervical epithelium. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 9, p. 624-630, Nov 2010. ISSN 1096-9101 (Electronic)

0196-8092 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976802> >.

SRINIVAS, G. et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. **Eur J Pharmacol**, v. 473, n. 2-3, p. 117-125, Jul 25 2003. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892828> >.

SRINIVAS, G. et al. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. **Med Res Rev**, v. 27, n. 5, p. 591-608, Sep 2007. ISSN 0198-6325 (Print)

0198-6325 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17019678> >.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecol Oncol**, v. 109, n. 2 Suppl, p. S15-21, May 2008. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474288> >.

_____. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecol Oncol**, v. 117, n. 2 Suppl, p. S5-10, May 2010. ISSN 1095-6859 (Electronic)

0090-8258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304221> >.

SU, Y. T. et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 2, p. 229-241, Jul 15 2005. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941563> >.

THACKER, P. C.; KARUNAGARAN, D. Curcumin and emodin down-regulate TGF-beta signaling pathway in human cervical cancer cells. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120045, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25786122> >.

THOMAS, M. et al. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. **Oncogene**, v. 21, n. 33, p. 5088-5096, Aug 1 2002. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140759> >.

TRUSHINA, O. I. et al. Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 5, n. 4, p. 256-259, Dec 2008. ISSN 1873-1597 (Electronic)

1572-1000 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356666> >.

TSIKOURAS, P. et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. **J BUON**, v. 21, n. 2, p. 320-325, Mar-Apr 2016. ISSN 1107-0625 (Print)

1107-0625 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27273940> >.

TUMBAN, E. et al. Preclinical refinements of a broadly protective VLP-based HPV vaccine targeting the minor capsid protein, L2. **Vaccine**, v. 33, n. 29, p. 3346-3353, Jun 26 2015. ISSN 1873-2518 (Electronic)

0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003490> >.

TUNGTEAKKHUN, S. S.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. **Arch Virol**, v. 153, n. 3, p. 397-408, 2008. ISSN 0304-8608 (Print)

0304-8608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172569> >.

VARGAS, F. et al. Studies on the photostability and phototoxicity of aloe-emodin, emodin and rhein. **Pharmazie**, v. 57, n. 6, p. 399-404, Jun 2002. ISSN 0031-7144 (Print)

0031-7144 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116877> >.

WACHOWSKA, M.; MUCHOWICZ, A.; DEMKOW, U. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. **Cent Eur J Immunol**, v. 40, n. 4, p. 481-485, 2015. ISSN 1426-3912 (Print)

1426-3912 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862314> >.

WACHOWSKA, M.; MUCHOWICZ, A.; GOLAB, J. Targeting Epigenetic Processes in Photodynamic Therapy-Induced Anticancer Immunity. **Front Oncol**, v. 5, p. 176, 2015. ISSN 2234-943X (Print)

2234-943X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284197> >.

WANG, H. et al. Rheum officinale (a traditional Chinese medicine) for chronic kidney disease. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 7, p. CD008000, Jul 11 2012. ISSN 1469-493X (Electronic)

1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786510> >.

WANG, X. D.; GU, L. Q.; WU, J. Y. Apoptosis-inducing activity of new pyrazole emodin derivatives in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 6, p. 1113-1116, Jun 2007. ISSN 0918-6158 (Print)

0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17541163> >.

WOODMAN, C. B. et al. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. **Lancet**, v. 361, n. 9351, p. 40-43, Jan 4 2003. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517465> >.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, Jan 2007. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186016> >.

WU, L. et al. Emodin-induced hepatotoxicity was exacerbated by probenecid through inhibiting UGTs and MRP2. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 359, p. 91-101, Nov 15 2018. ISSN 1096-0333 (Electronic)

0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30248416> >.

YANG, J. et al. Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity in vitro and in vivo via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 12, p. 2027-2041, Dec 15 2004. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544921> >.

YAOXIAN, W. et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. **Cancer Cell Int**, v. 13, n. 1, p. 71, Jul 16 2013. ISSN 1475-2867 (Print)

1475-2867 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23866157> >.

ZHANG, X. et al. Inhibitory effect of emodin on human hepatoma cell line SMMC-7721 and its mechanism. **Afr Health Sci**, v. 15, n. 1, p. 97-100, Mar 2015. ISSN 1729-0503 (Electronic)

1680-6905 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834536> >.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, May 2002. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010> >.

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO**EFFECTS OF PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY EMODIN IN
CERVICAL CARCINOMA CELLS**

Ana Emília Brumatti Galiardi-Campoy¹, Francielly Cristina Machado¹, Paula Rahal¹, Marília
Freitas Calmon¹

¹ *Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), Department of Biology,
São Paulo State University (UNESP), Street Cristóvão Colombo, 2265, Zip/ Postal Code:
15054-010, São José do Rio Preto, SP, Brazil*

* Correspondence should be addressed to Marília Freitas Calmon. **E-mail address:**
macal131@gmail.com. **Phone:** +55 17 3221-2852, **Fax:** +55 17 3221-2390

ABSTRACT

Cervical cancer is a worldwide public health problem and the search of new and selective therapies and anticancer drugs is a major issue. Emodin has attracted extensive attention due to its anti-inflammatory, antineoplastic, and proapoptotic effect 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, due to its efficiency in the tumor cells death. So, the aim of this study was to analyze the effect of emodin associated with photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines. At first, the investigations demonstrated that emodin presented cytotoxicity in concentration and time-dependent manners in all cell lines analyzed and SiHa, CaSki and HaCaT cell lines presented more than 80% of cell viability in concentrations below than 30 $\mu\text{mol/L}$. Fluorescence microscopy images showed an efficient cellular uptake of emodin in all cell lines analyzed. A significant decrease of the cell viability was observed in SiHa, CaSki, and HaCaT cell lines after treatment with emodin associated with photodynamic therapy. This was accompanied by an increase of ROS production, caspase-3 activities and fluorescence intensity of autophagic vacuoles, suggesting cell death by apoptosis and autophagy probably due to the increase in ROS production. Additionally, 22 target genes of anti-cancer drugs were overexpressed and 2 target genes of anti-cancer drugs were downregulated in SiHa cells after treatment with photodynamic therapy mediated by emodin. These results suggest promising applications of emodin and photodynamic therapy in cervical cancer treatment.

Keywords: Apoptosis, autophagy, cervical cancer, emodin, gene expression, photodynamic therapy.

1. INTRODUCTION

Cancer is one of the most prevailing and fearful diseases in modern society, and its incidence tends to increase (1). Among the different types of cancer, cervical carcinoma is a serious health problem, being one of the most common gynecological malignancies, since it is the fourth most common cancer in women worldwide, with about 570.000 new cases in 2018 (2).

Cervical cancer is usually related to the 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 (3). About 99% of cases of cervical cancer contain high-risk HPV, with HPV-16 being the most prevalent type (4).

The usual treatment for cervical cancer consists of cisplatin based-chemotherapy, radiation and surgery, however, all have negative points (5). Surgical treatment is restricted to patients in the initial state and young patients who have lost fertility (6). Cisplatin based-chemotherapy and radiotherapy are not specific for cancer cells and often cause serious side effects, such as nephrotoxicity, neurotoxicity, hematological toxicity, chemoresistance, and off-target damage to normal tissues (7).

