



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Renata Prandini Adum de Matos

Estudo da ação de nanopartículas associadas à curcumina
em células de carcinoma cervical positivo para HPV-16

São José do Rio Preto
2017

Renata Prandini Adum de Matos

Estudo da ação de nanopartículas associadas à curcumina
em células de carcinoma cervical positivo para HPV-16

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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: FAPESP -Proc. 2013/04286-6

Orientadora: Prof.^a. Dr^a. Paula Rahal

Co-orientadora: Dr^a. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto
2017

Renata Prandini Adum de Matos

Estudo da ação de nanopartículas associadas à curcumina
em células de carcinoma cervical positivo para HPV-16

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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: FAPESP – Proc. 2013/4286-6

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a Rejane Maira Góes
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a Tatiana Rabachini
Universidade de Berna

Prof^a. Dr^a. Cristiane Damas Gil
UNIFESP

Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva
UNESP – Botucatu

São José do Rio Preto
02 de março de 2017

Matos, Renata Prandini Adum de.

Estudo da ação de nanopartículas associadas à curcumina em células de carcinoma cervical positivo para HPV-16 / Renata Prandini Adum de Matos. -- São José do Rio Preto, 2017

99 f. : il.

Orientador: Paula Rahal Coorientadora:

Marília de Freitas Calmon

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Papillomaviridae. 3. Doença do vírus papiloma. 4. Colo uterino - Câncer. 5. Nanotecnologia. 6. Curcumina. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 616-006.5

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Dedico este trabalho

À minha vó Odila (*in memoriam*).

Que mesmo não estando fisicamente presente para ver a conclusão deste trabalho esteve ao meu lado e em meus pensamentos todo esse tempo.

Vó, você é o meu maior exemplo de força e perseverança, sempre me inspirando a não desistir diante das dificuldades.

Agradecimentos

- Às minhas orientadoras Profa. Dra. Paula Rahal e Dra. Marília de Freitas de Calmon, pela amizade e dedicação e por todos os ensinamentos. Obrigado por me acolherem e me apoiarem e acreditarem em mim.
- Ao Dr. Antônio Claudio Tedesco e ao Dr. Fernando Lucas Primo pela colaboração e desenvolvimento e síntese das nanopartículas utilizadas neste trabalho
- Ao Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual da USP de Ribeirão Preto
- À Dra. Ana Paula Lepique por todo auxílio com a experimentação animal.
- Ao Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo por toda ajuda no desenvolvimento de culturas organotípicas.
- À Lenira, pela amizade e carinho e pelo seu papel fundamental na vida de todos no laboratório
- A todos os companheiros do Laboratório de Estudos Genômicos. Obrigado a todos pela amizade, conversas e risadas.
- À Ana Claudia, obrigada pela ajuda num momento bem difícil da minha vida, e por ter se tornado essa grande amiga e confidente.
- À Marina pela amizade, parceria e companheirismo desse último ano, quem diria que eu iria encontrar alguém que me entendesse tão bem.

- À Jacqueline, por ser essa amiga tão desvairada e divertida e que me inseriu no círculo social do IBILCE.
- À Lidianne, pelos quase 10 anos de amizade e por tornar minha vida mais fitness e divertida.
- Aos meus pais José Maria e Claudia pelo apoio incondicional em todos os momentos, por todo o esforço que fizeram para que hoje eu estivesse aqui. Obrigada por sempre cuidarem de mim.
- À minha irmã Gabriela, obrigada por ser minha melhor amiga, sempre estar ao meu lado e me ajudar a ter confiança em mim e a não desistir.
- A todos os meus professores do Curso de Ciências Biológicas, pelo papel fundamental na minha formação.
- Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos.
- 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.
- FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2013/4286-6)
- À Deus.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

RESUMO

Os Papilomavírus Humanos (HPV) são uma família de vírus de DNA com mais de 202 tipos, e são divididos em HPVs de alto e baixo risco. A infecção pelo HPV de alto risco foi identificada como agente etiológico de seis tipos de câncer, incluindo o carcinoma de colo de útero, de pênis, vagina, vulva, ânus e orofaringe, sendo que em aproximadamente 99,7 % dos casos de câncer cervical a infecção pelo HPV de alto risco é relacionada como agente etiológico. O tratamento atual para carcinoma invasivo é a terapia combinada do quimioterápico cisplatina com a radiação, contudo a cisplatina apresenta sérios efeitos adversos. Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que aumentem a eficácia do quimioterápico e diminuam os efeitos colaterais, a fim de maximizar a resposta local e promover a sobrevivência do paciente. A curcumina é um composto hidrofóbico bioativo muito versátil que possui propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-hiperlipidêmica, antiangiogênica, antineoplásica e quimioprotetora. Além disso, a curcumina pode ser usada como agente fotossensível na Terapia Fotodinâmica. Entretanto, sua aplicação como agente ativo tem sido limitada pela sua baixa solubilidade em água e biodisponibilidade. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica na viabilidade celular usando nanoemulsões com curcumina, como fármaco fotossensibilizante, em linhagens de carcinoma cervical HPV-16 positivas cultivadas em monocultura. A ausência de citotoxicidade de nanoemulsões vazias demonstra sua biocompatibilidade. Adicionalmente, o tratamento com nanoemulsões com curcumina na concentração de 20 μ M de curcumina possui mais de 80% de viabilidade celular para todas as linhagens celulares analisadas. As nanoemulsões foram capazes de se internalizarem eficientemente nas células analisadas, sendo observadas intracelularmente por até 36 horas nas células SiHa e por até 48 horas nas células CasKi e HaCat. Após o tratamento com a Terapia Fotodinâmica, observou-se alto efeito fototóxico das nanoemulsões com curcumina, sendo

observado menos de 5% de viabilidade celular após a irradiação. Esse efeito foi acompanhado por um aumento na atividade das caspases 3/7, sugerindo morte celular por apoptose. Assim é possível concluir que a formulação de nanoemulsão com curcumina como agente fotossensível para a Terapia Fotodinâmica mostra potencial como terapia alternativa para carcinoma cervical.

Palavras chave: Nanotecnologia, Carcinoma Cervical, Curcumina, HPV

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is a family of DNA viruses with more than 202 types, and are divided into high and low risk HPVs. High-risk HPV infection was identified as etiologic agent of six types of cancer, including cancer of the cervix, penis, vagina, vulva, anus, and oropharynx, and, approximately, 99.7% of the cases of cervical cancer are caused by high-risk HPV infections. Current treatment modalities for invasive carcinoma are the combination of cisplatin-based chemotherapy with radiation, however cisplatin shows severe adverse effects and a low survival rate. Therefore, ongoing efforts are necessary to develop new effective therapeutic strategies to enhance chemotherapeutic efficacy and decrease these side effects, maximizing the local response and patient survival. Curcumin is a bioactive versatile hydrophobic compound which has anti-inflammatory, anti-hyperlipidaemic, anti-angiogenic, anti-neoplastic and chemoprotective properties. Furthermore, curcumin may be used as a photosensitizing agent in Photodynamic Therapy. This study aimed to investigate the effects of Photodynamic Therapy in cellular viability using curcumin-nanoemulsion as photosensitizing drug in cervical carcinoma HPV-16 cell lines and identify possible molecular changes. The absence of cytotoxicity of empty nanoemulsion showed its biocompatibility. Additionally, the incubation with curcumin-nanoemulsion at 20 μ M of curcumin showed more than 80% of cell viability for cell lines. Nanoemulsions were internalized efficiently in cells and were observed in the intracellular environment for up to 36 hours after incubation in SiHa cells and for 48 hours in CasKi cells by fluorescence microscopy. Besides, after the Photodynamic Therapy we observed high phototoxic effect of the curcumin-nanoemulsion with less than 5% of viable cells after irradiation. This was accompanied by an increase in caspase-3/7, suggesting cell death by apoptosis. We conclude that curcumin-nanoemulsion formulation behaves as photosensitizing agent in Photodynamic Therapy and shows potential as an alternative treatment to cervical carcinoma

Keywords: *Nanotechnology, Cervical Carcinoma, Curcumin, HPV*

Lista de Figuras e Tabela

Capítulo I

Figura 1. Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano.....	19
Figura 2. Árvore filogenética da Família Papillomaviridae.....	21
Figura 3. Arquitetura celular do epitélio escamoso estratificado e a expressão das proteínas do HPV após a infecção.....	25
Figura 4. Estrutura Química da curcumina.....	31
Figura 5. Diagrama de Jablonski.....	35

Capítulo II

Figure 1. In vitro cytotoxicity of empty nanoemulsion.....	91
Figure 2. In vitro cytotoxicity of nanoemulsion-curcumin.....	92
Figure 3. In vitro cytotoxicity of free curcumin.....	93
Figure 4. Fluorescence microscopy images of cells incubated with nanoemulsion-curcumin and free curcumin.....	94
Figure 5. Phototoxicity assay under two different irradiation regimes.....	95
Figure 6. Enzymatic activity of caspase-3 and -7.....	96
Table 1. Characterization of curcumin-nanoemulsion by dynamic light scattering (DLS) technique.....	97

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AIS- Adenocarcinoma in situ

ALT - *Arternative Lengthening of Telomeres* (comprimento alternativo de telômeros)

ASC - *Atypical Squamous Cells*

CNE - *Curcumin-nanoemulsion* (nanoemulsão contendo curcumina)

CO₂ - Dióxido de Carbono

DLS - *Dynamic light scattering* (espalhamento de luz dinâmica)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FBS - Fetal bovine serum (Soro fetal bovino)

FDA – Food and Drug Administration (Administração de alimentos e drogas)

FF- Fármaco Fotossensível

HPH – High Pressure Homogenization (Homogeneização de alta pressão)

HPV - *Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano)

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IPd - Índice de polidispersão

LCR - *Long Control Region* (Região Longa de Controle)

mg – Miligrama

mm - Milímetro

mL – Mililitro

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

mW - Miliwatt

NE – Nanoemulsão vazia

NE-CUR – Nanoemulsão contendo curcumina

NIC - Neoplasia Intra-Epitelial Cervical

ng- Nanograma

nm – Nanômetro

ORF - *Open Reading Frame* (Região Aberta de Leitura)

PBS - *Phosphate Buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

PDT - *Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica)

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)

SIL- *Squamous Intraepithelial Lesions* (lesões intraepiteliais escamosas)

SUS -Sistema Único de Saúde

TERT - *Telomerase Reverse Transcriptase* (Trascriptase reversa da telomerase)

TFD - Terapia Fotodinâmica

URR - *Upper regulatory region* (Região regulatória superior)

UV-Vis - Ultraviolet–visible (Ultravioleta visível)

VLP - *Virus Like Particle* (Partícula Semelhante a Vírus)

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µM - Micromolar

Sumário

Capítulo I	17
1. Introdução.....	18
1.1. Papilomavírus Humano	18
1.1.1. O Ciclo de infecção viral	24
1.1.2. HPV e Carcinogênese	26
1.2. Carcinoma Cervical	29
1.3. Curcumina.....	30
1.4. Nanotecnologia	33
1.5. Terapia Fotodinâmica.....	34
2. Objetivos.....	38
3. Material e Métodos	39
3.1. Nanoemulsões	39
3.2. Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz e índice de polidispersão	39
3.3. Estudo da estabilidade da nanoemulsão.....	40
3.4. Cultivo e Manutenção de linhagens celulares	40
3.5. Ensaio de viabilidade celular nas linhagens de carcinoma celular (CasKi e SiHa) e na linhagem de queratinócito humano (HaCat)	41
3.6. Microscopia de fluorescência para análise de captação de curcumina em linhagem de queratinócito humano	42
3.7. Ensaio de Fototoxicidade	43
3.8. Ensaio de apoptose por meio da detecção da atividade enzimática da Caspase-3/7	44
3.9. Análise estatísticas.....	46
4. Referências.....	47
Capítulo II	63
Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines.	64
Abstract	66
1. Background.....	67
2. Materials and Methods.....	69

2.1. Curcumin-nanoemulsion: preparation and characterization	69
2.2. Cell Culture	70
2.3. Cytotoxicity studies.....	70
2.4. Cellular uptake of curcumin	71
2.5. Cell Phototoxicity	71
2.6. Cell death upon treatment	72
2.7. Statistical methods	73
3. Results.....	73
3.1. Particle size and zeta potential characterization of curcumin-nanoemulsion.....	73
3.2. UV-Vis absorption and fluorescence emission of curcumin-nanoemulsion.....	74
3.3. Effect of curcumin on cell viability	74
3.4. Cellular uptake of curcumin	75
3.5. Cell Phototoxicity	75
3.6. Cell death upon treatment	76
4. Discussion	77
5. Conclusion	82
6. Acknowledgments.....	82
7. References	82
Capítulo III	98
Conclusões.....	99

Capítulo I

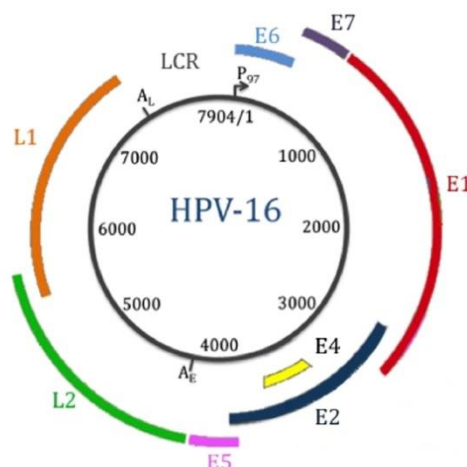
1. Introdução

1.1. Papilomavírus Humano (HPV)

Os Papilomavírus são vírus pequenos, medindo de 52 a 55 nm de diâmetro. Apresentam um genoma composto por uma única molécula de ácido desoxirribonucleico circular de dupla fita com 7200 a 8000 pares de bases, dependendo do genótipo analisado. Possui um capsídeo de simetria icosaédrica com 72 capsômeros, sem envelope lipoprotéico. Este vírus é epiteliotrópico com preferência por queratinócitos (NEBESIO et al., 2001), infectando as células da camada basal do epitélio estratificado. A expressão dos genes virais está diretamente relacionada com a diferenciação celular do hospedeiro (MCMURRAY et al., 2001).

O genoma é dividido em regiões gênicas denominadas sequências abertas de leitura, do inglês *open reading frames* (ORF), que estão localizados na mesma fita de DNA. Estas ainda podem ser funcionalmente separadas em três regiões principais: a primeira é uma região regulatória, não codificadora, de 400 a 1.000 pares de bases que é conhecida pelas denominações *long control region* (LCR) ou *upper regulatory region* (URR), situada entre os genes L1 e E6. Essa região do genoma é importante para a regulação da replicação viral e a transcrição de genes precoces, uma vez que possui sítios de ligação para fatores de transcrição virais e celulares (HOWLEY, 2007). A segunda é chamada de região precoce ou E, constituída pelos ORFs: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão envolvidos na replicação viral, no controle da transcrição e na oncogênese. A terceira região é denominada tardia ou L codifica as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral (BERNARD, 2002; CHOW et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano do tipo 16 (HPV-16), evidenciando região regulatória (LCR), as regiões precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e as regiões tardias (L1 e L2). HPV-16 possui um genoma de DNA fita dupla circular. O promotor da transcrição é denominado P97. AE e AL são os sítios de poliadenilação precoces e tardios, respectivamente. Fonte: Modificado de Lin et al 2010.



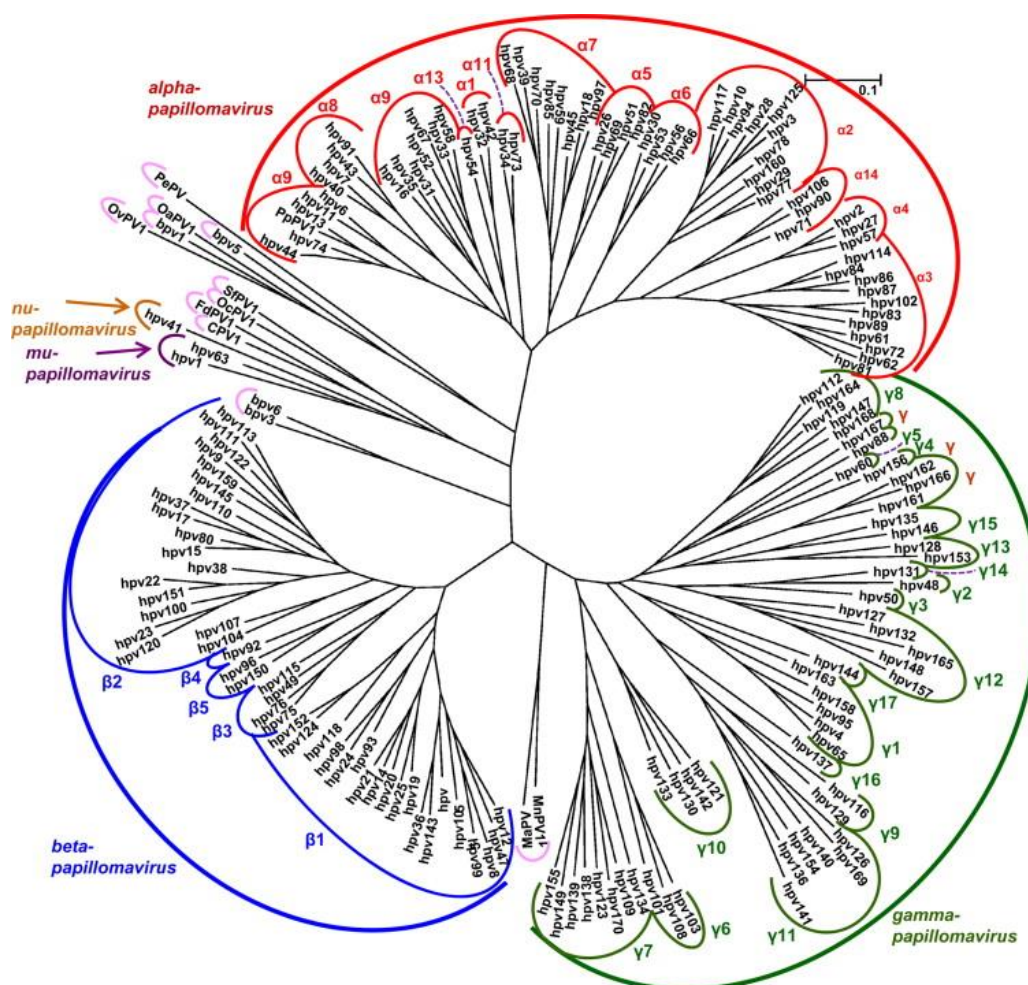
Os genes E1 e E2 codificam proteínas regulatórias importantes para o HPV (proteínas E1 e E2). As funções destas duas proteínas são essenciais para o processo de replicação viral e infecção celular. A proteína E2 reprime a transcrição unindo-se a sítios de ligação específicos na região controladora, enquanto que a proteína E1 facilita esta ligação (CHOW et al., 2010). A proteína E4 atua em estágios posteriores do ciclo do vírus, envolvida na destruição da estrutura do citoesqueleto da célula hospedeira facilitando a permanência e maturação do vírus (CHOW et al., 2010). A proteína E5 induz a proliferação celular, inibe a apoptose, pode ativar os receptores do fator de crescimento e outras proteínas quinases (IARC, 2007). As proteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pela transformação nos HPV de alto-risco e atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (LONGWORTH e LAIMINS, 2004). Os genes tardios L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral (CHOW et al., 2010).

Todos os tipos de HPV possuem dois promotores principais. P1 está localizado *upstream* do gene E6, e o promotor P3 está localizado dentro do gene E7. Há também o promotor P4 que é universalmente conservado e localiza-se

upstream da ORF do gene E6. O vírus depende fortemente de *splicing* alternativo do mRNA para acessar todas as ORFs e alguns mRNA bi ou poli-cistrônicos podem codificar mais do que uma proteína (TANG et al., 2006).

O HPV pertence à família Papillomaviridae, que é composta por 30 gêneros (Figura 2). O gênero Alphapapilomavírus é o mais diverso com 14 espécies e neste gênero são encontrados os tipos que infectam preferencialmente a mucosa oral e anogenital em humanos e primatas (ICTV, 2001). Os membros da família Papillomaviridae são comuns na natureza e já foram isolados e caracterizados de répteis (HERBST et al., 2009), aves (TERAI et al., 2002), marsupiais (BENNETT et al., 2010), e diversas espécies de mamíferos (BERNARD et al., 2010).

Figura 2: Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene L1 de 170 tipos de papilomavírus. Os números nas pontas dos ramos identificam os tipos de HPV, “c” seguido de um número indica um novo candidato a tipo de HPV. Todas as outras abreviações se referem a tipos de papilomavírus que infectam animais. Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos, as espécies. Fonte: Modificado de de Villiers, 2013



A classificação dos HPVs é baseada na diversidade genômica do gene L1. Entre os gêneros da família Papillomaviridae há uma diferença maior de 40% na sequência nucleotídica do gene L1, já para as espécies esta diferença varia entre 30% e 40%. Há ainda uma classificação dos papilomavírus em tipos, subtipos e variantes. Um tipo de HPV difere de outro quando apresenta ao menos 10% de divergência na sequência do gene L1. Em adição, isolados do mesmo tipo são classificados em subtipos quando a sequência nucleotídica diverge entre 2% a 10%, e diferenças menores do que 2% definem uma variante (BERNARD et al., 2010; DE VILLIERS, 2013).

Mais de 202 tipos de HPV foram identificados (HPV CENTER, 2015), podendo ser classificados de acordo com o seu potencial oncogênico em HPV de baixo risco e alto risco (IARC, 2007). Os tipos de baixo risco detectados com maior frequência são os HPV-6 e -11, estando normalmente associados a lesões benignas como papilomatose de laringe ou verrugas genitais e perianais. Os tipos de alto risco mais frequentemente detectados são os HPV-16, -18, -31, -33, -35, esses tipos estão associados com carcinoma do colo do útero, tumores na região genito-anal, câncer cervical e câncer de cabeça e pescoço (KLOZAR et al., 2010).

HPV é altamente transmissível, com o pico de incidência logo após o início da atividade sexual (MUNOZ et al., 2004). É transmitido através do contato pele-com-pele (comportamentos não relacionados ao coito) e através de relação sexual vaginal, anal ou oral. HPV pode ser transmitido com mais frequência de mulheres para homens do que de homens para mulheres (NYITRAY et al., 2014). Adicionalmente, o risco de infecção pelo HPV está associado com o número de parceiros sexuais (VACCARELLA et al., 2006).

Mais de 90% das infecções detectadas são resolvidas naturalmente após 2 anos da infecção. As infecções que não são eliminadas naturalmente poderão progredir em doenças relacionadas ao HPV na forma de verrugas genitais, displasia ou câncer (PAHUD e AULT, 2015).

As opções de tratamento convencional para infecções por HPVs (exofíticas, verrugas e lesões cervicais) incluem cirurgia, tratamentos com

criogenia, aplicações com drogas (podofilotoxina, 5-fluorouracil e ácido tricloroacético) e terapias antivirais, como interferon- α intralesão ou intramuscular e imiquimod tópica para verrugas exofíticas (RIVERA e TYRING, 2004; DE WITTE et al., 2015; KOLLIPARA et al., 2015). Entretanto, os efeitos colaterais das drogas utilizadas para tratar infecção por HPV incluem dores, vermelhidão, coceira, queimação e hipersensibilidade (LACEY, 2005).

De forma preventiva, os programas de vacinação profilática para o HPV constituem a principal iniciativa de saúde pública no mundo. Atualmente existem três vacinas profiláticas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*), a vacina bivalente Cervarix[®] (GSK) que fornece imunidade contra os HPV's do tipo 16 e 18, a vacina quadrivalente Gardasil[®] (Merck) que fornece imunidade contra os HPV's do tipo -6, -11, -16, -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). As vacinas são produzidas a partir de partículas não infecciosas chamadas de VLPs (*Virus Like Particles* - Partícula Semelhante a Vírus) que são formadas pela proteína do capsídeo viral L1 (TOFT et al., 2014).

Após a implementação da vacina foi observada uma rápida redução de até 90% de infecções por HPV6/11/16/18 e verrugas genitais em mulheres jovens na Austrália, Europa, América do Norte e Nova Zelândia (GARLAND et al., 2016).

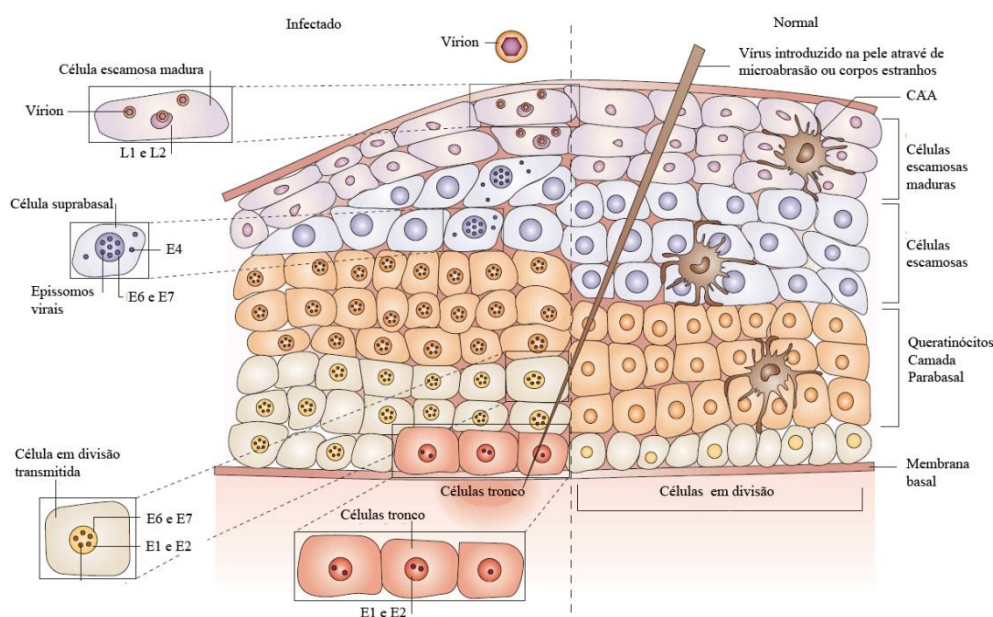
O Brasil introduziu em março de 2014 o programa de imunização contra o HPV para meninas de 9 a 13 anos de idade como parte do Programa Nacional de Imunização do Sistema Único de Saúde (SUS). O Brasil adotou um calendário estendido para a vacina quadrivalente, Gardasil[®] (Merck), nesse programa a segunda e a terceira dose são administradas após 6 meses e 5 anos da primeira dose, respectivamente. (DOBSON et al., 2013; BAKER et al., 2015). A partir de 2017 o programa de vacinação incluirá também os meninos na faixa etária de 12 a 13 anos. Para os meninos a vacina quadrivalente será oferecida em 2 doses, onde a segunda dose será aplicada 6 meses após a primeira (PORTAL BRASIL, 2017).

1.1.1. O Ciclo de infecção viral

A replicação do HPV ocorre no epitélio estratificado, onde as partículas virais entram no tecido epitelial através de microlesões e infectam as células do epitélio basal com um baixo número de cópias (MCMURRAY et al., 2001). Imediatamente após a infecção da camada basal ocorre a etapa de desnudamento do capsídeo e o genoma viral segue em direção ao núcleo, onde é mantido na forma episomal e independente do genoma do hospedeiro. Pouco tempo após a infecção ocorre um ciclo de replicação do DNA viral, independente do ciclo celular, que amplifica o genoma viral para aproximadamente 50-100 cópias por célula (SCHILLER et al., 2010).

Após a divisão celular, uma célula-filha permanece na camada basal do epitélio, enquanto que a outra célula-filha migra para o próximo nível do epitélio estratificado e inicia a diferenciação. O ciclo de replicação viral ocorre à medida que as células infectadas movem-se através do epitélio, onde o DNA viral é amplificado na camada granular; a transcrição e tradução dos genes tardios ocorrem na parte superior do epitélio e a montagem das partículas virais ocorre na camada cornificada. As células infectadas com as novas partículas virais são descartadas na parte superior do epitélio e podem ser transmitidas diretamente aos indivíduos (MCMURRAY et al., 2001). O ciclo infeccioso *in vivo* leva, em média, de 2 a 3 semanas. Este é o tempo necessário para o queratinócito mover-se da camada basal em direção à superfície do epitélio e diferenciar-se (STANLEY, 2010) (Figura 3).

Figura 3: Arquitetura celular do epitélio escamoso estratificado e a expressão das proteínas do HPV após a infecção. As células-filhas das células tronco epiteliais dividem-se ao longo da membrana basal e tornam-se maduras conforme migram verticalmente sem divisões adicionais (lado direito da figura). Após a introdução do HPV nas células tronco da camada basal do epitélio, ocorre a expressão das proteínas virais não estruturais. Sob a regulação dessas proteínas, a população de células em divisão expande verticalmente e a diferenciação das células epiteliais é atrasada e incompleta. Como mostrado, as proteínas virais são expressas sequencialmente à diferenciação, e as partículas virais maduras são produzidas somente nas camadas mais superficiais do epitélio. CAA: células apresentadoras de antígeno. Fonte: Modificado de Frazer, 2004.



A proteína viral codificada pelo gene E1 é a única enzima de replicação do DNA codificada pelos papilomavírus. Excluindo-se as proteínas virais E1 e E2, a replicação viral é totalmente dependente da maquinaria celular de síntese de DNA. Entretanto, os fatores de replicação e as DNA-polimerases celulares só estão presentes em células em divisão e a replicação viral não ocorre em tais células. Dessa forma, o HPV codifica proteínas que reativam a síntese de DNA celular, inibem a apoptose e atrasam a diferenciação dos queratinócitos infectados, criando um ambiente permissivo para a replicação do DNA viral (ZUR HAUSEN, 2002).

Em alguns casos, principalmente quando a infecção ocorre por HPVs de alto risco, pode ocorrer persistência, integração e transformação. Em lesões cervicais de alto grau e nos tumores, o DNA do HPV está geralmente integrado

ao genoma do hospedeiro. Este evento promove a perda do gene E1 e o rompimento do gene E2. A integração ocasiona o término da amplificação viral e a ativação constante do promotor precoce do HPV resultando em uma super expressão de E6 e E7 e levando a imortalização e transformação das células (ROMANCZUK e HOWLEY, 1992; FRANCO e HARPER, 2005).

1.1.2. HPV e Carcinogênese

A infecção pelo HPV de alto risco foi identificada como agente etiológico de seis tipos de câncer, incluindo o carcinoma de colo de útero, de pênis, vagina, vulva, ânus e orofaringe (PAHUD e AULT, 2015). A interação de proteínas virais com proteínas do hospedeiro é considerado um dos fatores principais na indução da carcinogênese pelos HPVs de alto risco (TOMMASINO, 2014). Em lesões cervicais de alto grau e nos tumores, o DNA do HPV está geralmente integrado ao genoma do hospedeiro. Esse evento promove a perda dos genes E1 e o rompimento do gene E2 (BAKER et al., 1897; PETT et al., 2004). No entanto, os genes E6 e E7 são preservados e expressos em linhagens celulares de câncer cervical e neoplasias associadas ao HPV de alto risco. Isso resulta no término da amplificação do DNA viral e na ativação constante do promotor precoce do HPV (STOLER et al., 1992; ZUR HAUSEN, 2002). Dessa forma, o mecanismo pelo qual os papilomavírus estimulam a progressão do ciclo celular é atribuído principalmente às proteínas virais E6 e E7 (DOORBAR, 2006).

Durante a infecção, a atividade dessas proteínas estimula a divisão de um pequeno número de células infectadas, aumentando o número de células que, subsequentemente, irão produzir partículas infecciosas (DOORBAR, 2006).

Em HPV de alto risco a proteína oncogênica E6 ativa a degradação do gene supressor de tumor *p53*. A proteína E6 recruta a ubiquitina ligase celular E6AP e juntas formam um complexo trimérico com a *p53*, levando a ubiquitinação e a degradação proteassomal de *p53* (HUIBREGTSE et al., 1991; SCHEFFNER et al., 1993). A proteína *p53* é responsável por monitorar e proteger a integridade do genoma induzindo genes que regulam o ciclo celular e o reparo do DNA, ou alternativamente a senescência ou apoptose da célula.

Dessa maneira a inativação, degradação ou mutação em *p53* pode desregular suas funções resultando no aumento da proliferação celular e sobrevivência celular prolongada (NGHIEM e KUPPER, 1998; PIM e BANKS, 2010).

A E6 media a degradação não somente de *p53*, mas também de proteínas que contém os domínios PSD95/Dlg/ZO-1 e PDZ que modulam as vias de sinalização celular que regulam a diferenciação celular, como por exemplo, o gene *PTPN13*, que pertence a uma família de moléculas sinalizadoras que regulam uma variedade de processos celulares incluindo crescimento celular, diferenciação do ciclo celular e transformação oncogênica (MASSIMI et al., 2004; NOMINE et al., 2006; SPANOS et al., 2008).

A proteína E7 interage com membros da família Rb através de um motivo conservado LXCXE que está presente na região amino-terminal dessas proteínas. A família Rb controla a transição da fase G1-S pela regulação da atividade de fatores de transcrição da família E2F (DYSON, 1998). Sítios de ligação para E2F são encontrados em muitos genes que estão envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular, diferenciação, mitose e apoptose (DEGREGORI e JOHNSON, 2006). Em células normais, pRB reprime a transcrição de promotores dependentes de E2F por meio da ligação direta com o domínio de transativação de E2F (MOODY e LAIMINS, 2010). A ligação de E7 de HPVs de alto risco à pRB perturba o complexo RB-E2F (CHELLAPPAN et al., 1992) resultando na expressão constitutiva dos genes que respondem a E2F, como ciclina A e ciclina E, e promove a entrada prematura na fase S e a síntese de DNA (CHENG et al., 1995; ZERFASS et al., 1995). A proteína E7 também leva as proteínas da família Rb a degradação proteassomal por meio de vias dependente de ubiquitina (BOYER et al., 1996; JONES, THOMPSON, et al., 1997).

Em adição à desestabilização de RB, E7 contribui para a imortalização por meio da interação com proteínas chaves que controlam a progressão do ciclo celular. Os inibidores de CDK, p21 e p27, são importantes reguladores do controle do crescimento celular durante a diferenciação epitelial, e p21 é conhecido como um supressor tumoral na carcinogênese cervical (SHIN et al.,

2009). A região carboxi-terminal da proteína E7 tem a capacidade de se ligar a p21 e p27 e inibir sua ação no controle do ciclo celular (ZERFASS-THOME et al., 1996; JONES, ALANI, et al., 1997).