In order to overcome this issue, recent efforts are devoted to the search and development of new anticancer drugs and new therapeutic strategies to enhance chemotherapeutic efficacy and decrease these side effects (8, 9). Natural products have proved to be very useful in anticancer drug development over the last decades (10). In fact, most drugs currently used against cancer were discovered in plants and microorganisms (11). In this scenario, compounds isolated from natural sources play a fundamental role in the search for new natural anticancer drugs (12).

Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone) is a natural anthraquinone, present in traditional Chinese medicinal herbs, especially in roots and rhizomes of *Rhizoma* and *Radix* (13). Emodin is also present in other plant species such as *Cassia*, *Aloe*, and *Rhamnus* (14). Some properties as cytotoxicity (15, 16) and antitumor activity against cervical carcinoma cells positive for high-risk HPV have already been described (6, 17, 18). Additionally, emodin was found to exhibit fluorescence and generate singlet oxygen, which indicates that emodin has the potential to be a novel photosensitizer (PS) to the photodynamic therapy (PDT) (19).

Photodynamic therapy (PDT) appears as a new treatment option for different types of cancer, such as cervical cancer, head and neck cancer, lung cancer, digestive tract cancer (20). PDT is a minimally invasive treatment where eradicate target cells (such as cancerous cells)

while avoiding systemic toxicity and side effects on healthy tissues (21). The treatment is based on the administration of a light-sensitive compound known as a photosensitizer, with subsequent exposure to a specific wavelength light source leading to target cell death via oxidative damage (22). PDT action is dependent on three essential components: PS (can be applied topically or administered systemically), light (usually generated by laser sources), and molecular oxygen. The photosensitizer preferentially accumulates in the tumor tissue and is activated by local irradiation of the lesion with the light of appropriate wavelength able to activate the sensitizer, leading to cell death (23).

The potential to be a new PS and antitumor activity of emodin suggests that emodin-PDT may be applied as a new therapeutic modality for the treatment of cervical cancer. There are no studies in the literature relating emodin-PDT action in cervical carcinoma cells, which opens a new use for emodin. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of emodin-PDT in cervical carcinoma cell lines.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Emodin

Stock solutions of emodin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared in 100% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the concentration of 12 mmol/L. The working solutions were obtained by dilution, in different concentrations in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.2. Radiation Source

The radiation source used was a high potency LED apparatus, model Vet Light of DMC Enterprise (São Carlos, São Paulo, Brazil), operating at 447 (± 10) nm, with 420 mW of power at 23mm and 2.52W of total power, for 209W/cm² of irradiance and 80J/cm² of fluency.

2.3. Cell lines and culture

The cell lines used in this study were SiHa (cervical carcinoma infected with HPV16; ATCC® HTB35™), CaSki (cervical carcinoma infected with HPV16/HPV18; ATCC® CRM-CRL-1550) and HaCaT (spontaneously immortalized human keratinocytes; CLS 300493). All cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS;

Cultlab, Campinas, São Paulo, Brazil), 100U/mL penicillin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and 100mg/mL streptomycin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Cells were kept in 5% CO₂ atmosphere, 95% relative humidity and a constant temperature of 37 °C.

2.4. Cytotoxicity analysis by MTT assay

Cytotoxicity was assessed using the MTT assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a colorimetric assay based on assessing the cell metabolic activity (24). The SiHa, CaSki, and HaCaT cells were seeded into 96-well plates (1×10^4 cells/well) and incubated for 24 hours. The cells were then treated with different emodin concentrations (ranging from 0.47 to 120 $\mu\text{mol/L}$), during 24 hours. After these periods, the medium containing emodin was replaced with 100 μL of MTT (1 mg/mL) diluted in DMEM medium, and the plates were incubated for 30 minutes at 37 °C. Finally, the medium was removed and the formazan crystals were solubilized in 100 μL of DMSO. The absorbances were read using a plate reader (Fluostar Omega Labtech, Ortenberg, Germany) at a wavelength of 570 nm. The optimal concentration to perform the following experiments was the concentration resulting in above 80% cell viability. The experiment were performed in triplicate, and in three independent events.

2.5. Cellular Uptake of emodin

Emodin is naturally fluorescent in the visible spectrum. To analyze the intracellular uptake of emodin, SiHa, CaSki and HaCaT cells (3×10^5 /well) were plated in petri dishes of 100 mm allowing grow that sub confluent levels. Cells were incubated with emodin at 30 $\mu\text{mol/L}$ (selected concentrations from the MTT assay previously described in item 2.4) for SiHa, CaSki and HaCaT cells. After 15 min., 30 min., 1, 3,6, 24 and 48 hours of incubation, living cells were viewed and photographed using a fluorescence microscope (ZeissAxioVert.A1) with a FITC filter (excitation spectra: 495 nm). Untreated cells, without emodin, were used as a negative control.

2.6. Cell Phototoxicity

The effects of photodynamic therapy mediated by emodin in SiHa, CaSki, and HaCaT were studied. The cell lines were seeded into 96-well plates at 2×10^4 cells/well and allowed to grow overnight to reach a confluent stage. On the day of the experiment, the cells were incubated for 1 hour (selected from the cellular uptake assay) with emodin (30 $\mu\text{mol/L}$) (selected concentration from the MTT assay). After the incubation period, the culture medium

was removed, cells were washed with PBS, and 150 μ L of fresh DMEM without phenol red was added to each well. Irradiation with laser was performed at 80J/cm² for 4 minutes (group emodin-PDT). After irradiation, the medium without phenol red was replaced with culture medium containing 10% FBS, and cells were again incubated for 24 hours. Cell viability was measured after 24 hours by MTT assay. Controls were: cells treated with emodin but not exposed to light (emodin group); cells without photosensitizer and exposed to laser (laser group); and negative control (cells without photosensitizer and without laser, incubated only with DMEM). The experiment was performed in triplicate, and in three independent events.

2.7. *Detection of Reactive oxygen species (ROS)*

Reactive oxygen species were measured by 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a cell-permeable non-fluorescent probe and turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation. Briefly, SiHa, CaSki, and HaCaT (2×10^4 cells/well) were grown on 96-well black plates with transparent background for 24 h. After 24 h, group emodin-PDT were incubated and irradiated with the same conditions as item 2.6. Controls were: Emodin group (cells treated with emodin but not exposed to laser); Laser group (cells without photosensitizer and exposed to laser); Negative Control (cells without photosensitizer and exposed to laser) and positive control (hydrogen peroxide: 200 μ mol/L for the HaCaT cells and 1000 μ mol/L for the SiHa and CaSki cells) for 4 hours. After the treatments, the medium was replaced with DMEM without phenol red containing DCFDA (25 μ mol/L) and incubated for 45 min. at 37°C. The formation of ROS was determined at excitation and emission wavelengths of 485 nm and 535 nm, respectively. The experiment was performed in triplicate, and in three independent events.