Adicionalmente as proteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco podem contribuir pra a imortalização das células infectadas por meio da ativação da telomerase. E6 de HPVs de alto risco podem ativar a transcrição da transcriptase reversa da telomerase (TERT), que em conjunto com a inativação de RB pela E7 é um passo essencial para a imortalização celular (WISE-DRAPER e WELLS, 2008; HOWIE et al., 2009). Alguns estudos sugerem que E7 atua promovendo o alongamento dos telômeros por meio da via alternativa de alongamento de telômeros (*arternative lengthening of telomeres* –ALT), que envolve recombinação homóloga entre os telômeros de cromátides irmãs (ZHANG et al., 2004; SPARDY et al., 2008). Acredita-se que a ativação de ALT pela E7 seja importante na manutenção do comprimento dos telômeros nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer (MOODY e LAIMINS, 2010).

Eventos oncogênicos adicionais, como a instabilidade genômica, são necessários para a progressão maligna ocorrer. As proteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco induzem de maneira independente a instabilidade genômica em células normais (WHITE et al., 1994), sendo uma característica de malignidades induzidas pelo HPV. A maioria de lesões malignas associadas ao HPV de alto risco possui um grande número de desequilíbrios cromossomais, incluindo ganho e perda de cromossomo e rearranjos cromossômicos (ZUR HAUSEN, 1999). A indução da instabilidade genética é um evento precoce nos cânceres induzidos pelo HPV, ocorrendo antes da integração do genoma viral no cromossomo do hospedeiro (DUENSING et al., 2001).

A ação combinada das proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco nos genes reguladores do ciclo celular para manter as células diferenciadas na fase S do ciclo celular também resulta na abolição de muitos pontos de checagem do ciclo celular. Isto leva a um acúmulo de mutações celulares ao longo do tempo e conseqüentemente a uma progressão ao câncer em células infectadas com HPV de alto risco. Além disso, a proteína E5 de HPV de alto

risco coopera com E6 e E7 na promoção da hiperproliferação de células infectadas e isto facilita a progressão ao câncer (DIMAIO e MATTOON, 2001).

1.2. Carcinoma Cervical

O Carcinoma Cervical é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado mundialmente, sendo a quarta causa de morte por câncer em mulheres (TORRE et al., 2015). No Brasil, em 2016, foram diagnosticados 16.340 novos casos com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2016). Em aproximadamente 99,7 % dos casos de câncer cervical a infecção pelo HPV de alto risco é relacionado como agente etiológico (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER et al., 2015). Os genótipos de HPV identificados com mais frequência em mulheres brasileiras diagnosticadas com carcinoma cervical foram HPV-16 (77,6%), HPV-18 (12,3%), HPV-31 (8,8%) HPV-33 (7,1%) e HPV-35 (5,9%) (DE OLIVEIRA et al., 2013).

O câncer cervical progride a partir de lesões pré-malignas não invasivas, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) ou lesões intraepiteliais escamosas (*squamous intraepithelial lesions* – SIL) (BASEMAN e KOUTSKY, 2005; DOORBAR, 2006). As alterações pré-malignas representam um espectro de anormalidades histológicas, variando desde do estágio inicial NIC I (displasia leve), NIC II (displasia moderada) até NIC III (displasia severa/carcinoma in situ) (WOODMAN et al., 2007).

A citologia cérvico-vaginal convencional é a estratégia mais importante em relação à prevenção do desenvolvimento do carcinoma cervical. O exame baseia-se na coloração de células epiteliais obtidas da cérvix, na expectativa de que anormalidades nucleares detectáveis sejam representativas de lesões subjacentes definidas histologicamente. Esse exame reduz a incidência do câncer de colo do útero ao permitir a detecção, possibilitando a excisão das lesões precursoras) antes do desenvolvimento do câncer invasivo. Apesar de o diagnóstico ser subjetivo, a citologia cérvico-vaginal é considerado o procedimento de maior sucesso no controle do câncer cervical, sendo observada

uma redução em até 70% na incidência de câncer cervical, com a aplicação efetiva desse exame em países desenvolvidos (BOSCH e HARPER, 2006).

O carcinoma cervical apresenta altas chances de cura se diagnosticado precocemente, e o tratamento nos estágios iniciais apresenta taxa de sobrevivência de cerca de 90%. Entretanto, o câncer metastático e recorrente apresenta um prognóstico ruim, com cerca de 17% de sobrevivência para pacientes em estágio avançado da doença (PFAENDLER e TEWARI, 2016).

Para as lesões classificadas como NIC I, as recomendações terapêuticas dependem do resultado da colposcopia. No caso de colposcopia satisfatória a paciente será preferencialmente encaminhada para o seguimento sem nenhuma abordagem terapêutica, uma vez que há uma alta probabilidade de regressão espontânea das lesões NIC I. O seguimento poderá ser realizado com citologias repetidas em 6 e 12 meses, citologia associada à colposcopia ou teste do HPV, ambos em 12 meses. Caso a opção seja tratar, pode-se realizar o tratamento por meio da crioterapia, da eletrocauterização, da ablação a laser. Em pacientes que apresentem NIC I recorrente após o tratamento ablativo recomenda-se uma abordagem excisional, que pode ser realizada por meio de cirurgia de alta frequência, conização a laser ou lâmina fria (AIDÉ et al., 2009).

Para os demais estágios (NIC II e NIC III) a melhor opção terapêutica para o câncer cervical é a combinação de quimioterapia baseada em cisplatina com a radiação. Entretanto, o uso clínico deste tratamento é limitado devido a diversos efeitos colaterais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade hematológica, quimioresistência e danos aos tecidos normais (ROSE et al., 1999; SEGOVIA-MENDOZA et al., 2015).

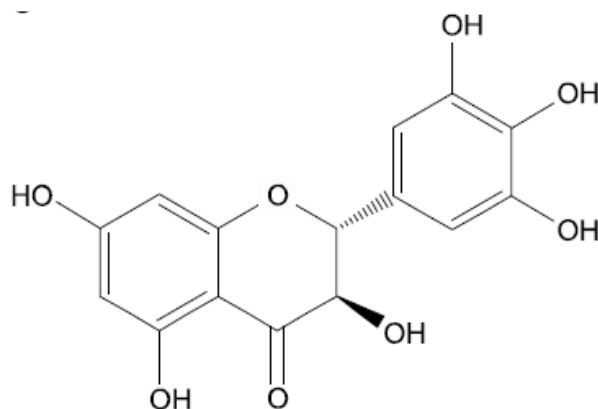
1.3. Curcumina

A curcumina é um pigmento polifenólico amarelo obtido da raiz da planta *Curcuma longa* (Turmeric). A *Curcuma longa* é uma planta perene que pertence à família Zingiberaceae presente na Índia e no Sudeste asiático (JURENKA, 2009), é uma planta rizomatosa que apresenta um rizoma principal piriforme, arredondado ou ovóide, carnudo com ramificações laterais compridas (SIMÕES,

2007). A curcumina já vem sendo utilizada como tempero, cosmético e fitoterápico na medicina oriental. Recentemente vem recebendo atenção nas áreas da medicina e nanotecnologia por possuir grande potencial terapêutico devido as suas propriedades anti-oxidante, anti-inflamatória, antineoplásica e antibacteriana (MENON e SUDHEER, 2007; AGRAWAL e MISHRA, 2010; MENG et al., 2013; CHEN et al., 2016).

A curcumina é um pó cristalino amarelo-alaranjado de estrutura química $C_{21}H_{20}O_6$ (FUGITA et al., 2012). É uma molécula polifenólica, apresenta coloração amarela intensa em pH ácido e vermelho em pH básico. Possui dois anéis aromáticos ligados por dois grupos de carbonilas insaturados (Figura 4), e a molécula é estabilizada por uma ponte de hidrogênio com um grupo central hidroxil (DARVESH et al., 2012). Esse composto apresenta-se insolúvel em água, mas solúvel em solventes apolares, como etanol, cetona, ácido acético e clorofórmio, nos quais resulta em soluções amarelas com fluorescências verdes (CHIGNELL et al., 1994).

Figura 4: Estrutura Química da Curcumina



Sua atividade anticâncer tem sido investigada para diversas linhagens celulares de câncer como de mama (TAKEDA et al., 2014; COLEMAN et al., 2015) de próstata (YALLAPU et al., 2014), de pulmão (CHEN et al., 2014), fígado (ZHANG et al., 2014) e pele (PHILLIPS et al., 2013). Adicionalmente a curcumina tem sido relacionada à indução de apoptose em inúmeras linhagens celulares,

tais como células de rim humanas CaKi (WOO et al., 2003), células de carcinoma escamoso de pele COLO-16 (HAIL, 2008), fibroblastos de camundongos L929 (THAYYULLATHIL et al., 2008) e células de adenocarcinoma de pulmão (CHEN et al., 2010).

Além dessas propriedades, observou-se que o tratamento com curcumina induz a morte celular em linhagens celulares de carcinoma cervical (HeLa, SiHa, CasKi e C33A) em uma maneira dose dependente (DIVYA e PILLAI, 2006; MAHER et al., 2011), além de inibir rapidamente a expressão da proteína E7 do HPV-16 após 24 e 48 horas de tratamento em células HPV-positivas (MAHER et al., 2011). Análises por RT-PCR mostraram que os níveis de mRNA de E6 e E7 também foram reduzidos após o tratamento com curcumina. Adicionalmente, observou-se que o tratamento com curcumina restaurou os níveis das proteínas p53, Rb e PTPN13 em linhagens HPV positivas, mas em linhagens celulares HPV negativas o tratamento com curcumina não alterou a expressão de p53 e Rb, indicando que a redução de E6/E7 mediada por curcumina resulta no aumento da expressão de proteínas supressoras de tumor que são inibidas pelas oncoproteínas do HPV-16 (MAHER et al., 2011).

Entretanto, a aplicação da curcumina como um agente ativo *in vivo* tem sido limitada pela sua baixa solubilidade em água e biodisponibilidade sistêmica, pobre farmacocinética e inatividade de produtos metabólitos (ANAND et al., 2007). Enquanto a curcumina é dissolvida em etanol, clorofórmio, acetona, DMSO e outros solventes orgânicos polares, sua solubilidade em água pura é estimada ser de, no máximo, 11 ng/ml (KAMINAGA et al., 2003). Além disso, a curcumina livre apresenta inadequada absorção pelos tecidos, degradação em pH alcalino e uma vez absorvida pelo corpo humano, a curcumina é rapidamente degradada e excretada (SHARMA et al., 2005b; ANAND et al., 2007). A administração oral da curcumina resulta em rápido metabolismo e circulação entero-hepática, assim altas doses de curcumina seriam necessárias para que os efeitos terapêuticos fossem alcançados (JORDAN et al., 2016).

Várias abordagens vêm sendo aplicadas para aumentar sua solubilidade e biodisponibilidade e assim aumentar sua atividade. A encapsulação da curcumina em lisossomos, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, encapsulação em ciclodextrina, em complexos lipídicos e nanopartículas tem sido utilizada como estratégia para aumentar a biodisponibilidade e atividade da curcumina (MA et al., 2008; GANTA e AMIJI, 2009; SHAIKH et al., 2009).

1.4. Nanotecnologia

A maior capacidade de solubilidade da curcumina é atingida utilizando o sistema de nanoemulsão de óleo em água (WANG et al., 2008). As nanoemulsões de óleo em água utilizando como fase oleosa uma cadeia de triacilgliceróis que continham 1% de curcumina mostraram um aumento significativo na sua atividade anti-inflamatória (WANG et al., 2008).

As nanoemulsões são uma classe de emulsões estáveis formadas por uma monocamada de fosfolipídeos compostos de um surfactante e um óleo vegetal suspensos em água (SADURNI et al., 2005). Embora as nanoemulsões tenham uma tendência para a separação de fases, as nanoemulsões cineticamente estáveis podem ser alcançadas com estabilidade de conservação e nenhuma floculação ou coalescência (GUTIÉRREZ et al., 2008). As vantagens das nanoemulsões incluem aumento da concentração do fármaco nos sistemas de entrega e aumento da biodisponibilidade. As moléculas de óleo mais amplamente utilizadas na síntese das nanoemulsões incluem ácidos graxos saturados e insaturados, ésteres de ácidos graxos e óleos de sojas. As moléculas surfactantes desempenham um papel importante na estabilização das nanoemulsões. Os surfactantes não iônicos e anfotéricos como os poloxâmeros, lecitina e Tween 80 são comumente usados. A combinação de vários surfactantes também tem sido utilizada para controlar o tamanho das nanoemulsões e melhorar a estabilidade das mesmas (CHEN et al., 2011). Os métodos utilizados para a produção das nanoemulsões incluem HPH (high pressure homogenization), microfluidização, ultrasonicação e emulsificação espontânea (CONSTANTINIDES et al., 2008).

Estes tipos de sistemas de entrega de fármacos por meio de nanoemulsões tem a habilidade de permitir que os compostos lipofílicos se comportem como compostos anfifílicos em sistemas biológicos, permitindo a entrega do fármaco encapsulado em uma matriz polar versus apolar, aumentando potencialmente a compatibilidade. Em adição, a diminuição do tamanho das formulações dos fármacos existentes, que são geralmente de centenas de nanômetros para um tamanho menor que 200 nanômetros, resulta em um aumento da captação celular (TADROS et al., 2004; SADURNI et al., 2005). Por causa da diminuição do tamanho da nanoemulsão durante seu processo de produção, a razão superfície-volume das nanoemulsões que contém o fármaco é acrescida, aumentando com isso a biodisponibilidade e eficácia do fármaco, como previamente reportados (THANOS et al., 2003; KUMAR et al., 2004; MERISKO-LIVERSIDGE et al., 2004).

O uso da nanotecnologia é uma estratégia importante para incorporar fármacos fotossensíveis com baixa solubilidade em água, o que acaba comprometendo o seu uso clínico. Além disso, os sistemas de entrega desses fármacos baseado em nanotecnologia pode melhorar a transcitose de um fármaco fotossensível através de barreiras epiteliais e endoteliais (CALIXTO et al., 2014). Assim, a aplicação da nanotecnologia na medicina, pode ampliar as possibilidades de tratamento e melhorar a eficácia de terapias disponíveis.

1.5.Terapia Fotodinâmica

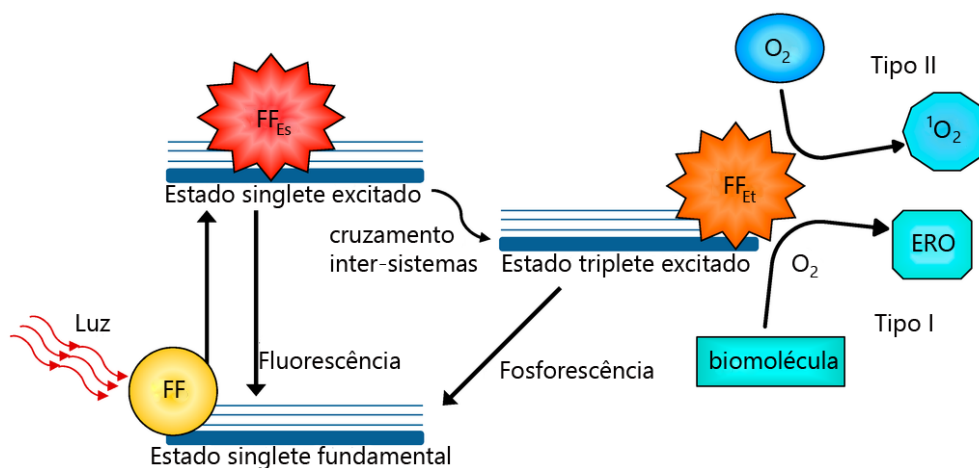
Já foi demonstrado que diversos dos efeitos terapêuticos da curcumina podem ser potencializados com a sua associação com a luz. (AHN et al., 2012; ARAUJO et al., 2012; ELLERKAMP et al., 2016). Assim, a curcumina tem chamado a atenção como agente fotossensibilizante na Terapia Fotodinâmica (TFD), podendo assim aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais.

TFD é considerada uma modalidade de tratamento alternativo para diversos tipos de cânceres (DOLMANS et al., 2003; CALIXTO et al., 2014). Neste tratamento, um agente fotossensível não tóxico é administrado aos pacientes

com exposição subsequente a uma fonte de luz que apresente um comprimento de onda específico e que vai levar as células à morte por meio de danos oxidativos (MROZ et al., 2011). Para a realização da TFD é necessária a presença simultânea de três componentes: um fármaco fotossensível (FF), uma fonte de luz e oxigênio. Para a eficiência da técnica, nenhum desses componentes devem ser tóxicos individualmente (LIM et al., 2012).

Quando o FF 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 5).

Figura 5: Reações do Tipo I e Tipo II em Terapia Fotodinâmica. Diagrama de Jablonski mostrando o mecanismo de ação de TFD. Após a absorção da luz, o FF atinge um estado singlete excitado. Após o cruzamento intersistemas, o FF (agora em estado excitado) pode reagir em duas vias: reagir com biomoléculas através da transferência de um átomo de hidrogênio (elétron) para formar radicais, que reagem com o oxigênio molecular para gerar EROs (reação do tipo I); ou o FF no estado tripleto pode reagir diretamente com o oxigênio através de transferência de energia, gerando o oxigênio singlete (Reação do tipo II). FF: fármaco fotossensível; FF_{Es} : fármaco fotossensível no estado singlete excitado; FF_{Et} : fármaco fotossensível no estado tripleto excitado; ERO: espécies reativas de oxigênio; 1O_2 : oxigênio singlete.



Na reação do tipo I, o FF no estado tripleto excitado pode abstrair prótons ou reagir com biomoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) transferindo elétrons, e gerando radicais livres ou íons radicais. Ao reagir com o oxigênio molecular, esses radicais levam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KHARKWAL et al., 2011).

No mecanismo do tipo II, há transferência direta de energia para o oxigênio molecular, que na natureza se encontra no estado triplete, levando à formação de oxigênio singlete excitado ($^1\text{O}_2$). O oxigênio singlete produzido pela reação do tipo II é um agente altamente citotóxico, capaz de matar diretamente células neoplásicas através da indução de apoptose e/ou necrose (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Ambos os tipos de reações ocorrem simultaneamente e o balanço entre os dois processos depende do FF utilizado, da concentração de oxigênio, do substrato, e da afinidade do FF com o substrato. Entretanto, a geração de oxigênio singlete pela reação do tipo II é considerado o principal mecanismo para levar a morte celular em TFD (MACDONALD e DOUGHERTY, 2001).

Espécies reativas de oxigênio e o oxigênio singlete possuem alta reatividade e meia-vida curta. Dessa maneira, TFD afeta diretamente somente os substratos biológicos que estão próximos a região onde as espécies são geradas (ALLISON e MOGHISSI, 2013).

Os avanços na área de Terapia Fotodinâmica estão ocorrendo principalmente para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o câncer e para doenças não infecciosas como o vitiligo, degeneração macular e psoríase (EPSTEIN, 1999). Os tipos de câncer que já vem sendo tratados com o auxílio da TFD são os cânceres do trato digestivo (NANASHIMA e NAGAYASU, 2015; SHAH e GERDES, 2015), esôfago (YANO et al., 2012), lesões de cabeça e pescoço (GREEN et al., 2013), pulmão (SIMONE e CENGEL, 2014), próstata (PATEL et al., 2008), cérebro (KOSTRON, 2010), bexiga (BERGER et al., 2003), carcinoma basocelular (BASSET-SEGUIN et al., 2008).

TFD apresenta diversas vantagens em relação às abordagens de tratamento convencional para o câncer. Primeiramente, a TFD não apresenta efeitos colaterais a longo prazo, tendo uma ação mais localizada (O'CONNOR et al., 2009). Além disso é menos invasiva do que os procedimentos cirúrgicos convencionais, e os efeitos colaterais são mais curtos e brandos em comparação com os efeitos da radioterapia e quimioterapia (ALLISON e MOGHISSI, 2013). Adicionalmente, a TFD pode ser dirigida a um tecido alvo com muita precisão

devido a sua seletividade dupla (somente as áreas que são irradiadas e que receberam o FF simultaneamente são afetadas). Assim, pode ser repetido várias vezes no mesmo local, ao contrário da radiação. Além de ter um custo menor do que os outros tratamentos para o câncer (BROWN et al., 2004)

A escolha do FF é um ponto crítico para o sucesso do tratamento com TFD. O FF deve preferencialmente ser excitado pela luz em um comprimento de onda que esteja dentro da janela terapêutica (600-700 nm), e que apresenta grande capacidade de penetração de tecidos. É importante que o FF não seja tóxico para as células no escuro, ou seja não deve levar a morte celular na ausência da luz (CALIXTO et al., 2014).

Em suma, o objetivo essencial da TFD é induzir uma morte celular do tecido neoplásico por um processo de fotossensibilização que ativa vias apoptóticas ou necróticas, enquanto minimiza os danos causados aos tecidos vizinhos e efeitos colaterais indesejáveis no tratamento.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica na viabilidade celular usando nanoemulsões com curcumina como fármaco fotossensibilizante em linhagens de carcinoma cervical HPV-16 positivas cultivadas em monocultura.

Objetivos Específicos:

- 1.** Padronizar a concentração de nanoemulsão contendo curcumina (NE-CUR), nanoemulsão vazia (NE) e curcumina livre que apresentam porcentagem de citotoxicidade celular menor que 20% em linhagens de carcinoma cervical HPV-16 positiva (CasKi e SiHa).
- 2.** Avaliar a captação celular de curcumina em diferentes tempos de incubação com NE-CUR e Curcumina livre em CasKi e SiHa.
- 3.** Analisar a fototoxicidade da NE-CUR e da Curcumina Livre no sistema de Terapia Fotodinâmica em linhagens de carcinoma cervical HPV-16 positiva (CasKi e SiHa).
- 4.** Analisar a ação das NE-CUR e da Curcumina Livre no processo de apoptose em CasKi e SiHa.
- 5.** Comparar os efeitos da curcumina em células de carcinoma cervical CasKi e SiHa com a linhagem de queratinócitos humanos imortalizados HaCat.

3. Material e Métodos

3.1. Nanoemulsões

As nanoemulsões foram sintetizadas pelo Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual da USP de Ribeirão Preto, sob coordenação do Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco. As nanoemulsões contendo curcumina, do tipo água em óleo, foram preparadas pela solubilização da curcumina na fase oleosa e então esta fase foi homogeneizada com a fase aquosa contendo um emulsificante hidrofílico. A nanoemulsão vazia, foi preparada com as mesmas substâncias exceto a curcumina. Os detalhes das formulações e metodologia de preparação das nanoemulsões estão em processo de requisição de patente e devem ser protegidas de acordo com a regulação da agência Brasileira de patentes **(Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI07063210).**

3.2. Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz e índice de polidispersão

Nos estudos do tamanho das partículas, índice de polidispersão (IPd) e potencial Zeta foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano system ZS da Malvern-UK, que possui um laser de He-Ne de 4 mW que opera no comprimento de onda de 633 nm, permitindo realizar medidas não invasivas por *backscatter optics* (NIBS), e possui a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2 nm a 3 µM. As medidas foram realizadas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medida na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. O diâmetro hidrodinâmico das partículas coloidais foi determinado empregando-se a espectroscopia de fotocorrelação por espalhamento dinâmico de luz.

O potencial zeta foi determinado a partir da medida da mobilidade eletroforética das amostras, para as análises 30 µL da amostra foi diluída em 3 mL de água ultra pura.

Foram avaliados os tamanhos de partículas, o índice de polidispersão da nanoemulsão e o potencial zeta na ausência e presença do curcuminóide 4-hidroxi-3-metoxifenil-hepta-1,6-dien-3,5-diona, por um período de 2 meses e meio, verificando-se assim a influência direta da incorporação deste na formulação.

As leituras foram realizadas utilizando-se o conjunto de cubetas de acrílico padronizadas do próprio equipamento e os dados foram fornecidos pelo software Zetasizer versão 6.01.

3.3. Estudo da estabilidade da nanoemulsão

A estabilidade das formulações lipossomais foi investigada num período de 90 dias avaliando-se regularmente o tamanho das vesículas a cada 15 dias. As análises foram realizadas através de medida direta, como descrito em 3.2. As determinações foram feitas em triplicatas a 25°C. As amostras utilizadas foram estocadas em temperatura ambiente e protegidas da luz.

3.4. Cultivo e Manutenção de linhagens celulares

As linhagens celulares de carcinoma cervical CasKi e SiHa contendo o genoma de HPV-16 e a linhagem de queratinócito humano imortalizado HaCat foram cordialmente doadas pela Dra. Luisa Lina Villa. As células HaCat foram utilizadas para fins de comparação, pois trata-se de uma linhagem não-neoplásica.

Estas linhagens foram mantidas em meio essencial mínimo modificado Dulbeco (DMEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY, 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 (GIBCO-BRL). Durante o cultivo as células foram mantidas em incubadora monitorada por uma controladora digital a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em garrafa de poliestireno de 75cm² com dispositivo de aeração acoplado à tampa com filtro, sendo que as células foram repicadas segundo a necessidade.

Com essa finalidade, o meio de cultura da garrafa foi descartado e o tapete celular lavado com PBS. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 2 mL de tripsina e a cultura foi mantida em estufa a 37°C na presença de 5% CO₂. A monocamada foi monitorada no microscópio invertido de luz para verificar o desprendimento das células. Posteriormente, a solução de tripsina foi misturada ao meio de cultura completo e houve homogeneização da suspensão. Parte da solução resultante foi devolvida à garrafa e o volume foi completado com meio de cultura fresco. Finalmente, a garrafa foi incubada em estufa e utilizada nos experimentos até atingir cerca de 20 passagens.

Toda manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar, esterilizada com luz germicida e fluxo contínuo de ar.

3.5. Ensaio de viabilidade celular nas linhagens de carcinoma celular (Caski e SiHa) e na linhagem de queratinócito humano (HaCat)

Para determinar a citotoxicidade das nanoemulsões contendo curcumina em linhagens derivadas de carcinoma celular Caski e SiHa, na linhagem não neoplásica, HaCat, foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT) em células HaCat. O teste de MTT é um teste amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células isoladas. Esta técnica avalia a atividade metabólica celular, quantificando a redução metabólica no MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Desidrogenases mitocondriais das células viáveis clivam os anéis de tetrazólio, resultando na produção de cristais de formazan que são insolúveis em soluções aquosas e são dissolvidos em solventes orgânicos como o DMSO. A solução roxa resultante é medida por espectrofotometria com absorção em 570 nm. A estratégia da técnica depende da atividade mitocondrial das células vivas, que está diretamente relacionada com o metabolismo que resulta na produção do formazan.

Depois de estabelecida a fase de confluência as células foram descoladas com tripsina e 2,0x10⁴ de células Caski e SiHa, e 1,5x10⁴ células de HaCat foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C na estufa com 5% de CO₂

e mantidas em DMEM contendo 2,5% de soro fetal bovino e incubadas por 24 horas para adesão.

A curcumina livre foi diluída em DMSO, onde foi feita uma solução estoque de 80 mM, respeitando a concentração máxima de 5% de DMSO.

As células foram tratadas com 2, 5, 10, 20 e 40 μ M de curcumina livre e doses equivalentes de nanoemulsões (NE-CUR) contendo curcumina. Também foram analisadas nanoemulsões vazias (NE) (sem curcumina). O ensaio foi realizado nos intervalos de tempo de 6, 12 e 24 horas de incubação com as nanopartículas. Após estes períodos, o meio contendo as nanoemulsões foi aspirado e posteriormente adicionado 100 μ l/poço de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) (1mg/mL) diluído em meio DMEM e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C na estufa. Após, o MTT foi aspirado e adicionou-se 100 μ l/poço de DMSO. Agitou-se a placa por 5 minutos a 60 rpm e em seguida foi realizada a leitura em leitor de placas (FluOstar Omega – BMG Labtech) em comprimento de ondas de 570 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em dois ensaios independentes para análise estatística.

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

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

3.6. Microscopia de fluorescência para análise de captação de curcumina em linhagem de queratinócito humano

A curcumina é naturalmente fluorescente na zona verde do espectro visível. Para analisar a captação de curcumina encapsulada em nanoemulsões, as células CasKi, SiHa e HaCat foram semeadas em placas de petri de 40 mm de diâmetro, permitindo o crescimento a níveis subconfluentes. Após a adesão, as células foram incubadas com NE-CUR à concentração de 20 μ M, e incubadas

com curcumina livre na concentração de 5 μM para células CasKi e 10 μM para células SiHa e HaCat. As concentrações utilizadas foram selecionadas previamente por meio do ensaio de MTT. Após 3, 6, 12, 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 480, *blue laser*, 415 ± 15 nm, FITC/GFP).

3.7. Ensaio de Fototoxicidade

Foi avaliado o efeito da Terapia Fotodinâmica sob as linhagens derivadas de carcinoma celular (CasKi e SiHa) e sob a cultura celular não neoplásica (HaCat) na presença da curcumina livre e encapsulada em nanoemulsões, como agente fotossensibilizante. Com base nos estudos de citotoxicidade, puderam ser estabelecidas as condições de trabalho para a aplicação da TFD. Tendo em vista que a concentração de 20 μM de curcumina encapsulada não apresentou citotoxicidade no escuro, adotou-se esse valor para os ensaios com fotoestímulo. Já para a curcumina livre foram utilizadas as concentrações de 5 μM para o tratamento de células CasKi e 10 μM para células SiHa e HaCat.

Depois de estabelecida a fase de confluência, as células CasKi, SiHa e HaCat foram descoladas com tripsina e semeadas na densidade de 2×10^4 células em placas de 96 poços 24 horas antes do tratamento para adesão. Então foram incubadas por 3 horas com as NE e NE-CUR na concentração de 20 μM . Após a incubação o meio contendo as nanoemulsões foi retirado e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS, em seguida foram adicionados 150 μL /poço de meio DMEM sem soro fetal bovino e sem fenol vermelho. Em seguida a cultura foi submetida à irradiação de laser na dose de 50 J/cm^2 por 4 minutos. Para irradiação foi utilizado o sistema laser diodo Eagle modelo Heron (Quantum Tech, São Carlos, Brasil) no comprimento de onda de emissão em 670 nm acoplado a uma fibra ótica operando no máximo de 830 mW de potência.

Ao término da irradiação, o meio foi removido e adicionado meio de cultura sem vermelho fenol e com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas foi realizado

o ensaio de viabilidade celular tipo MTT para a avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item 3.5.

Para efeito de comparação e para determinar se as reduções nas taxas de viabilidade celular foram em decorrência do dano fotooxidativo, foram realizados tratamentos com NE e NE-CUR, nos quais foram aplicadas as mesmas condições, exceto pela fotoativação da Terapia Fotodinâmica.

Com o objetivo de avaliar se o efeito da Terapia Fotodinâmica era intensificado com doses extras de irradiação, também foi realizado um sistema de tratamento no qual as células foram irradiadas em dois momentos: após 3 horas e após 48 horas de incubação com as nanoemulsões para a linhagem celular CasKi e HaCat; e após 3 horas e 36 horas de incubação para a linhagem SiHa. Para as células tratadas com curcumina livre a segunda dose de irradiação foi aplicada após 12 horas em células CasKi e SiHa e após 48 horas em células HaCat. O período que ocorreu a segunda irradiação foi determinado pelo ensaio de captação intracelular por microscopia de fluorescência, sendo o último tempo em que foi detectada a curcumina intracelularmente.

Os valores obtidos foram normalizados com o controle, ou seja, células que foram submetidas às mesmas condições de cada ensaio e sem a adição da formulação em estudo, e expressos em valor de porcentagem e viabilidade.

3.8. Ensaio de apoptose por meio da detecção da atividade enzimática da Caspase-3/7

O ensaio de apoptose por meio da detecção da atividade enzimática da Caspase-3/7 em células CasKi, SiHa e HaCat foi realizado após o tratamento com a curcumina livre e associada à nanoemulsão associado à Terapia Fotodinâmica. Para este ensaio, $2,5 \times 10^4$ das células CasKi, SiHa e HaCat foram aderidas em placas de 96 poços para luminômetro. A placa foi preparada conforme as instruções do kit, contendo branco (sem células), controle negativo (células sem tratamento), e células submetidas aos tratamentos com NE-CUR, NE e curcumina livre. Após 24 horas, as células foram incubadas com NE-CUR (20 μ M), NE e curcumina livre (5 μ M para células CasKi e 10 μ M para células

SiHa e HaCaT) e no grupo controle negativo foi adicionado somente meio de cultura. As células foram incubadas por 3 horas, após esse período o meio contendo as nanoemulsões foi retirado e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS, em seguida foi adicionado 100 µL/poço de meio DMEM sem soro fetal bovino e sem fenol vermelho. Em seguida a cultura foi submetida à irradiação de laser na dose de 50 J/cm² por 4 minutos. Ao término da irradiação, o meio foi removido e adicionado meio de cultura sem fenol e com 10% de soro fetal bovino.

Após a irradiação as células CasKi permaneceram incubadas com NE-CUR por 4 horas e 30 minutos e as células SiHa e HaCat por 8 horas. As células tratadas com Curcumina livre o ensaio de caspase foi realizado após 24 horas. Esse período foi determinado por meio de um ensaio de MTT realizado com 3, 6, 9 e 12 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foi escolhido o período em que foi possível observar aproximadamente 50% de viabilidade celular. O ensaio de apoptose foi realizado após uma dose de irradiação, pois como visto no ensaio de fototoxicidade após duas doses de irradiação observa-se menos de 5% de viabilidade celular sendo inviável a realização do ensaio de avaliação da atividade enzimática das caspases. Após a incubação, adicionou-se ao meio de cultura 100 µL (1:1) do Reagente Caspase-Glo™ (Promega USA) em cada poço, submetendo a placa a agitação a 4000 RPM durante 30 segundos. As placas foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente e em seguida foi realizada a leitura luminescente de cada amostra.

Este kit contém um substrato luminescente com a sequência tetrapeptídica que é reconhecida pela caspase-3 e 7 e a luciferase termoestável (ZDEVD-AMC). O reagente Caspase-Glo™ (Promega, EUA) promove a lise celular, seguido pela clivagem do substrato pela caspase 3/7 nas células onde sua ativação foi induzida e liberando a aminoluciferina que posteriormente passa a ser consumida pela luciferase. O sinal luminescente produzido é proporcional a atividade da caspase3/7 presente na amostra.