2.8. *Quantification of caspase-3 activity*

Caspase-3 activities were measured using a Caspase-3 assay kit colorimetric (Abcam, Cambridge, MA, USA). Briefly, the protocol is based on the formation of the chromophore p-nitroaniline (p-NA) by cleavage from the labeled substrate DEVD-pNA. SiHa, CaSki, and HaCaT cells were plated in 6-well plates at 3×10^5 cells/well and allowed to grow overnight. Group emodin-PDT were incubated with emodin (30 μ mol/L) for 1 hour and after this period, the medium was removed, cells were washed with PBS, and 1 mL of fresh DMEM without phenol red was added to each well and irradiated in the same conditions as item 2.6. Controls were: cells treated with emodin (30 μ mol/L) for 1 hour but not exposed to laser (emodin group); cells without photosensitizer and exposed to laser (laser group) and negative control (cells

without photosensitizer and without laser, incubated only with DMEM). 30 minutes after irradiation, the cells were collected and resuspended in 50 μ L of lysis buffer. Following incubation for 10 min. on ice, cell lysate was centrifuged at 10000 rpm for 1 min. at 25°C, and the protein concentration in the supernatants was measured using the NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific). Then 25 μ L Reaction Buffer (containing 0,25 μ L DTT) and 2,5 μ L DEVD-p-NA substrate were added into 25 μ L of each sample. After 2 h of incubation, caspase activity was determined by measuring the absorbance at 400 nm. The experiment was performed in triplicate, and in three independent events.

2.9. Autophagy assay

Autophagy was measured by Autophagy Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Briefly, the protocol is based using a proprietary fluorescent autophagosome marker. SiHa, CaSki, and HaCaT (2×10^4 cells/well) were grown on 96-well black plates with transparent background for 24 h. After 24 h, group emodin-PDT were incubated and irradiated with the same previous conditions. Controls were: Emodin group; Laser group; Negative Control and Positive control (Trichostatin A (TSA): 40 μ mol/L for SiHa and 20 μ mol/L for CaSki and HaCaT for 24 hours). After the treatments, the medium was removed and 100 μ L Autophagosome Detection Reagent diluted in the Stain Buffer was added to the cells. The plates were incubated for 1 hour at 37°C with 5% CO₂. After incubation, the cells were washed with 100 μ L Wash Buffer three times. The formation of autophagosome was determined at excitation and emission wavelengths of 360 nm and 520 nm, respectively. The experiment was performed in triplicate, and in three independent events.

2.10. RNA Isolation, cDNA Synthesis, and Amplification Total

RNA from SiHa cells after three hours of treatment with emodin associated with photodynamic therapy and SiHa cells without treatment were isolated using the RNeasy mini kit following the manufacturer instructions (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). Total RNA (2 μ g) from each group of SiHa cells was reverse transcribed using the first-strand cDNA synthesis kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany), following the manufacturer's instructions.

2.11. PCR Arrays

The amplified cDNA was then diluted with nuclease-free water and was added to the RT2 qPCR SYBR green Master Mix (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). The experimental mixture (25 μ L) was added to each well of the Human Cancer Drug Targets RT Profiler PCR

array (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha). Real-time PCR was performed on the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) and was used for SYBR green detection using the following thermal profile: segment 1–1 cycle: 95°C for 10 minutes, segment 2–40 cycles: 95°C for 15 seconds followed by 60°C for one minute. The RT2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 (Qiagen, Hilden, NRW, Germany) (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) was used to analyze the differential expression of genes between the two groups of SiHa cells (treated and untreated).

2.12. Statistical analysis

To compare the values of the continuous variables among the groups, analyses of variance analysis (one-way ANOVA) were used. The post-test Tukey's was used for the identification of the significantly different group. The analyses were performed by GraphPad PRISM® Version 5.1 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The significance level adopted for the statistical analysis was 5%, that is, $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Effect of Emodin on Cell Viability

Emodin cytotoxicity was evaluated in concentrations ranging from 0.47 to 120 $\mu\text{mol/L}$ in SiHa, CaSki, and HaCaT cell lines after 24, 48 and 72 hours of emodin incubation. It was possible to observe an increase of cytotoxicity dependent to the increase of the concentration and time tested (concentration and time-response effects) in the three cell lines. At lower concentrations, the cell death percentages have little variation, showing a low cytotoxic effect of the substance in these concentrations (Figure 1). The results showed that there was no significant cytotoxicity in the dark conditions when the concentration of emodin was lower than 30 $\mu\text{mol/L}$. When SiHa, CaSki, and HaCaT cell lines were treated with emodin at 30 $\mu\text{mol/L}$, the cell viabilities were above 80% for all analyzed times. Therefore, we chose the 30 $\mu\text{mol/L}$ concentration of emodin to perform the experiments once a photosensitizer cannot present significant cytotoxicity in the dark.

3.2. Cellular Uptake of Emodin

The uptake of a photosensitizer by tumor cells is an essential factor for the effectiveness of the photodynamic therapy (25). The fluorescence microscopy images showed an efficient cellular uptake of emodin in all the cell lines analyzed, with preferential localization at

cytoplasm (Figure 2). SiHa, CaSki and HaCaT cells were able to internalize emodin after 15 minutes of incubation, with increased fluorescence after 30 minutes and 1 hour, remaining fluorescent until 48 hours after incubation.

The incubation time of 1 hour demonstrated high fluorescence intensity, suggesting a high intracellular concentration of emodin and for this reason it was selected for the cell phototoxicity assays.

3.3. Cell Phototoxicity

The phototoxicity of emodin with laser (emodin-PDT) in SiHa, CaSki and HaCaT cells was determined by MTT assay. It was possible to observe a significant decrease in cell viability after the treatment with emodin-PDT (Figure 3). The cellular viability decreased to 15,22% in SiHa cells, 15,90% in CaSki cells, and 10,27% in HaCaT cells 24 hours after incubation with emodin followed by irradiation. In addition, a significant difference was observed between the emodin and emodin-PDT groups, and laser and emodin-PDT groups, suggesting the photodynamic effect.

No significant decrease in cell viability was observed after incubation in the different cell lines with emodin only (emodin group), showing that the absence of irradiation does not cause cytotoxicity. There was also no significant decrease in cell viability in cells treated with laser alone (laser group).

3.4. Detection of Reactive oxygen species (ROS)

In order to determine whether emodin-PDT induces oxidative stress, the effects of emodin-PDT on ROS production was determined. It was possible to observe a significant increase of ROS production after the treatment with emodin-PDT in SiHa, CaSki and HaCaT cells compared to negative control ($p < 0.001$) (Figure 4). No significant increase in ROS production was observed after incubation of the SiHa, CaSki, and HaCaT with emodin only (emodin group) and laser only (laser group) compared to the negative control. It was also possible to observe a significant difference between the emodin and emodin-PDT groups, and laser and emodin-PDT groups in SiHa, CaSki and HaCaT cells ($p < 0.001$) suggesting that ROS production results from emodin photoactivation and was not influenced by emodin and laser only (Figure 4).