Os valores de luminescência obtidos foram normalizados em relação às células controle (células que foram submetidas às mesmas condições do ensaio,

mas sem adição de formulação). O percentual de atividade da caspase foi calculada de acordo com a seguinte relação:

$$\text{Atividade da caspase: (UL amostra/UL controle) X 100\%}$$

3.9. Análise estatísticas

Os dados de citotoxicidade, fototoxicidade, atividade enzimática de caspase 3 e 7 foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e de homogeneidade das variâncias de Leven. Os dados com distribuição anormal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados com distribuição normal foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) ou Teste T, quando apropriados. O nível de significância adotado foi de 5% e o software empregado foi o Graphpad Prism 5.0.

4. Referências

- AGRAWAL, D. K.; MISHRA, P. K. Curcumin and its analogues: potential anticancer agents. **Med Res Rev**, v. 30, n. 5, p. 818-60, Sep 2010.
- AHN, J. C.; KANG, J. W.; SHIN, J. I. et al. Combination treatment with photodynamic therapy and curcumin induces mitochondria-dependent apoptosis in AMC-HN3 cells. **Int J Oncol**, v. 41, n. 6, p. 2184-90, Dec 2012.
- AIDÉ, S.; GUTEMBERG, A.; VAL, I. et al. Cervical Intraepithelial Neoplasia. **J bras Doenças Sex Transm**, v. 21, n.2, 2009
- ALI, M. S.; ALAM, M. S.; ALAM, N. et al. Preparation, characterization and stability study of dutasteride loaded nanoemulsion for treatment of benign prostatic hypertrophy. **Iran J Pharm Res**, v. 13, n. 4, p. 1125-40, Fall 2014.
- ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. **Clin Endosc**, v. 46, n. 1, p. 24-9, Jan 2013.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**, v. 4, n. 6, p. 807-18, Nov-Dec 2007.
- ARAÚJO, N. C.; FONTANA, C. R.; BAGNATO, V. S. et al. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 7, p. 393-9, Jul 2012.
- BAKER, C. C.; PHELPS, W. C.; LINDGREN, V. et al. Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **J Virol** **61**, v. 61, p. 962–971, 1897.
- BAKER, M. L.; FIGUEROA-DOWNING, D.; CHIANG, E. D. et al. Paving pathways: Brazil's implementation of a national human papillomavirus immunization campaign. **Rev Panam Salud Publica**, v. 38, n. 2, p. 163-6, Aug 2015.
- BANERJEE, S.; PRASAD, P.; HUSSAIN, A. et al. Remarkable photocytotoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its degradation on oxovanadium(IV) complex formation. **Chem Commun (Camb)**, v. 48, n. 62, p. 7702-4, Aug 11 2012.
- BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S16-24, Mar 2005.

BASSET-SEGUIN, N.; IBBOTSON, S. H.; EMTESTAM, L. et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: a 5 year randomized trial. **Eur J Dermatol**, v. 18, n. 5, p. 547-53, Sep-Oct 2008.

BEACK, S.; KONG, W. H.; JUNG, H. S. et al. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot - chlorin e6 - hyaluronate conjugate. **Acta Biomater**, Aug 20 2015.

BENNETT, M. D.; REISS, A.; STEVENS, H. et al. The first complete papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from Bettongia penicillata. **J Virol**, v. 84, n. 10, p. 5448-53, May 2010.

BERGER, A. P.; STEINER, H.; STENZL, A. et al. Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study. **Urology**, v. 61, n. 2, p. 338-41, Feb 2003.

BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antivir Ther**, v. 7, n. 4, p. 219-37, Dec 2002.

BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-9, May 25 2010.

BISHT, S.; MAITRA, A. Systemic delivery of curcumin: 21st century solutions for an ancient conundrum. **Curr Drug Discov Technol**, v. 6, n. 3, p. 192-9, Sep 2009.

BOSCH, X.; HARPER, D. Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. **Gynecol Oncol**, v. 103, n. 1, p. 21-4, Oct 2006.

BOYER, S. N.; WAZER, D. E.; BAND, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. **Cancer Res**, v. 56, n. 20, p. 4620-4, Oct 15 1996.

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.

BRUZELL, E. M.; MORISBAK, E.; TONNESEN, H. H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. **Photochem Photobiol Sci**, v. 4, n. 7, p. 523-30, Jul 2005.

CALIXTO, G.; BERNEGOSI, J.; FONSECA-SANTOS, B. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 3719-35, 2014.

CASTAGANOS, P.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; GOTO, P. L. et al. Catanionic vesicles charged with chloroaluminium phthalocyanine for topical photodynamic therapy. In vitro phototoxicity towards human carcinoma and melanoma cell lines. **Rsc Advances**, v. 4, p. 39372-39377, 2014.

CENTER, I. H. P. R. International Human Papillomavirus Reference Center.
<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html?%3C?php> echo time%28%29; ?%3E., 2015.

CHELLAPPAN, S.; KRAUS, V. B.; KROGER, B. et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 10, p. 4549-53, May 15 1992.

CHEN, H.; KHEMTONG, C.; YANG, X. et al. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. **Drug Discov Today**, v. 16, n. 7-8, p. 354-60, Apr 2011.

CHEN, J.; HE, Z. M.; WANG, F. L. et al. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. **Eur J Pharmacol**, v. 772, p. 33-42, Feb 5 2016.

CHEN, Q.; WANG, Y.; XU, K. et al. Curcumin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Oncol Rep**, v. 23, n. 2, p. 397-403, Feb 2010.

CHEN, Q. Y.; ZHENG, Y.; JIAO, D. M. et al. Curcumin inhibits lung cancer cell migration and invasion through Rac1-dependent signaling pathway. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 2, p. 177-85, Feb 2014.

CHENG, S.; SCHMIDT-GRIMMINGER, D. C.; MURANT, T. et al. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. **Genes Dev**, v. 9, n. 19, p. 2335-49, Oct 1 1995.

CHIGNELL, C. F.; BILSKI, P.; RESZKA, K. J. et al. Spectral and photochemical properties of curcumin. **Photochem Photobiol**, v. 59, n. 3, p. 295-302, Mar 1994.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 422-49, Jun 2010.

COLEMAN, D. T.; SOUNG, Y. H.; SURH, Y. J. et al. Curcumin Prevents Palmitoylation of Integrin beta4 in Breast Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125399, 2015.

CONSTANTINIDES, P. P.; CHAUBAL, M. V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 6, p. 757-67, Mar 17 2008.

COPPER, M. P.; TRIESSCHEIJN, M.; TAN, I. B. et al. Photodynamic therapy in the treatment of multiple primary tumours in the head and neck, located to the oral cavity and oropharynx. **Clin Otolaryngol**, v. 32, n. 3, p. 185-9, Jun 2007.

DARVESH, A. S.; AGGARWAL, B. B.; BISHAYEE, A. Curcumin and liver cancer: a review. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 13, n. 1, p. 218-28, Jan 2012.

DAS, P.; THOMAS, A.; MAHANTSHETTY, U. et al. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41012, 2012.

DE OLIVEIRA, C. M.; FREGNANI, J. H.; CARVALHO, J. P. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC Cancer**, v. 13, p. 357, 2013.

DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; PINTO, M. R. et al. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 380, p. 372-376, 2015.

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

DE WITTE, C. J.; VAN DE SANDE, A. J.; VAN BEEKHUIZEN, H. J. et al. Imiquimod in cervical, vaginal and vulvar intraepithelial neoplasia: a review. **Gynecol Oncol**, v. 139, n. 2, p. 377-84, Nov 2015.

DEGREGORI, J.; JOHNSON, D. G. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. **Curr Mol Med**, v. 6, n. 7, p. 739-48, Nov 2006.

DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7866-73, Nov 26 2001.

- DIVYA, C. S.; PILLAI, M. R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. **Mol Carcinog**, v. 45, n. 5, p. 320-32, May 2006.
- DOBSON, S. R.; MCNEIL, S.; DIONNE, M. et al. Immunogenicity of 2 doses of HPV vaccine in younger adolescents vs 3 doses in young women: a randomized clinical trial. **JAMA**, v. 309, n. 17, p. 1793-802, May 1 2013.
- DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-7, May 2003.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**, v. 110, n. 5, p. 525-41, May 2006.
- DUENSING, S.; DUENSING, A.; CRUM, C. P. et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. **Cancer Res**, v. 61, n. 6, p. 2356-60, Mar 15 2001.
- DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev**, v. 12, n. 15, p. 2245-62, Aug 1 1998.
- ELLERKAMP, V.; BORTEL, N.; SCHMID, E. et al. Photodynamic Therapy Potentiates the Effects of Curcumin on Pediatric Epithelial Liver Tumor Cells. **Anticancer Res**, v. 36, n. 7, p. 3363-72, Jul 2016.
- EPSTEIN, J. H. Phototoxicity and photoallergy. **Semin Cutan Med Surg**, v. 18, n. 4, p. 274-84, Dec 1999.
- FRANCO, E. L.; HARPER, D. M. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. **Vaccine**, v. 23, n. 17-18, p. 2388-94, Mar 18 2005.
- FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2004.
- FUGITA, R. A.; GÁLICO, D. A.; GUERRA, R. B. et al. Thermal behavior of curcumin. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v. 01, 2012.
- GANTA, S.; AMIJI, M. Coadministration of Paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. **Mol Pharm**, v. 6, n. 3, p. 928-39, May-Jun 2009.

GARLAND, S. M.; KJAER, S. K.; MUNOZ, N. et al. Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: A Systematic Review of 10 Years of Real-world Experience. **Clin Infect Dis**, May 26 2016.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER, C.; FITZMAURICE, C.; DICKER, D. et al. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncol**, v. 1, n. 4, p. 505-27, Jul 2015.

GOLDBERG, M. A.; SCHNEIDER, T. J. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. **J Biol Chem**, v. 269, n. 6, p. 4355-9, Feb 11 1994.

GREEN, B.; COBB, A. R.; HOPPER, C. Photodynamic therapy in the management of lesions of the head and neck. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 51, n. 4, p. 283-7, Jun 2013.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A. et al. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 86, p. 245-251, 2008.

HAIL, N., JR. Mitochondrial reactive oxygen species affect sensitivity to curcumin-induced apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 7, p. 1382-93, Apr 1 2008.

HALF, E.; ARBER, N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 2, p. 211-9, Feb 2009.

HAN, S. S.; KEUM, Y. S.; SEO, H. J. et al. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. **J Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 3, p. 337-42, May 31 2002.

HERBST, L. H.; LENZ, J.; VAN DOORSLAER, K. et al. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. **Virology**, v. 383, n. 1, p. 131-5, Jan 5 2009.

HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **Lancet Oncol**, v. 1, p. 212-9, Dec 2000.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 324-34, Feb 20 2009.

HOWLEY, P. M. L., D.R. **Papillomaviruses. Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott, Williams, Wilkins: Knipe DM, 2007.

HUANG, A. C.; LIN, S. Y.; SU, C. C. et al. Effects of curcumin on N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)-induced lung and liver tumorigenesis in BALB/c mice in vivo. **In Vivo**, v. 22, n. 6, p. 781-5, Nov-Dec 2008.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **EMBO J**, v. 10, n. 13, p. 4129-35, Dec 1991.

IARC. Human papillomaviruses **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 90, p. 1-636, 2007.

ICTV. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2001.
Disponível em: < <http://www.ictvonline.org> >.

INCA. 2016. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoec_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/conceito_magnitude >. Acesso em: 02.11.2016.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr 2011.

JERJES, W.; UPILE, T.; AKRAM, S. et al. The surgical palliation of advanced head and neck cancer using photodynamic therapy. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 22, n. 9, p. 785-91, Nov 2010.

JIAO, Y.; WILKINSON, J. T.; DI, X. et al. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. **Blood**, v. 113, n. 2, p. 462-9, Jan 8 2009.

JONES, D. L.; ALANI, R. M.; MUNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. **Genes Dev**, v. 11, n. 16, p. 2101-11, Aug 15 1997.

JONES, D. L.; THOMPSON, D. A.; MUNGER, K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 97-107, Dec 8 1997.

JORDAN, B. C.; MOCK, C. D.; THILAGAVATHI, R. et al. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment. **Life Sci**, v. 152, p. 135-44, May 1 2016.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Altern Med Rev**, v. 14, n. 2, p. 141-53, Jun 2009.

KAMINAGA, Y.; NAGATSU, A.; AKIYAMA, T. et al. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **FEBS Lett**, v. 555, n. 2, p. 311-6, Dec 4 2003.

KAYE, A. H.; MORSTYN, G.; BROWNBILL, D. Adjuvant high-dose photoradiation therapy in the treatment of cerebral glioma: a phase 1-2 study. **J Neurosurg**, v. 67, n. 4, p. 500-5, Oct 1987.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y. et al. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers Surg Med**, v. 43, n. 7, p. 755-67, Sep 2011.

KLOZAR, J.; TACHEZY, R.; ROTNAGLOVA, E. et al. Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects. **Wien Med Wochenschr**, v. 160, n. 11-12, p. 305-9, Jun 2010.

KOLLIPARA, R.; EKHLASSI, E.; DOWNING, C. et al. Advancements in Pharmacotherapy for Noncancerous Manifestations of HPV. **J Clin Med**, v. 4, n. 5, p. 832-46, 2015.

KOSTRON, H. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain. **Methods Mol Biol**, v. 635, p. 261-80, 2010.

KUMAR, R.; CHEN, M. H.; PARMAR, V. S. et al. Supramolecular assemblies based on copolymers of PEG600 and functionalized aromatic diesters for drug delivery applications. **J Am Chem Soc**, v. 126, n. 34, p. 10640-4, Sep 1 2004.

LACEY, C. J. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. **J Clin Virol**, v. 32 Suppl 1, p. S82-90, Mar 2005.

LIEDER, A.; KHAN, M. K.; LIPPERT, B. M. Photodynamic therapy for recurrent respiratory papillomatosis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 6, p. CD009810, 2014.

LIM, M. E.; LEE, Y. L.; ZHANG, Y. et al. Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1912-20, Feb 2012.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 2, p. 362-72, Jun 2004.

MA, Z.; HADDADI, A.; MOLAVI, O. et al. Micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization, stabilization, and controlled delivery of curcumin. **J Biomed Mater Res A**, v. 86, n. 2, p. 300-10, Aug 2008.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **J. Porphyr. Phthalocyanines**, v. 5, p. 105-129, 2001.

MAHER, D. M.; BELL, M. C.; O'DONNELL, E. A. et al. Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, Rb, and PTPN13 proteins and inhibits benzo[a]pyrene-induced upregulation of HPV E7. **Mol Carcinog**, v. 50, n. 1, p. 47-57, Jan 2011.

MASSIMI, P.; GAMMOH, N.; THOMAS, M. et al. HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. **Oncogene**, v. 23, n. 49, p. 8033-9, Oct 21 2004.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F. et al. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, v. 82, n. 1, p. 15-33, Feb 2001.

MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T. et al. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 56, n. 2, p. 189-96, Sep 2003.

MENG, B.; LI, J.; CAO, H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 11, p. 2101-13, 2013.

MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. **Adv Exp Med Biol**, v. 595, p. 105-25, 2007.

MERISKO-LIVERSIDGE, E.; MCGURK, S. L.; LIVERSIDGE, G. G. Insulin nanoparticles: a novel formulation approach for poorly water soluble Zn-insulin. **Pharm Res**, v. 21, n. 9, p. 1545-53, Sep 2004.

METZLER, M.; PFEIFFER, E.; SCHULZ, S. I. et al. Curcumin uptake and metabolism. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 14-20, Jan-Feb 2013.

MILACIC, V.; BANERJEE, S.; LANDIS-PIWOWAR, K. R. et al. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v. 68, n. 18, p. 7283-92, Sep 15 2008.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-60, Aug 2010.

MORRIS, M.; EIFEL, P. J.; LU, J. et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 340, n. 15, p. 1137-43, Apr 15 1999.

MROZ, P.; HASHMI, J. T.; HUANG, Y. Y. et al. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 7, n. 1, p. 75-91, Jan 2011.

MUNOZ, N.; MENDEZ, F.; POSSO, H. et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. **J Infect Dis**, v. 190, n. 12, p. 2077-87, Dec 15 2004.

NANASHIMA, A.; NAGAYASU, T. Current status of photodynamic therapy in digestive tract carcinoma in Japan. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 2, p. 3434-40, 2015.

NEBESIO, C. L.; MIROWSKI, G. W.; CHUANG, T. Y. Human papillomavirus: clinical significance and malignant potential. **Int J Dermatol**, v. 40, n. 6, p. 373-9, Jun 2001.

NGHIEM, P.; KUPPER, T. S. Basal and squamous cell carcinomas. **In Principles of molecular medicine**, 1998.

NOMINE, Y.; MASSON, M.; CHARBONNIER, S. et al. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. **Mol Cell**, v. 21, n. 5, p. 665-78, Mar 3 2006.

NYITRAY, A. G.; LIN, H. Y.; FULP, W. J. et al. The role of monogamy and duration of heterosexual relationships in human papillomavirus transmission. **J Infect Dis**, v. 209, n. 7, p. 1007-15, Apr 1 2014.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v. 85, n. 5, p. 1053-74, Sep-Oct 2009.

ONOUÉ, S.; TAKAHASHI, H.; KAWABATA, Y. et al. Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. **J Pharm Sci**, v. 99, n. 4, p. 1871-81, Apr 2010.

PAHUD, B. A.; AULT, K. A. The Expanded Impact of Human Papillomavirus Vaccine. **Infect Dis Clin North Am**, v. 29, n. 4, p. 715-24, Dec 2015.

PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metab Dispos**, v. 27, n. 4, p. 486-94, Apr 1999.

PATEL, H.; MICK, R.; FINLAY, J. et al. Motexafin lutetium-photodynamic therapy of prostate cancer: short- and long-term effects on prostate-specific antigen. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 15, p. 4869-76, Aug 1 2008.

PETT, M. R.; ALAZAWI, W. O.; ROBERTS, I. et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. **Cancer Res**, v. 64, n. 4, p. 1359-68, Feb 15 2004.

PFAENDLER, K. S.; TEWARI, K. S. Changing paradigms in the systemic treatment of advanced cervical cancer. **Am J Obstet Gynecol**, v. 214, n. 1, p. 22-30, Jan 2016.

PHILLIPS, J.; MOORE-MEDLIN, T.; SONAVANE, K. et al. Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer in SKH-1 mice. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 148, n. 5, p. 797-803, May 2013.

PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **APMIS**, v. 118, n. 6-7, p. 471-93, Jun 2010.

PORTAL BRASIL. 2017. Disponível em: <
<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/01/tire-duvidas-sobre-a-vacinacao-contr-o-hpv-para-meninos>> Acesso em 13.03.2017.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 8, n. 1, p. 340-7, Jan 2008.

PRIMO, F. L.; DE PAULA, L. B.; DE SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Photobiostimulation on wound healing treatment by CIAIPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 30, p. 5157-63, 2012.

RAMAKRISHNAN, S.; PARTRICIA, S.; MATHAN, G. Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: pathogenesis to prevention. **Biomed Pharmacother**, v. 70, p. 103-10, Mar 2015.

RIBEIRO, A. P.; PAVARINA, A. C.; DOVIGO, L. N. et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 2, p. 391-8, Feb 2013.

RIVERA, A.; TYRING, S. K. Therapy of cutaneous human Papillomavirus infections. **Dermatol Ther**, v. 17, n. 6, p. 441-8, 2004.

ROCHA, M. S.; LUCCI, C. M.; LONGO, J. P. et al. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. **J Biomed Nanotechnol**, v. 8, n. 2, p. 251-7, Apr 2012.

ROMANCZUK, H.; HOWLEY, P. M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 7, p. 3159-63, Apr 1 1992.

ROSE, P. G.; BUNDY, B. N.; WATKINS, E. B. et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 340, n. 15, p. 1144-53, Apr 15 1999.

SADURNI, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N. et al. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **Eur J Pharm Sci**, v. 26, n. 5, p. 438-45, Dec 2005.

SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D. et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495-505, Nov 5 1993.

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. S12-7, Jun 2010.

SEGOVIA-MENDOZA, M.; JURADO, R.; MIR, R. 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, 2015.

SHAH, P. M.; GERDES, H. Endoscopic options for early stage esophageal cancer. **J Gastrointest Oncol**, v. 6, n. 1, p. 20-30, Feb 2015.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D. D.; BENIWAL, V. et al. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **Eur J Pharm Sci**, v. 37, n. 3-4, p. 223-30, Jun 28 2009.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955-1968, Sep 2005a.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955-68, Sep 2005b.

SHIN, M. K.; BALSITIS, S.; BRAKE, T. et al. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 69, n. 14, p. 5656-63, Jul 15 2009.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia : da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis, SC

Rio Grande do Sul, RS: Editora da UFRGS

Editora da UFSC, 2007.

SIMONE, C. B., 2ND; CENGEL, K. A. Photodynamic therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma. **Semin Oncol**, v. 41, n. 6, p. 820-30, Dec 2014.

SINGH, M.; SINGH, N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. **Mol Cell Biochem**, v. 325, n. 1-2, p. 107-19, May 2009.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 3, p. 1744-52, Apr 1 2013.

SOCIETY, A. C. **Cancer Facts & Figures 2015**. Atlanta: American Cancer Society, 2015.

SPANOS, W. C.; HOOVER, A.; HARRIS, G. F. et al. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. **J Virol**, v. 82, n. 5, p. 2493-500, Mar 2008.

SPARDY, N.; DUENSING, A.; HOSKINS, E. E. et al. HPV-16 E7 reveals a link between DNA replication stress, fanconi anemia D2 protein, and alternative lengthening of telomere-associated promyelocytic leukemia bodies. **Cancer Res**, v. 68, n. 23, p. 9954-63, Dec 1 2008.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecol Oncol**, v. 117, n. 2 Suppl, p. S5-10, May 2010.

STOLER, M. H.; RHODES, C. R.; WHITBECK, A. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. **Hum Pathol**, v. 23, n. 2, p. 117-28, Feb 1992.

SWAMY, M. V.; CITINENI, B.; PATLOLLA, J. M. et al. Prevention and treatment of pancreatic cancer by curcumin in combination with omega-3 fatty acids. **Nutr Cancer**, v. 60 Suppl 1, p. 81-9, 2008.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 108-109, p. 303-18, May 20 2004.

TAKEDA, S.; OKAZAKI, H.; IKEDA, E. et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) by cannabidiolic acid in human breast cancer cells. **J Toxicol Sci**, v. 39, n. 5, p. 711-6, 2014.

TANG, S.; TAO, M.; MCCOY, J. P., JR. et al. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. **J Virol**, v. 80, n. 9, p. 4249-63, May 2006.

TERAI, M.; DESALLE, R.; BURK, R. D. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. **J Virol**, v. 76, n. 19, p. 10020-3, Oct 2002.

THANOS, C. G.; LIU, Z.; REINEKE, J. et al. Improving relative bioavailability of dicumarol by reducing particle size and adding the adhesive poly(fumaric-co-sebacic) anhydride. **Pharm Res**, v. 20, n. 7, p. 1093-100, Jul 2003.

THAYYULLATHIL, F.; CHATHOTH, S.; HAGO, A. et al. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 10, p. 1403-12, Nov 15 2008.

TOFT, L.; STORGAARD, M.; MULLER, M. et al. Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of Cervarix and Gardasil human papillomavirus vaccines in HIV-infected adults: a randomized, double-blind clinical trial. **J Infect Dis**, v. 209, n. 8, p. 1165-73, Apr 15 2014.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Semin Cancer Biol**, v. 26, p. 13-21, Jun 2014.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015.

TUMBAN, E.; MUTTIL, P.; ESCOBAR, C. A. et al. Preclinical refinements of a broadly protective VLP-based HPV vaccine targeting the minor capsid protein, L2. **Vaccine**, v. 33, n. 29, p. 3346-53, Jun 26 2015.

VACCARELLA, S.; HERRERO, R.; DAI, M. et al. Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 11, p. 2148-53, Nov 2006.

WALBOOMERS, J. M.; MEIJER, C. J. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? **J Pathol**, v. 181, n. 3, p. 253-4, Mar 1997.

WANG, Q.; SUN, A. Y.; SIMONYI, A. et al. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. **J Neurosci Res**, v. 82, n. 1, p. 138-48, Oct 1 2005.

WANG, X.; JIANG, Y.; WANG, Y. W. et al. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. **Food Chem**, v. 108, n. 2, p. 419-24, May 15 2008.

WHITE, A. E.; LIVANOS, E. M.; TLSTY, T. D. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. **Genes Dev**, v. 8, n. 6, p. 666-77, Mar 15 1994.

WISE-DRAPER, T. M.; WELLS, S. I. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. **Front Biosci**, v. 13, p. 1003-17, 2008.

WOO, J. H.; KIM, Y. H.; CHOI, Y. J. et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 7, p. 1199-208, Jul 2003.

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.

YALLAPU, M. M.; KHAN, S.; MAHER, D. M. et al. Anti-cancer activity of curcumin loaded nanoparticles in prostate cancer. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8635-48, Oct 2014.

YAMAGUCHI, S.; TSUDA, H.; TAKEMORI, M. et al. Photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. **Oncology**, v. 69, n. 2, p. 110-6, 2005.

YAN, D.; GEUSZ, M. E.; JAMASBI, R. J. Properties of lewis lung carcinoma cells surviving curcumin toxicity. **J Cancer**, v. 3, p. 32-41, 2012.

YANO, T.; MUTO, M.; YOSHIMURA, K. et al. Phase I study of photodynamic therapy using talaporfin sodium and diode laser for local failure after chemoradiotherapy for esophageal cancer. **Radiat Oncol**, v. 7, p. 113, 2012.

YOYSUNGNOEN-CHINTANA, P.; BHATTARAKOSOL, P.; PATUMRAJ, S. Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 817972, 2014.

YU, T.; FERBER, M. J.; CHEUNG, T. H. et al. The role of viral integration in the development of cervical cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 158, n. 1, p. 27-34, Apr 1 2005.

ZERFASS-THOME, K.; ZWERSCHKE, W.; MANNHARDT, B. et al. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 13, n. 11, p. 2323-30, Dec 5 1996.

ZERFASS, K.; SCHULZE, A.; SPITKOVSKY, D. et al. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. **J Virol**, v. 69, n. 10, p. 6389-99, Oct 1995.

ZHANG, A.; WANG, J.; ZHENG, B. et al. Telomere attrition predominantly occurs in precursor lesions during in vivo carcinogenic process of the uterine cervix. **Oncogene**, v. 23, n. 44, p. 7441-7, Sep 23 2004.

ZHANG, K.; RUI, X.; YAN, X. Curcumin inhibits the proliferation and invasiveness of MHCC97-H cells via p38 signaling pathway. **Drug Dev Res**, v. 75, n. 7, p. 463-8, Nov 2014.

ZUR HAUSEN, H. immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. **Semin Cancer Biol**, v. 9, n. 6, p. 405-11, Dec 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, May 2002.

Capítulo II

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines.

Author's names:

Renata Prandini Adum de Matos^{a*} - renatapram@hotmail.com

Marilia de Freitas Calmon^{a*} - macal131@gmail.com

Fernando Lucas Primo^b - flprimo@fctfar.unesp.br

Camila Fernanda Amantino^c - camila.amantino@gmail.com

Antonio Claudio Tedesco^c - atedesco@usp.br

Luisa Lina Villa^d - luisa.villa@icesp.org.br

Paula Rahal^a - rahalp@yahoo.com.br

Author's Affiliation:

a. UNESP – São Paulo State University – IBILCE – Institute of Bioscience, Language & Literature and Exact Science – Department of Biology - Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Bairro Jardim Nazareth - CEP 15054-010 - São José do Rio Preto – São Paulo – Brazil

*All the two authors equally contributed to this work.

b. UNESP – São Paulo State University- Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara – Department of Bioprocess and Biotechnology – Rodovia Araraquara/Jaú, Km 01, s/n, Campos Ville – CEP 14800-903- Araraquara- São Paulo- Brazil

c. USP- University of Sao Paulo – Faculty of Philosophy, Science and Letters
– Department of Chemistry - Center for Nanotechnology and Tissue Engineering -
Av. Bandeirantes, 3900, Bloco B17, Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo,
14040-901, Brazil

d. Center for Translational Research in Oncology, ICESP- Instituto de Câncer
do Estado de São Paulo – Av. Dr. Arnaldo, 251 – 8o andar – Bairro Cerqueira César
- CEP 01246-000- São Paulo – Brazil

USP – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Department of
Radiology and Oncology - Av. Dr. Arnaldo, 251 – 8o andar – Bairro Cerqueira César
- CEP 01246-000- São Paulo – Brazil

Abstract

Cervical cancer is the fourth leading cause of cancer death in women and persistent infection with Human Papillomavirus was recognized as the main cause of this neoplasia. Current treatment modalities for cervical cancer are the combination of cisplatin-based chemotherapy with radiation, however cisplatin shows severe adverse effects. Curcumin is a versatile bioactive hydrophobic compound which has anti-inflammatory, anti-hyperlipidemic, anti-angiogenic, anti-neoplastic and chemoprotective properties. Furthermore, curcumin may be used as a photosensitizing agent in Photodynamic Therapy. This study aimed to investigate the effects of Photodynamic Therapy in cellular viability using curcumin-nanoemulsion as photosensitizing drug in cervical carcinoma cell lines HPV-16 positive (CasKi and SiHa). The empty nanoemulsion presented very low cytotoxicity in all cell lines analyzed. Additionally, the incubation with curcumin-nanoemulsion at 20 μ M of curcumin showed more than 80% of cell viability for cell lines. Nanoemulsions were shown to internalize cells by fluorescence microscopy and were observed in the intracellular environment for up to 36 hours after incubation with cell lines. Besides, after the Photodynamic Therapy we observed high phototoxic effect of the curcumin-nanoemulsion with less than 5% of viable cells after irradiation. This was accompanied by an increase in caspase-3/7 activities after cells treatment with curcumin-nanoemulsion and Photodynamic Therapy, suggesting cell death by apoptosis. We conclude that curcumin-nanoemulsion formulation behaves as photosensitizing drug in Photodynamic Therapy and shows potential as an alternative treatment to HPV-induced lesions.

Keywords: Nanotechnology, Photodynamic Therapy, Curcumin, Cervical Cancer, Human Papillomavirus

1. Background

Cervical cancer is the third most commonly diagnosed cancer worldwide and the fourth leading cause of cancer death in women ¹. In Brazil are expected 16,340 new cases, with an estimated risk of 15.85 cases per 100,000 women for 2016 ². Persistent infection with human papillomavirus (HPV) was recognized as the main cause of cervical cancer and almost all cervical malignancies have oncogenic strains of HPV DNA ^{3,4}. At present, the best possible treatment of cervical cancer is achieved by combination of cisplatin-based chemotherapy with radiation ⁵. However, the clinical use is limited because of several serious side effects such as nephrotoxicity, neurotoxicity, hematological toxicity, chemoresistance and damage to normal tissues ⁶. In the early stages of the disease, this treatment regimen shows a patient survival rate around 90%. However, the survival rates decrease to 17% for patients in advanced disease stages ^{6,7} and, the presence of chemoradioresistant cells is the main reason for this poor response ⁸. Therefore, ongoing efforts are necessary to developed news effective therapeutic strategies to enhance chemotherapeutic efficacy and decrease these side effects, maximizing the local response and patient survival.

In the past two decades, the use of natural compounds with anticancer effects has attracted a great deal of attention as a strategy to overcome low therapeutic index of conventional anticancer drugs. Chemopreventive phytochemicals target various intracellular signaling cascades to inhibit tumor promotion, proliferation and progression ⁹. Curcumin, a yellow pigment obtained from the rhizomes of *Curcuma longa* (Family: Zingiberaceae), is a major component of turmeric and is commonly used as a spice and food coloring agent ¹⁰.

Curcumin shows anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory effects ¹¹. Curcumin is known to induce apoptosis and block the progression of cervical cancer by the down regulation of TGF- β signaling ^{12,13}. For cervical carcinoma xenografts in nude mice, curcumin inhibited the expressions of VEGF, COX-2 and EGFR

exhibiting antitumor and antiangiogenesis effects¹³. Additionally, high concentrations of curcumin stimulated apoptotic cell death in several cervical carcinoma cell lines (SiHa, CasKi and HeLa) by upregulation of Bax and AIF, down-regulation of Bcl-xL and Bcl2, enhancement of cytochrome c release and activation of caspase-3 and caspase-9^{14,15}. Besides, curcumin has been applied in clinical trials for treatment of pancreatic cancer¹⁶, multiple myeloma^{17,18}, Alzheimer's disease¹⁹, and colorectal cancer²⁰.

In spite of its potential therapeutic effects, benefits of curcumin are limited due to its poor solubility, low absorption from the gut, rapid metabolism, and rapid systemic elimination^{21,22}. So, new formulations based on nanoemulsions are currently evaluated to increase the bioavailability and biological activity of curcumin²³⁻²⁵. Nanoemulsions are isotropic, thermodynamically stable, transparent (or translucent) systems of oil, water, surfactant and co-surfactant with a droplet size usually in the range of 20-200 nm²⁶. Nanoemulsions emerged as a promising tool for the drug delivery owing to its long term stability, ease of preparation and high solubilization of the drug molecules²⁷. Additionally, curcumin can be used as a photosensitizer agent on Photodynamic Therapy (PDT), increasing the treatment efficiency and reducing the side effects. This is an approach called as photobiostimulation, used with success in pre-clinical trials for skin cancer, in early stages, and other neoplastic diseases²⁸⁻³².

PDT is a treatment strategy minimally invasive and with low-toxicity³³⁻³⁵. Its components consist of a photosensitizing agent, a visible light source and molecular oxygen environmental. It utilizes molecular energy exchange between the photosensitizing agent that has absorbed the visible light, and the promoted new excited species to molecular oxygen leading to cell and tissue toxicity via oxidative damage by reactive oxygen species (ROS) production^{36,37}. Photodynamic therapy works by selectively killing pathological cells and tissues through the local generation of highly toxic singlet oxygen and other toxic oxygen radicals as superoxide anion radical, hydrogen peroxide and the hydroxyl radical following activation of the

photosensitizing agent by visible light, normally inside the region called Therapeutic windows (between 600 nm and 780 nm). Cell death is achieved through necrosis or apoptosis and is highly localized, causing little or absence of collateral damage ³⁴. The combination of curcumin with visible light results in significant phototoxicity in HeLa cells ³⁸, L929 fibroblasts ³⁹ and in Lewis cells from lung carcinoma ⁴⁰. PDT has been indicated as a promising treatment for a wide range of cancers, such as cervical cancer and head and neck cancer ⁴¹⁻⁴³.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of PDT and curcumin nanoemulsion in HPV 16 positive-cervical carcinoma cell lines.