3.5. Quantification of caspase-3 activity

Caspase-3 activity in SiHa, CaSki and HaCaT cells was determined using a Caspase-3 assay kit. It was possible to observe an increase of caspase-3 activity after the treatment with emodin-PDT in all cell lines treated (Figure 5). SiHa and CaSki cells treated with emodin-PDT showed a significant increase (Figure 5 A and B) in caspase activity compared to the negative control (100%) ($p < 0.01$). However HaCaT cells treated with emodin-PDT did not present a significant increase in caspase activities in comparison with the negative control (100%) although this increase was evidenced (Figure 5 C). After treatment with emodin-PDT the caspase-3 activity increase to 146,73% in SiHa cells (Figure 5 A), 125,61% in CaSki cells (figure 5 B), and 123,89% in HaCaT cells (Figure 5 C) compared to the negative control (100%). These results indicated that the activation of caspase-3 and consequently apoptosis in tumor cells occurs within the first 30 minutes after of exposure to the emodin-PDT, and is higher in SiHa cells.

No significant increase in caspase-3 activity was observed after treatment with only emodin and only laser (emodin group and laser group) in cells SiHa, CasKi and HaCaT compared to the negative control, showing that apoptosis is not present in these cells in the absence of photosensitizer and irradiation.

3.6. Autophagy assay

To investigate whether the autophagy pathway is involved in the decrease of cell viability after treatment with emodin-PDT the autophagy assay was performed. Emodin-PDT treatment resulted in a significant increase in the percentage of cells in autophagy, similar to the positive control (TSA), suggesting that emodin-PDT induces autophagy in SiHa, CaSki and HaCaT cells. After treatment with emodin-PDT the autophagy increase to 179,08% in SiHa cells (Figure 6 A), 174,74% in CaSki cells (Figure 6 B), and 179,36% in HaCaT cells (Figure 6 C) compared to the negative control (100%).

No significant increase in autophagy was observed after treatment with only emodin and only laser (emodin group and laser group) in cells SiHa, CasKi and HaCaT compared to the negative control, suggesting that there is no induction of autophagy when cells are treated with emodin and laser only (Figure 6).

3.7. PCR Arrays

In order to determine possible target genes of anti-cancer drugs, the changes in the gene expression profile of the SiHa cells without treatment and after treatment with emodin-PDT

were analyzed by RT2 Profiler PCR arrays. A total of 22 genes were upregulated and 2 genes were downregulated by emodin-PDT after 3 h (Table 1). Emodin-PDT induced increase of expression of *ATF2*, *AURKA*, *AURKC*, *BIRC5*, *CDK1*, *CDK7*, *GSTP1*, *HDAC4*, *HIF1A*, *HSP90AA1*, *MDM4*, *MTOR*, *PARP4*, *PIK3C2A*, *PIK3C3*, *PIK3CA*, *PLK2*, *PLK4*, *RHOA*, *RHOB*, *TNKS*, *TOP2B* and decreased the expression of *CTSS* and *ESR1* (Table 1).

4. DISCUSSION

Emodin is an anthraquinone presents in the roots and barks of numerous plants and it is an active ingredient of various Chinese medicinal herbs including *Rheum*, *Polygonum*, *Aloe*, and *Cassia* (26-28) with important antitumor activity, including proapoptotic (29) and anti-proliferative effects (30, 31). Despite its antitumor efficacy, recent studies have reported that emodin causes hepatotoxicity and kidney toxicity if used in high doses and for long periods (27). Fortunately, emodin exhibits fluorescence and it can be used as a novel photosensitizer to the photodynamic therapy (19). However, the problem of toxicity of emodin can be solved through its with photodynamic therapy, a treatment that uses the characteristic of malignant cells have in selectively absorbing and retaining the photosensitizer, decreasing side effects of conventional treatments (32). Therefore, this study evaluated the mechanisms of emodin-PDT on cervical carcinoma cells.

At first, the investigations demonstrated that emodin is cytotoxic only in high concentrations, with no significant dark cytotoxicity when the concentration was lower than 30 $\mu\text{mol/L}$, which is an important characteristic once an ideal photosensitizer should not be toxic in the absence of light (33). We also showed that emodin was internalized efficiently by the cells in the first few minutes after incubation, demonstrated its potential as a new photosensitizer. Previous studies verified that the uptake of emodin in Caco-2 (34) and U-87 MG (35) cells increased rapidly on a short time of incubation, decrease after 2 hours, followed by an approximately constant drug concentrations for later times, corroborating with our results. The lipophilic character of the emodin allows for drug accumulating inside the lipidic part of the cell membrane after a short time of incubation. The decrease of emodin fluorescence after the initial peak suggests a mechanism of efflux or that the compound has been metabolized by the cells (34, 35).

The phototoxicity studies indicated that emodin-PDT generated a significant decrease in cell viability in the three cell lines evaluated. Despite the decreased viability was also

observed in HaCaT cells, Mattos and collaborators suggested that the side effects of futures treatments can be minimized by directing the light source only to the injury site, one of the characteristics of the PDT (7). Furthermore, the emodin-PDT treatment was more effective than emodin alone at the same concentration, which could decrease the side-effects triggered by a higher concentration of emodin. It has been reported that some anthraquinones as aloe-emodin can be used as PSs in the PDT and have demonstrated effective inhibition in tumor cell growth such as gastric cancer (36), breast cancer (37), lung cancer (38) and human osteosarcoma (39), corroborating with our results.

Among the various types of cell death, PDT could cause DNA damage and oxidative stress, which induce pathways like apoptosis and autophagy in the cancer cell (40). Apoptosis is a type of programmed cell death, triggered by the excess, or lack of stimulation for cell growth, cell proliferation or even cell damage (41, 42). Autophagy is an intracellular catabolic degradative process and protein recycling under stressful conditions and in cancer can act both in survival and programmed cell death triggered by oxidative stress (41). In the last years, it has been demonstrated that apoptosis and autophagy often occur in the same cell and PDT-generated ROS could concurrently induce both types of cell death (43, 44).

ROS are chemically reactive molecules or non-radical molecules containing oxygen and include hydroxyl radical ($\text{HO}\bullet$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide anion ($\text{O}_2\bullet$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). An excess in the ROS production can induce death by oxidative damaging, and therefore induction of ROS is a promising approach for cancer therapy (45, 46). In the present study, it was observed that emodin-PDT induces both apoptosis and autophagy in the tumor cells, probably due to the production of ROS, which increased significantly in the group emodin-PDT, causing a reduction in the proliferative activity of tumor cells. The apoptosis is characterized by caspases activation, with caspase-3 being the most important, since it is an effector caspase of apoptosis (47, 48), while autophagy is characterized by the accumulation of autophagic vacuoles (49). As we observed an increase of caspase-3 after the treatment with emodin-PDT, it is possible to suggest that apoptosis triggered by the caspase pathway is one of the types of cell death found in this study. Furthermore, the increase in autophagic vacuoles suggests that autophagy is also a type of cell death triggered by the treatment. Studies indicate that aloe-emodin induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line through the ROS (39). The relation between autophagy and apoptosis remained unclear, and your understanding is essential for the success of photodynamic therapy in cancer (50).