2. Materials and Methods

2.1. Curcumin-nanoemulsion: preparation and characterization

Curcumin-nanoemulsion (CNE) formulation was obtained as described previously by Primo, Bentley, Tedesco ³², based in the interfacial pre-polymer deposition and spontaneous nanoemulsification method ³². Curcumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was entrapped on oil phase at 0.1 mg/mL as final concentration. The organic phase (acetone) was prepared containing medium-chain-triglycerides, natural soy phospholipids (Lipoid S100, Lipid Co., Ribeirão Preto, SP, Brazil), at 55°C. Subsequently, this organic solution was added into the aqueous phase containing an anionic surfactant, poloxamer 188 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). In the final, the organic solvent was fully removed by rota-evaporation under reduced pressure at 60°C. All samples were prepared in aseptic conditions and in the absence of contaminants and chemicals interference. After preparation of the CNE, spectroscopic studies were performed at steady state through the spectrophotometer in the ultraviolet visible (UV-Vis), absorption spectra were recorded on Lambda 20 Perkin Elmer double beam spectrophotometer (Massachusetts, USA) using 10 mm optical path length quartz cuvettes and 1200

nm.min⁻¹ scanning speed. Absorbance was measured in the spectral range 300-800 nm. Steady-state fluorescence spectra were measured on Fluorolog Spex spectrofluorometer Jobin-Yvon/Horiba Instruments (New Jersey, USA) settled with excitation and emission slits at 5 and 5 nm respectively. Fluorescence emission was recorded in the 450-700 nm range, with excitation fixed at 440 nm. Otherwise indicated all measurements were carried out at 25°C ⁴⁴.

To determine the particle size and zeta potential was used the particle analyzer Zetasizer, model Nano ZS90 Malvern operating at 633 nm, set to detect a scattering angle of 90° ^{32,44}.

2.2.Radiation Source

The radiation source used was a higher potency LED apparatus, model Vet Light of DMC Enterprise (São Carlos, SP, Brazil) operating at 447 (10) nm, with 420 mW of power at 23 mm and 2,52 W of total power, for 209 W/cm² of irradiancy and 80 J/cm² of fluency, set at 6,4 seconds/application.

2.3.Cell Culture

Caski (cervical carcinoma infected with HPV16), SiHa (cervical carcinoma infected with HPV16), and HaCaT (spontaneously immortalized human keratinocytes), from ATCC, were grown in cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultlab, Campinas, SP, Brazil), 100 U/mL penicillin (Gibco, Life Technologies, USA), 100 mg/mL streptomycin (Gibco, Life Technologies, USA). The cells were maintained in a humidified 5% CO₂ incubator and a constant temperature of 37°C.

2.4.Cytotoxicity studies

Cytotoxicity was assessed using MTT classical assay, which is a nonradioactive, colorimetric assay. Media containing CNE, empty nanoemulsion (NE) and free curcumin at concentrations of 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M or 40 μ M was added to each 96 well-plate containing cells at the density of 2×10^4 . After 6, 12 and 24 hours of incubation, with the NE, CNE and free curcumin, MTT (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to 100 μ L of medium in each well. Following 30 minutes of incubation at 37°C, the medium was removed and the formazan crystals were solubilized in 100 μ L of DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The absorbance of each well, which identifies the quantity of viable cells, was read at 570 nm on a microplate reader (Thermoplate model TP reader type B). The value at 690 nm (where no absorption was expected) was used as a reference.

2.5. Cellular uptake of curcumin

CasKi, SiHa and HaCaT cells (3×10^5 /well) were plated in 6 well-plate containing sterile round glass coverslips and kept under culture conditions. Cells were incubated with CNE at 20 μ M and free curcumin at 5 μ M for CasKi cells and 10 μ M for SiHa and HaCaT cells. After 3, 6, 12, 24, 36 and 48 hours of incubation living cells were viewed and photographed in fluorescence microscope (Zeiss Axio Vert. A1) with a FITC filter (excitation spectra: 489 nm, blue laser, 415 ± 15 nm, FITC/GFP). Curcumin fluorescence could be detected by excitation at 410 nm and emission at 540 nm.

2.6. Cell Phototoxicity

All the cells 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 3 hours with CNE (20 μ M), NE (20 μ M) and free curcumin (5 μ M for CasKi cells and 10 μ M for SiHa and HaCaT cells). After the incubation period, the culture medium was removed and cells were washed with PBS, and 150 μ L of fresh DMEM without phenol red was added to each well.

Irradiations with laser were performed at 80 J/cm² for 4 min. Cell viability was measured 24 h later by the determination of mitochondrial activity by MTT assay.

Two different irradiation regimens were performed to analyze the efficiency of the PDT: only one irradiation dose at 80 J/cm² performed within 3 hours of incubation; and two irradiation doses (80 J/cm² and 80 J/cm²) performed after 3 hours, and after 36 hours (SiHa cells) or 48 hours (CasKi and HaCaT cells) of incubation for treatment with CNE. The second dose was performed after 12 hours (CasKi and SiHa) or 48 hours (HaCaT) of free curcumin treatment. The time of the second irradiation for each cell line was the last experimental time where curcumin as a photoactive compound was detected intracellularly by fluorescence microscopy assay.

Controls were as follows: wells containing cells treated with photosensitizer but not exposed to light, wells containing cells without photosensitizer and without light and wells containing cells without photosensitizer and exposed to light.

2.7. Cell death upon treatment

Caspase 3 and 7 activities in CasKi, SiHa and HaCaT cells were measured using a Caspase-Glo assay kit (Promega, Madison, WI, USA) after photodynamic therapy using CNE and free curcumin as photosensitizers. Briefly, the proluminescent substrate containing the DEVD, LETD, or LEHD (sequences are in a single-letter amino acid code) is cleaved by caspases. After caspase cleavage, a substrate for luciferase (aminoluciferin) is released; this results in the luciferase reaction and the production of luminescent signal.

All cells lines were seeded into white-walled 96-weel plates at 2x10⁴ cells/well and allowed to grow overnight. Cells were incubated with CNE (20 µM), NE, free curcumin (5 µM for CasKi cells and 10 µM for SiHa and HaCaT cells) and for the control group cells were incubated only with medium. After 3 hours the medium was removed and cells were washed with PBS, and 100 µL of fresh DMEM without phenol red was added to each well and irradiated in the same conditions of item 2.4.

For the treatment with CNE, CasKi cells were incubated with fresh medium for 4 and a half hours and SiHa and HaCaT cells for 8 hours after irradiation. And for cells treated with free curcumin the caspase assay was performed 24 hours after irradiation.

The incubation time for each cell line was determined by an MTT assay performed after 3, 6, 9, 12 and 24 hours. It was chosen the experimental time which was observed approximately 50% of cell viability. After incubation time 100 μ L (1:1) of Caspase-GloTM (Promega, Madison, WI, USA) reagent was added and incubated at room temperature for 1 hour. The luminescence of each sample was measured in a plate-reading luminometer. The values were normalized with the control group value and expressed as percentages.

2.8. Statistical methods

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and data were expressed as the mean standard deviation (SD). All data were tested for normality by Shapiro-Wilk test and the homoscedasticity by Levene test. Statistical analysis of non-parametric dates was performed by Kruskal-Wallis test and the parametric data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's. The adopted confidence interval was 95%, with a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Particle size and zeta potential characterization of curcumin-nanoemulsion

The mean size distributions of the CNE and NE were determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer Nano ZS of Malvern Instruments (Worcestershire, UK). This method allows the determination of the mean diameter of the particle (hydrodynamic radius) and the polydispersity index (Pdl) and the zeta

potential of the particle population. The reported values were expressed as the means $\pm$ standard deviations of at least three different batches of each formulation (Table 1). Values obtained are in agreement with previous reports of development of polymeric nanoemulsion and photosensitizers³². The encapsulation of curcumin into nanoemulsion does not change the particle size and zeta potential distribution, as shown in Table 1. The empty and loaded nanoemulsions have the same physical-chemistry profile as expected to colloidal drug delivery systems³². Dynamic light scattering (DLS) analyzes shows an appropriate Pdl to values < 0.2 to curcumin-nanoemulsion, suggesting a monodisperse distribution in colloidal medium.

3.2. UV-Vis absorption and fluorescence emission of curcumin-nanoemulsion

Results showed that curcumin compound has a typical absorption band near of UV range, with maximum at 415 nm. Fluorescence studies demonstrating the entrapment of curcumin into nanoemulsion led to a shift in the maximum emission of 540 to 490 nm. This result is expected to colloidal environment and does not influence the photochemical and photobiological characteristic of the compound.

3.3. Effect of curcumin on cell viability

Curcumin cytotoxicity against CasKi, SiHa and HaCaT cells was determined by MTT assay. NE did not show significant cytotoxicity, with most cell viability rates above 80%. (Figure 1). On the other hand, cell viability was affected by curcumin in a dose-dependent manner (Figures 2 and 3).

When the three cell lines were treated with CNE at 20 μ M, the cell viability was above 80% for all analyzed times (Figure 2). Therefore, we choose this concentration to perform additional experiments. However, we observed higher cytotoxicity to HaCaT cells than to CasKi and SiHa cells when the cells were incubated with the highest concentration of CNE (40 μ M). All cell lines treated with

free curcumin showed low viability at the same highest (40 μ M) concentration, with 7.8% of cell viability for CasKi cells, 8.6% for SiHa cells and 16.5% for HaCaT cells, for 24 hours of incubation (Figure 3). The concentration of free curcumin that maintained the cellular viability above 80% in the three times analyzed was 5 μ M for CasKi cells and 10 μ M for SiHa and HaCaT cells. For this reason, these were the free curcumin concentrations chosen for subsequent experiments. An interesting observation is that for the higher concentration (40 μ M) HaCaT cells treated with free curcumin showed higher viability than CasKi and SiHa cells in all times analyzed.

We demonstrated that CNE presented higher cell viability than free curcumin for the three cell lines in all experimental times analyzed.

3.4. Cellular uptake of curcumin

Due the natural fluorescent properties of curcumin the cellular uptake of CNE and free curcumin were evaluated by fluorescence microscopy.

The fluorescence microscopy images (Figure 4A) showed that cells were able to internalize the CNE with preferential localization at cytoplasm observed in the intracellular environment for up to 36 hours after incubation in SiHa cells and for up 48 hours in CasKi and HaCaT cells.

When the cells were treated with free curcumin, we also observed the efficient internalization for all cell lines. However, for CasKi and SiHa cells after 12 hours of incubation it was not observed curcumin cellular uptake. For HaCaT cells the curcumin in its free form was observed in the intracellular environment for up 48 hours (Figure 4B).

The Fluorescent properties of curcumin also open the possibility to use the same active for diagnosis and/or treatment, known today as Theranostic protocol and properties wide explore for these new generation of photoactive compounds.

3.5. Cell Phototoxicity

No decrease in cell viability was observed after incubation of the different cell lines with NE (Figure 5) showing that on the absence of photosensitizing compound the irradiation do not cause cytotoxicity.

On the other hand, cells treated with CNE and irradiation showed a significant decrease in the cellular viability. After the treatment with one irradiation dose we observed 5.4% of cellular viability for CasKi cells, 6.9% for SiHa cells and 14.6% for HaCaT cells.

After two irradiation doses the cellular viability decreased to 2.8% in CasKi cells, 1.3% in SiHa cells, and 3.6% in HaCaT cells and the difference on the cellular viability between those two treatments regime was statistically significant ($p < 0.0001$ for CasKi and SiHa cells and $p < 0.001$ for HaCaT cells).

After the treatment with free curcumin and one irradiation dose was observed 72.7% of cellular viability for CasKi cells, 110.8% for SiHa cells and 19.4% for HaCaT cells. With the addition of a dose of irradiation cell viability drop to 60.1% in CasKi cell, 14.7% for SiHa cells and 5.2% for HaCaT cells.

3.6. Cell death upon treatment

Caspase 3 and 7 activities in cells CasKi, SiHa and HaCaT were measured using a Caspase-Glo assay kit (Promega) after PDT treatment with nanoemulsions and free curcumin.

CasKi cells treated with CNE following one irradiation dose after 3 hours of incubation showing a significant increase of 847% (Figure 6A) of caspase activities in comparison with control group. For SiHa and HaCaT cells caspase activities increased 492% (Figure 6B) and 366% (Figure 6C) respectively, these increased of caspases activities in cells treated with CNE in comparison with control group was statically significant for all cell lines ($p < 0.001$ for CasKi cells and $p < 0.05$ for SiHa cells and HaCaT cells). These results suggest that curcumin photoactivation triggers cell death by apoptosis.

On the other hand, NE did not significantly increase caspase activity in comparison with control group, reinforcing the conclusion that the cell death by apoptosis results from curcumin photoactivation, and it was not influenced by nanoemulsion formulation.

However, it was not observed significant increase of caspases activities when the cells were treated with free curcumin followed by one irradiation dose in comparison with control group (Figure 6).

4. Discussion

It has been documented in several studies that free curcumin leads to a decrease on cell viability in several cell lines ⁴⁵⁻⁴⁷. Free curcumin decreased the cell viability in a dose dependent manner, since the incubation for 24 hours with 20 μM of curcumin showed about 50% of cell viability and with 40 μM the cell viability dropped to approximately 31% in cervical carcinoma cell lines SiHa and HeLa ⁴⁸. After the treatment with free curcumin for 24 hours we also observed a decrease in cell viability in a dose-dependent manner. This effect was most pronounced with treatment with 40 μM of free curcumin when we observed 7.8% of viability for Caski cells, 8.6% for SiHa cells and 16.5% for HaCaT cells.

The curcumin encapsulation with nanoemulsion system enabled the increased of curcumin concentration without affecting negatively the cell viability in our study. Verderio et al. (2013) ⁴⁹ found similar results in breast cancer cell line MCF7, where PLGA nanoparticles associated with curcumin also increased the cell viability in comparison with free curcumin. Therefore, the use of nanotechnology allows that a higher curcumin concentration can be used without alter the cell viability and enhancing the effects, in addition to increasing the compound bioviability and solubility.

Several studies have shown a selective efficacy of curcumin for tumor cells compared to normal cells ⁵⁰⁻⁵². However, the reason for this difference is not completely understood.

Kunwar and co-workers (2008) compare the cytotoxicity of free curcumin between two normal cell lines (NIH3T3 and spleen lymphocytes) and two tumor cell lines (EL4 and MCF7) and observed a dose-dependent cytotoxicity, and tumor cells were more sensitive to curcumin compared to normal cells ⁵¹. Corroborating these results, we observed that free curcumin showed lower toxicity in HaCaT cells compared with CasKi and SiHa cells.

The fluorescence microscopy images showed an efficient internalization of CNE formulation for all cell lines analyzed. As a lipophilic molecule is expected that free curcumin would be localized in the membrane. For MCF-7 cells was reported a high percentage of curcumin located in the cell membrane, followed by cytoplasm, nucleus and mitochondria ⁵¹.

We observed a wide distribution throughout the cytoplasm, indicating that the curcumin encapsulation altered its lipophilic property facilitating its accumulation on the cell cytoplasm. As observed by Kunwar et al. (2008) ⁵¹ for MCF7 and NIH3T cells for free curcumin and by Hussain et al. (2013) ⁵³ for HeLa cells treated with nanocurcumin, we also observed a weak curcumin accumulate on the nucleus.

When CasKi and SiHa cells were incubated with 5 μ M and 10 μ M free curcumin, respectively, curcumin was observed in the intracellular environment for up to 12 hours compared with 48 hours for CasKi cells and 36 hours for SiHa treated with the encapsulated curcumin at a concentration of 20 μ M. The nanoemulsion formulation protected curcumin from quickly degradation, staying in the intracellular environment for longer time. In addition, the nanoemulsion system allows increasing the concentration of the compound without interfering in the cell viability. It has been observed in many studies that there was a significant linear relationship between curcumin concentration and cellular fluorescence ⁵⁴⁻⁵⁶. Additionally, nanocurcumin usually shows better uptake than free curcumin.

Curcumin loaded in micelles (Cur/MEPEG-PLA) presented a stronger fluorescence, indicating an enhanced drug accumulation in C6 cells (rat glioma cell line), in comparison cells treated with free curcumin showed a weak fluorescence ⁵⁷.

The treatment of human oral cells also showed a higher uptake of curcumin when associated with silica nanoparticles than the free curcumin ⁵⁸.

We further explored the property of curcumin in combination with Photodynamic Therapy to increase the treatment efficacy and decrease the side effects ⁵⁹⁻⁶¹. The phototoxic reactions triggered by photosensitization of curcumin have been identified in several studies for different cell types: RBL cells (Rat Basophilic Leukemia cells) ⁶², SM 10-12 cells (salivary gland acinar cells) ³³, AMC-HN3 (human head and neck cancer cell line) ⁶¹ and HaCaT cells (immortalized human keratinocytes) ⁵⁹.

The photoactivation of CNE generated a significant drop in cell viability in all cell lines analyzed. Moreover, it was observed an additional phototoxic effect when the cells were exposed to two irradiation doses, what allowed the design of a new, more efficient treatment protocol.