The gene expression profile of the SiHa cells after emodin-PDT showed 24 differentially expressed genes. *CTSS* (Cathepsin S) gene, which presented low expression in SiHa cells after emodin-PDT treatment, has the role of degrading the extracellular matrix, performing an important role in the development of metastasis, becoming a therapeutic target anti-cancer (51, 52). Therefore, its low expression in SiHa cells after treatment becomes interesting, once can suppress tumor growth. Gautam and collaborators suggest that downregulation of Cathepsin S suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis (52). Recent studies have also demonstrated the role of *CTSS* in apoptosis (53, 54) and autophagy (51, 54). The inhibition of Cathepsin S induced mitochondrial apoptosis and autophagy in human glioblastoma cells (54). Furthermore, the downregulation of Cathepsin S in cervical cancer cells suppresses metastasis via autophagic degradation (51). *Estrogen receptor 1 (ESR1)* also had its expression decreased in SiHa cells. The relationship between high levels of expression of *ESR1* in tumorigenesis and progression of breast cancer and other types of cancer as ovarian cancer, prostate cancer, and colon cancer is well known and is related to poor prognosis, thus becoming *ESR1* a pharmacological target (55, 56).

On the other hand, the *RhoB* gene is highly expressed in SiHa cells, being approximately 10 times more expressed in the group emodin-PDT compared to the cells without treatment. *RhoB* has antitumor activity, affects proliferation, survival, invasion angiogenesis and its expression can lead to apoptosis in response to DNA damage (57, 58). Overexpression of *RhoB* has been shown to promote apoptosis in cancer colon (58) and oral squamous carcinoma cells (59).

PLK2 presented increased expression in SiHa cells after the emodin-PDT treatment. The polo-like kinases (*PLKs*) comprise a family of serine/threonine kinases involved in the regulation of the cell cycle and the response to DNA damage (60). *PLK2* is involved in genotoxic stress and DNA damaging agents promote increased expression of *PLK2* (61). *PIK3C3* also known as *Vps34* (62), also showed increased expression in SiHa cells after emodin-PDT treatment. *PIK3C3* is one catalytic subunit of the *PI3K* complex that mediates the formation of phosphatidylinositol 3-phosphate, a phospholipid central to membrane trafficking and plays a central role in autophagic machinery (63, 64). Studies demonstrated that the inhibition of the *Vps34* activity prevented autophagy in tumor cell lines (64) and prevents autophagosome formation in T lymphocytes (65). Therefore, the upregulation of *PIK3C3* in SiHa cells suggests this pathway may be involved in autophagy induced by emodin-PDT.

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 cytostasis 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.

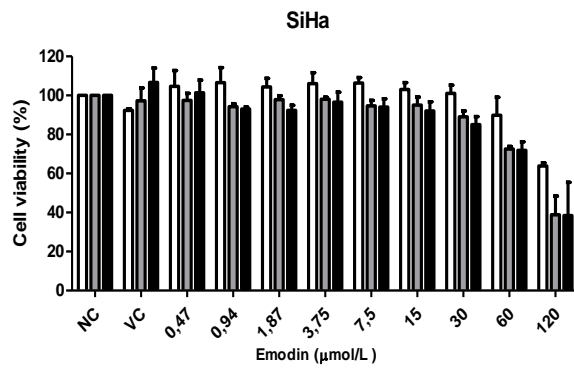
59. Ansari SS, Akgun N, Berger MR. Erufosine increases RhoB expression in oral squamous carcinoma cells independent of its tumor suppressive mode of action - a short report. *Cellular oncology*. 2017 Feb;40(1):89-96. PubMed PMID: 27812856.

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.

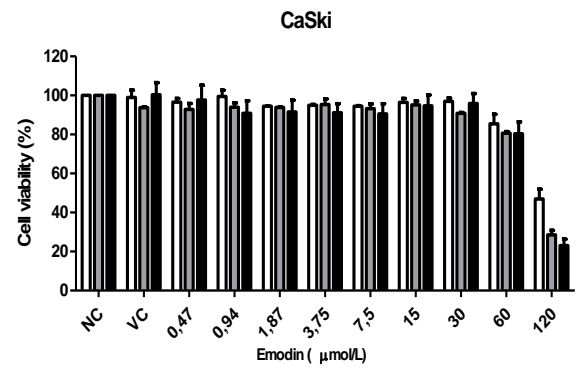
61. Winkles JA, Alberts GF. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene*. 2005 Jan 10;24(2):260-6. PubMed PMID: 15640841.

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.

A



B



C

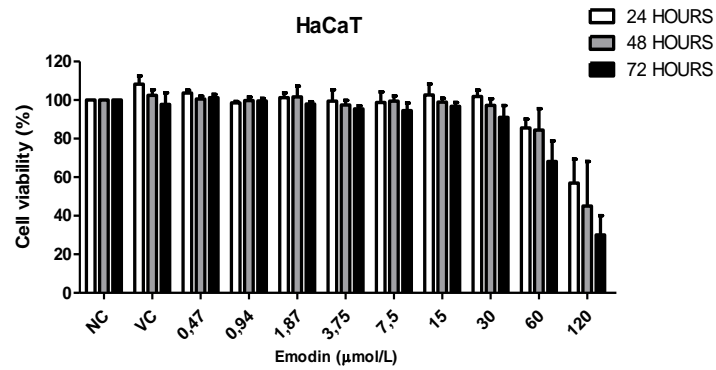


Figure 1 Citotoxicity of emodin incubation in cell lines. Percentage of SiHa, CaSki and HaCaT viable cells after emodin treatment, treated with the indicated concentrations, evaluated by MTT assay and evaluated after 24, 48 and 72 hours. The data refer to three independent experiments. VC: vehicle control (1% DMSO). NC: Negative Control.

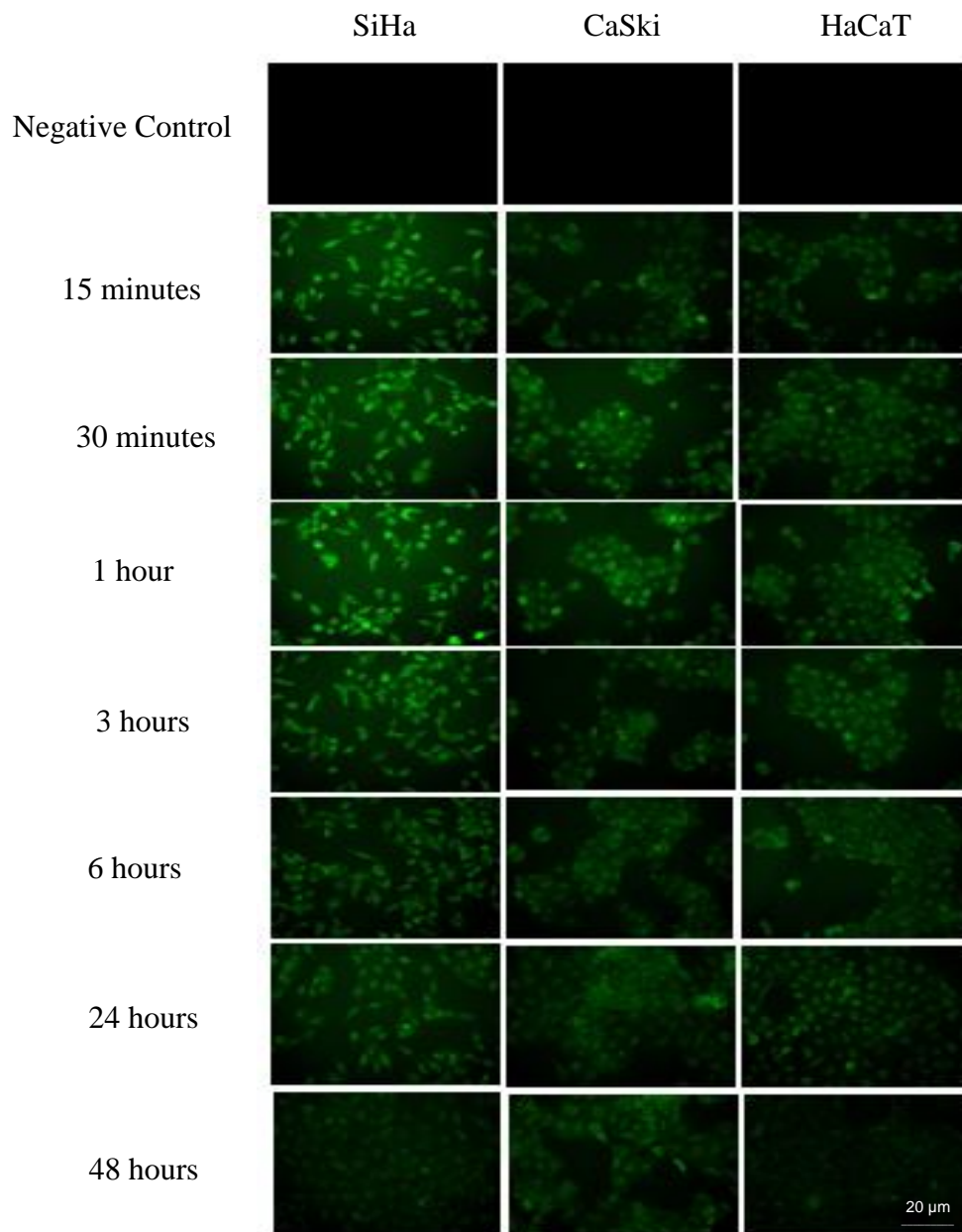


Figure 2 Emodin internalized into SiHa, CaSki and HaCaT cells. Intracellular capture of emodin through fluorescence microscopy. Photos were taken after 15 minutes, 30 minutes, 1, 3, 6, 24 and 48 h of incubation. Scale 20 μm .

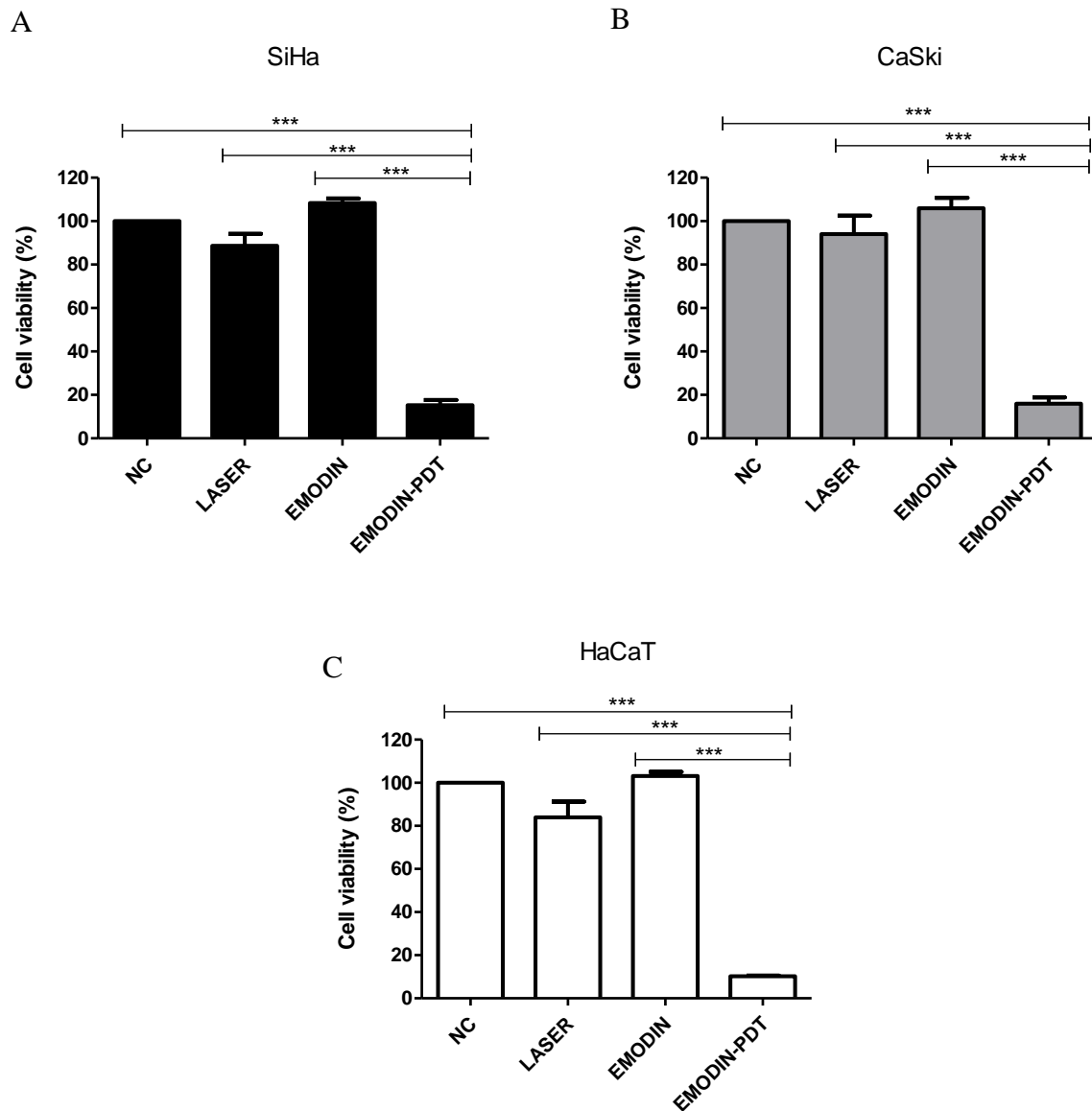


Figure 3 Phototoxicity assay in SiHa, CaSki and HaCaT 24 hours after incubation with emodin followed by irradiation. Results are expressed as the mean of three independent experiments and standard deviation ($M \pm SD$), analyzed by one-way ANOVA with Tukey's post-test (treatments vs NC). NC: negative control; *** $p < 0.001$.

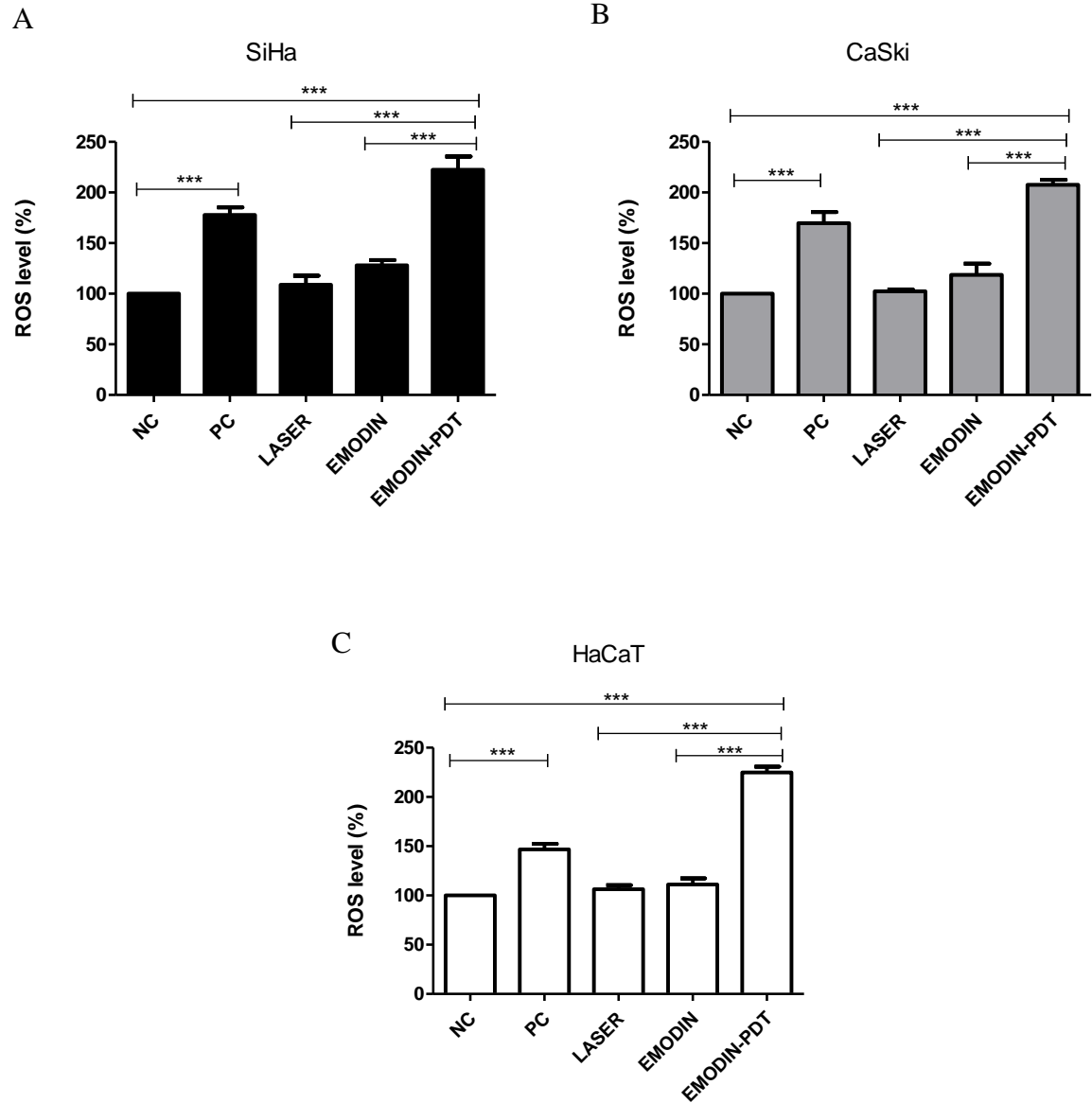


Figure 4 ROS production in SiHa, CaSki and HaCaT cells after treatment with emodin-PDT, emodin, laser and hydrogen peroxide. Results are expressed as the mean of three independent experiments and standard deviations ($M \pm SD$), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test (treatments vs NC). NC: Negative Control; PC: Positive Control; *** $p < 0.001$.

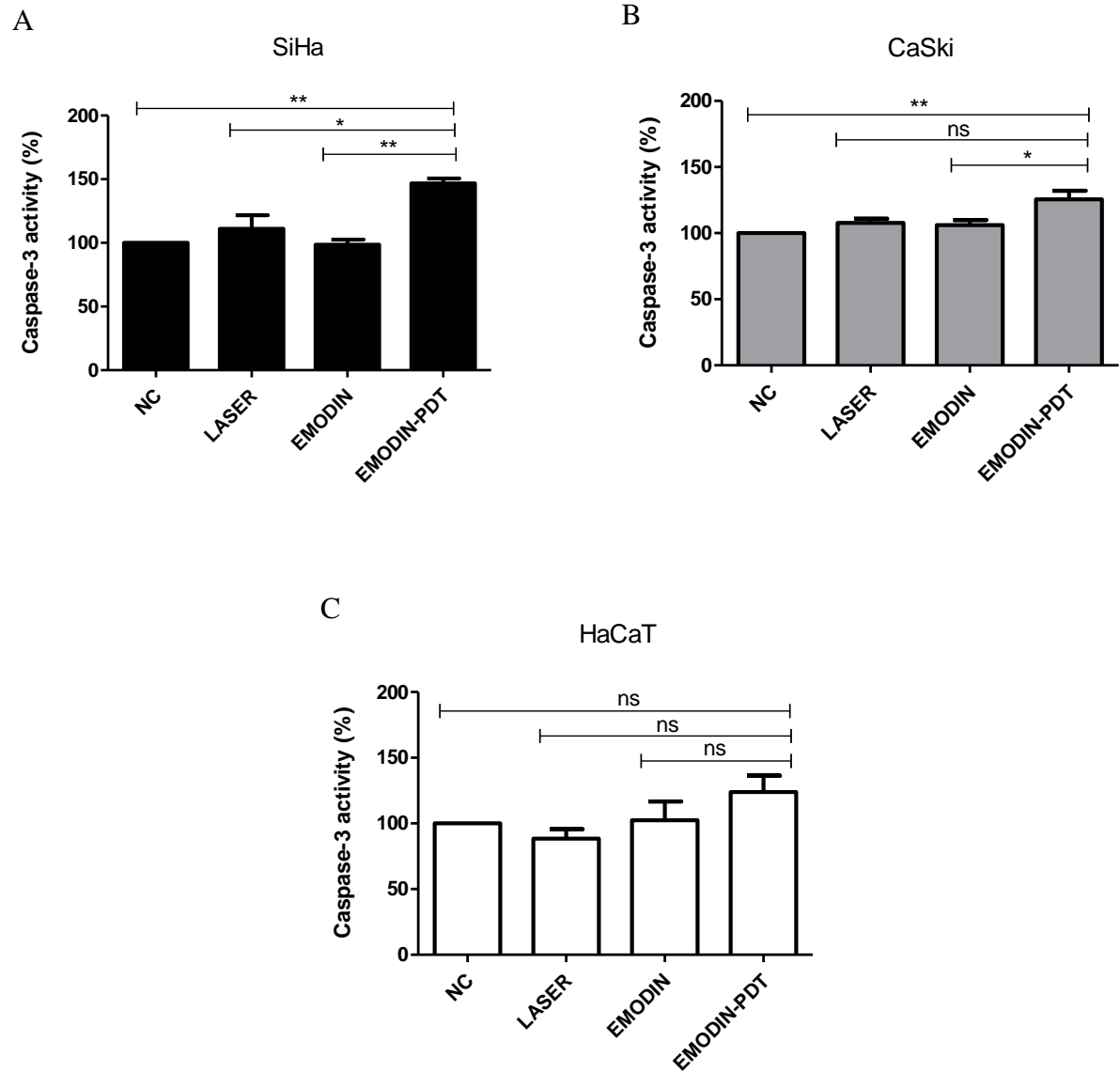


Figure 5 Caspase-3 activity in SiHa, CaSki and HaCaT cells after treatment with emodin-PDT emodin and laser. Results are expressed as the mean of three independent experiments and standard deviations ($M \pm SD$), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test (treated vs NC). NC: Negative Control; ns: not significant; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

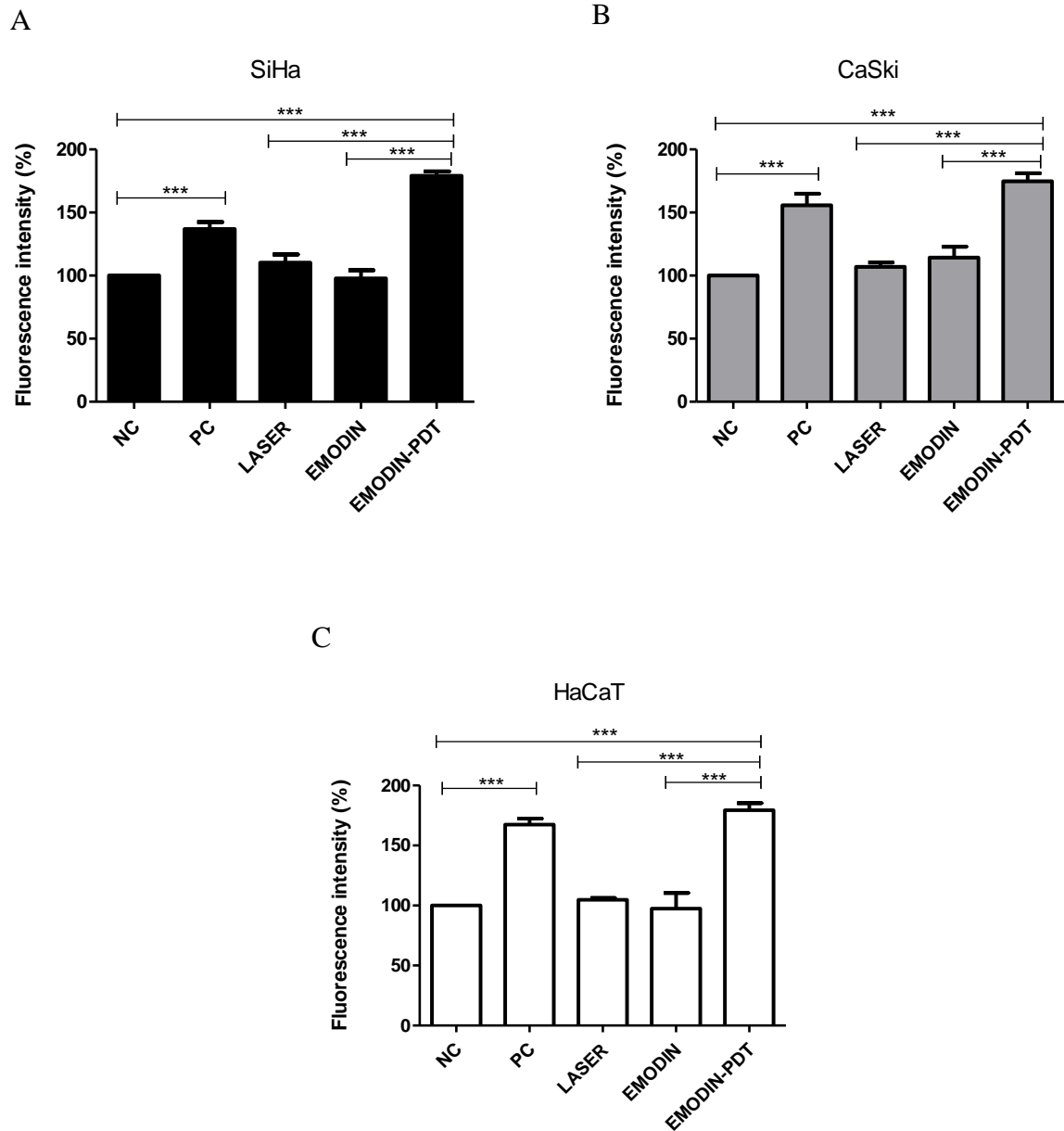


Figure 6 Autophagy assay in SiHa, CaSki and HaCaT cells after treatment with emodin-PDT emodin, laser and trichostatin A (TSA). Results are expressed as the mean of three independent experiments and standard deviations ($M \pm SD$), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post- test (treatments vs NC). NC: Negative Control; PC: positive control (TSA); *** $p < 0.001$.

Table 1: Differential expression of target genes of anticancer drugs in SiHa cells after treatment with emodin-PDT.

GENE SYMBOL	GENE NAME	FOLD REGULATION	P-VALUE
<i>CTSS</i>	Cathepsin S	-4,5694	0,01076
<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor 1	-4,7305	0,00803
<i>ATF2</i>	Activating transcription fator 2	4,2713	0,000011
<i>AURKA</i>	Aurora Kinase A	2,1307	0,034355
<i>AURKC</i>	Aurora Kinase C	2,1805	0,000587
<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 5	3,8141	0,012124
<i>CDK1</i>	Cyclin Dependent Kinase 1	2,0111	0,000874
<i>CDK7</i>	Cyclin Dependent Kinase 7	2,247	0,00165
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase pi 1	2,4083	0,002822
<i>HDAC4</i>	Histone Desacetylase 4	2,7032	0,003586
<i>HIF1A</i>	Hypoxia-inducible fator 1-alpha	2,0111	0,004487
<i>HSP90AA1</i>	Heat Schock Protein 90 Alpha Family Classe A Member 1	4,0409	0,001434
<i>MDM4</i>	MDM4 Regulator of p53	3,4216	0,023688
<i>MTOR</i>	Manmalian target of rapamycin	3,8317	0,002196
<i>PARP4</i>	Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family Member 4	2,1307	0,029467
<i>PIK3C2A</i>	Phosphatidylinositol-4- phosphate 3-kinase C2 domain- containing alpha polypeptide	2,8573	0,000004
<i>PIK3C3</i>	Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3	4,4321	0,000578
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5- bisphospate 3-kinase catalytiv subunit alpha	7,8426	0,00444
<i>PLK2</i>	Polo Like Kinase 2	3,9304	0,000045
<i>PLK4</i>	Polo Like Kinase 4	2,9513	0,000024
<i>RHOA</i>	Ras homolog gene family, member A	2,3533	0,033691
<i>RHOB</i>	Ras homolog gene family, member B	10,9891	0,012122
<i>TNKS</i>	Tankyrase	2,7985	0,000479
<i>TOP2B</i>	DNA topoisomerase 2-beta	2,1856	0,000225

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.