Koon et al. (2006) ⁶³ showed free curcumin phototoxicity in NPC/CNE2 cells. Cells treated with 20 μ M of curcumin and on the absence of light showed 70% of cytotoxicity, whereas the same concentration associated with 300 J/cm² of irradiation generated 95% of phototoxicity. In this study, we irradiated the cells with 80J/cm² and found 93.2% of phototoxicity for CasKi cells, 83.1% for SiHa cells and 96.3% for HaCaT cells. Additionally, our formulation showed only 20% of cytotoxicity on the absence of light, demonstrating a greater effectiveness of our treatment system.

The combination of curcumin with visible light also resulted in a remarkable phototoxicity in HeLa cell ³⁸ for curcumin associated with Lanthanide complexes, and for L929 fibroblast ³⁹, lung carcinoma cells ⁴⁰ and head and neck carcinoma cells AMC-HN3 ⁶¹ for free curcumin treatment. In contrast, the PDT in CasKi and SiHa cells incubated with free curcumin as photosensitive compound did not show a significant effect on cell viability in comparison with the treatment with CNE. However, HaCaT cells were also treated with 10 μ M of free curcumin and we observed a high phototoxic effect (5.2% for two irradiation doses). The curcumin was

visualized intracellularly on HaCaT cells for up to 48 hours and, probably, this difference on the phototoxicity results in comparison with CasKi and SiHa cells is due to the higher uptake observed for HaCaT cells.

The curcumin association with nanoemulsion allowed an increase in the concentration and in the time of permanency of curcumin in the intracellular environment reducing the phototoxic effects of free curcumin when compared to CNE. Our results corroborate a study which observed the use of organically modified silica nanoparticles as a vehicle for the delivery of curcumin in human oral cancer cells exposed to light (20 J/cm^2) showed 70% of cell death in comparison with free curcumin, where was observed only 20%⁵⁸. Niu and co-workers (2016)⁶⁴ also observed that the treatment of curcumin alone or combined with light irradiation decreased cell viability in a dosage-dependent pattern once the treatment with $2 \mu\text{M}$ of free curcumin combined with blue light irradiation decreased the human melanoma cell line viability to 43%.

The main advantage of PDT is that the damage is limited to illuminated area without systemic side effects of long term^{65,66}. Furthermore, there is no damage to normal structure such as nerves, collagen fibers and blood vessels⁶⁷. Thus, despite the internalization of nanoemulsion-curcumin and generated a phototoxic damage in HaCaT cells, the side effects of a future treatment with our formulation can be minimized by directing the light source only to the anatomical sites affected.

One of the most interesting anti-cancer effects of curcumin is the induction of apoptosis, which can be triggered by both intrinsic and/or extrinsic pathway, depending on the cell type and tissue^{68,69}. The work realized by Dujic et al. (2007)⁷⁰ showed that the anticancer machinery can be triggered by low curcumin concentrations if the treatment is combined with UVA or with visible light irradiation. The nucleus stain showed a significant increase of apoptotic nucleus in HaCaT cells 24 h after the treatment with UVA and $1 \mu\text{g/ml}$ of curcumin. The evaluation of the mechanism that triggered apoptosis in these cells showed that the association of curcumin with light on HaCaT cells led to the release of cytochrome c from

mitochondria and activation of caspases 8, 9 and 3. Additionally, the treatment with curcumin increased hypodiploid cells accumulation in U87MG cell on the sub phase G1 and induced the pro-caspases -3, -8, -7 cleavage and the release of cytochrome c of mitochondria ⁷¹. Besides that, previous studies suggested that curcumin active caspases-3 and -8, reinforce the idea that apoptosis induced by curcumin occurs via a membrane-mediated mechanism.^{50,69,72}. In agreement with the literature, we also observed that the cell death detected after the treatment with CNE and PDT was due to apoptosis by caspases -3 and -7 activation.

On the other hand, cells treated with free curcumin did not show increased of caspase - 3 and -7 activities, and these results were expected for CasKi and SiHa cells since it was not observed phototoxicity for these cell lines. However, for HaCaT cells treated with irradiation and free curcumin the decreased of cellular viability was not accompanied by the increased of caspase -3 and -7 activities, indicating that the free curcumin can lead the cell death by others pathways besides the caspase pathway.

The exact molecular mechanisms of curcumin-induced cell death are varied and depend on the cell type and dose used in the experiments. Curcumin was found to induce cell cycle arrest at the G0/G1 phase and S and G2/M phases in cancer cell lines ^{73,74}, and the CDK 1, 2 and 4 (cyclin-dependent kinase) are considered the potential molecular targets of curcumin⁷⁵. Additionally, curcumin also play its anticancer actions via suppressing P13K/Akt signal transduction pathway in several tumor models ^{76,77} and significantly inhibited NF and inhibited NF-κB and attenuated the effect of irradiation-induced pro survival signaling through the PI3K/Akt/mTOR and NF-κB pathways ⁷⁸.

5. Conclusion

The nanoemulsion delivery system for curcumin here developed was internalized more efficiently than free curcumin for both cervical carcinoma cell lines (CasKi and SiHa) and in spontaneously immortalized human keratinocytes cell line (HaCaT). The nanoemulsions showed good cell viability, since low cytotoxicity was seen for all cell lines analyzed.

In contrast of free curcumin, nanoemulsion-curcumin was capable of generating an efficient photodynamic response on carcinoma cervical cell lines, leading to death only in those cells that were irradiated. This protocol induced an increase in caspase enzymatic activities suggesting that cell death occurs by apoptosis. Therefore, the formulation of nanoemulsion-curcumin associated with PDT shows a promising therapeutic potential being more efficient than the free curcumin.

6. Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the Brazilian agencies CNPq (grant 573799/2008-3 to LLV) and FAPESP (grants 2013/04286-6 and 2008/57889-1 to LLV). Also, they would like to thank the DMC Equipamentos LTDA (São Carlos, Brazil) for developing the LED system used in this study.

7. References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
2. INCA. 2016;
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoess_programas/site/home/nobr

asil/progra ma nacional controle cancer colo utero/conceito magnitude.
Accessed 02.11.2016, 2016.

3. Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *The Journal of pathology*. 1997;181(3):253-254.
4. Society AC. *Cancer Facts & Figures 2015*.: Atlanta: American Cancer Society; 2015.
5. Ramakrishnan S, Patricia S, Mathan G. Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: pathogenesis to prevention. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2015;70:103-110.
6. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 1999;340(15):1144-1153.
7. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *The New England journal of medicine*. 1999;340(15):1137-1143.
8. Segovia-Mendoza M, Jurado R, Mir R, Medina LA, Prado-Garcia H, Garcia-Lopez P. Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study. *BMC cancer*. 2015;15:21.
9. Goldberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(6):4355-4359.
10. Huang AC, Lin SY, Su CC, et al. Effects of curcumin on N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)-induced lung and liver tumorigenesis in BALB/c mice in vivo. *In vivo*. 2008;22(6):781-785.
11. Han SS, Keum YS, Seo HJ, Surh YJ. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2002;35(3):337-342.
12. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1999;27(4):486-494.

13. Yoysungnoen-Chintana P, Bhattarakosol P, Patumraj S. Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice. *BioMed research international*. 2014;2014:817972.
14. Singh M, Singh N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2009;325(1-2):107-119.
15. Metzler M, Pfeiffer E, Schulz SI, Dempe JS. Curcumin uptake and metabolism. *BioFactors*. 2013;39(1):14-20.
16. Swamy MV, Citineni B, Patlolla JM, Mohammed A, Zhang Y, Rao CV. Prevention and treatment of pancreatic cancer by curcumin in combination with omega-3 fatty acids. *Nutrition and cancer*. 2008;60 Suppl 1:81-89.
17. Milacic V, Banerjee S, Landis-Piowar KR, Sarkar FH, Majumdar AP, Dou QP. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer research*. 2008;68(18):7283-7292.
18. Jiao Y, Wilkinson Jt, Di X, et al. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood*. 2009;113(2):462-469.
19. Wang Q, Sun AY, Simonyi A, et al. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *Journal of neuroscience research*. 2005;82(1):138-148.
20. Half E, Arber N. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2009;10(2):211-219.
21. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer*. 2005;41(13):1955-1968.
22. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(6):807-818.
23. Bisht S, Maitra A. Systemic delivery of curcumin: 21st century solutions for an ancient conundrum. *Current drug discovery technologies*. 2009;6(3):192-199.
24. Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MN. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption

- enhancer. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2009;37(3-4):223-230.
25. Onoue S, Takahashi H, Kawabata Y, et al. Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010;99(4):1871-1881.
 26. Mei Z, Chen H, Weng T, Yang Y, Yang X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2003;56(2):189-196.
 27. Ali MS, Alam MS, Alam N, Siddiqui MR. Preparation, characterization and stability study of dutasteride loaded nanoemulsion for treatment of benign prostatic hypertrophy. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. 2014;13(4):1125-1140.
 28. Beack S, Kong WH, Jung HS, et al. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot - chlorin e6 - hyaluronate conjugate. *Acta biomaterialia*. 2015.
 29. Primo FL, de Paula LB, de Siqueira-Moura MP, Tedesco AC. Photobiostimulation on wound healing treatment by CIAIPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(30):5157-5163.
 30. Jerjes W, Upile T, Akram S, Hopper C. The surgical palliation of advanced head and neck cancer using photodynamic therapy. *Clinical oncology*. 2010;22(9):785-791.
 31. Kaye AH, Morstyn G, Brownbill D. Adjuvant high-dose photoradiation therapy in the treatment of cerebral glioma: a phase 1-2 study. *Journal of neurosurgery*. 1987;67(4):500-505.
 32. Primo FL, Bentley MV, Tedesco AC. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2008;8(1):340-347.
 33. Bruzell EM, Morisbak E, Tonnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochemical & photobiological sciences : Official*

journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology. 2005;4(7):523-530.

34. Lieder A, Khan MK, Lippert BM. Photodynamic therapy for recurrent respiratory papillomatosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;6:CD009810.
35. Rocha MS, Lucci CM, Longo JP, et al. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2012;8(2):251-257.
36. Castaganos P, Siqueira-Moura MP, Goto PL, et al. Catanionic vesicles charged with chloroaluminium phthalocyanine for topical photodynamic therapy. In vitro phototoxicity towards human carcinoma and melanoma cell lines. *Rsc Advances*. 2014;4:39372-39377.
37. De Paula LB, Primo FL, Pinto MR, Morais PC, Tedesco AC. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2015;380:372-376.
38. Banerjee S, Prasad P, Hussain A, Khan I, Kondaiah P, Chakravarty AR. Remarkable photocytotoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its degradation on oxovanadium(IV) complex formation. *Chemical communications*. 2012;48(62):7702-7704.
39. Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers in medical science*. 2013;28(2):391-398.
40. Yan D, Geusz ME, Jamasbi RJ. Properties of lewis lung carcinoma cells surviving curcumin toxicity. *Journal of Cancer*. 2012;3:32-41.
41. Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *The Lancet Oncology*. 2000;1:212-219.
42. Yamaguchi S, Tsuda H, Takemori M, et al. Photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology*. 2005;69(2):110-116.
43. Copper MP, Triesscheijn M, Tan IB, Ruevekamp MC, Stewart FA. Photodynamic therapy in the treatment of multiple primary tumours in the head and neck, located to the oral cavity and oropharynx. *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands*

Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery.
2007;32(3):185-189.

44. de PAULA LB, PRIMO FL, JARDIM DR, MORAIS PC, TEDESCO AC. Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model. *J Appl Phy.* 2012;11(7).
45. Chen B, Zhang Y, Wang Y, Rao J, Jiang X, Xu Z. Curcumin inhibits proliferation of breast cancer cells through Nrf2-mediated down-regulation of Fen1 expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2014;143C:11-18.
46. Chuah LH, Roberts CJ, Billa N, Abdullah S, Rosli R. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces.* 2014;116C:228-236.
47. Xie YQ, Wu XB, Tang SQ. Curcumin treatment alters ERK-1/2 signaling in vitro and inhibits nasopharyngeal carcinoma proliferation in mouse xenografts. *International journal of clinical and experimental medicine.* 2014;7(1):108-114.
48. Divya CS, Pillai MR. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Molecular carcinogenesis.* 2006;45(5):320-332.
49. Verderio P, Bonetti P, Colombo M, Pandolfi L, Prosperi D. Intracellular drug release from curcumin-loaded PLGA nanoparticles induces G2/M block in breast cancer cells. *Biomacromolecules.* 2013;14(3):672-682.
50. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *The AAPS journal.* 2009;11(3):495-510.
51. Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini KI. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochimica et biophysica acta.* 2008;1780(4):673-679.
52. Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Molecular cancer therapeutics.* 2004;3(9):1101-1108.

53. Hussain A, Somyajit K, Banik B, Banerjee S, Nagaraju G, Chakravarty AR. Enhancing the photocytotoxic potential of curcumin on terpyridyl lanthanide(III) complex formation. *Dalton transactions*. 2013;42(1):182-195.
54. Jiao D, Wang J, Lu W, et al. Curcumin inhibited HGF-induced EMT and angiogenesis through regulating c-Met dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in lung cancer. *Molecular therapy oncolytics*. 2016;3:16018.
55. Kumari P, Swami MO, Nadipalli SK, Myneni S, Ghosh B, Biswas S. Curcumin Delivery by Poly(Lactide)-Based Co-Polymeric Micelles: An In Vitro Anticancer Study. *Pharmaceutical research*. 2016;33(4):826-841.
56. Zaman MS, Chauhan N, Yallapu MM, et al. Curcumin Nanoformulation for Cervical Cancer Treatment. *Scientific reports*. 2016;6:20051.
57. Zheng S, Gao X, Liu X, et al. Biodegradable micelles enhance the anti glioma activity of curcumin in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:2721-2736.
58. Singh SP, Sharma M, Gupta PK. Enhancement of phototoxicity of curcumin in human oral cancer cells using silica nanoparticles as delivery vehicle. *Lasers in medical science*. 2014;29(2):645-652.
59. Park K, Lee JH. Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways. *Oncology reports*. 2007;17(3):537-540.
60. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer*. 2011;10:12.
61. Ahn JC, Kang JW, Shin JI, Chung PS. Combination treatment with photodynamic therapy and curcumin induces mitochondria-dependent apoptosis in AMC-HN3 cells. *International journal of oncology*. 2012;41(6):2184-2190.
62. Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chignell CF. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochemistry and photobiology*. 1994;59(3):290-294.
63. Koon H, Leung AW, Yue KK, Mak NK. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells.

Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer. 2006;25(1-2):205-215.

64. Niu T, Tian Y, Mei Z, Guo G. Inhibition of Autophagy Enhances Curcumin United light irradiation-induced Oxidative Stress and Tumor Growth Suppression in Human Melanoma Cells. *Scientific reports*. 2016;6:31383.
65. Karakullukcu B, van Oudenaarde K, Copper MP, et al. Photodynamic therapy of early stage oral cavity and oropharynx neoplasms: an outcome analysis of 170 patients. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2011;268(2):281-288.
66. Korbelik M, Cooper PD. Potentiation of photodynamic therapy of cancer by complement: the effect of gamma-inulin. *British journal of cancer*. 2007;96(1):67-72.
67. Bredell MG, Besic E, Maake C, Walt H. The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: a short review. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2010;101(3):185-190.
68. Kim MS, Kang HJ, Moon A. Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells. *Archives of pharmacal research*. 2001;24(4):349-354.
69. Bush JA, Cheung KJ, Jr., Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Experimental cell research*. 2001;271(2):305-314.
70. Dujic J, Kippenberger S, Hoffmann S, et al. Low concentrations of curcumin induce growth arrest and apoptosis in skin keratinocytes only in combination with UVA or visible light. *The Journal of investigative dermatology*. 2007;127(8):1992-2000.
71. Gao X, Deeb D, Jiang H, Liu YB, Dulchavsky SA, Gautam SC. Curcumin differentially sensitizes malignant glioma cells to TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis through activation of procaspases and release of cytochrome c from mitochondria. *Journal of experimental therapeutics & oncology*. 2005;5(1):39-48.
72. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*. 2002;23(1):143-150.
73. Tima S, Ichikawa H, Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S.

- Inhibitory effect of turmeric curcuminoids on FLT3 expression and cell cycle arrest in the FLT3-overexpressing EoL-1 leukemic cell line. *Journal of natural products*. 2014;77(4):948-954.
74. Ke CS, Liu HS, Yen CH, et al. Curcumin-induced Aurora-A suppression not only causes mitotic defect and cell cycle arrest but also alters chemosensitivity to anticancer drugs. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25(5):526-539.
 75. Kuttan G, Kumar KB, Guruvayoorappan C, Kuttan R. Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology*. 2007;595:173-184.
 76. Jiang QG, Li TY, Liu DN, Zhang HT. PI3K/Akt pathway involving into apoptosis and invasion in human colon cancer cells LoVo. *Molecular biology reports*. 2014;41(5):3359-3367.
 77. Qiao Q, Jiang Y, Li G. Inhibition of the PI3K/AKT-NF-kappaB pathway with curcumin enhanced radiation-induced apoptosis in human Burkitt's lymphoma. *Journal of pharmacological sciences*. 2013;121(4):247-256.
 78. Rafiee P, Binion DG, Wellner M, et al. Modulatory effect of curcumin on survival of irradiated human intestinal microvascular endothelial cells: role of Akt/mTOR and NF- κ B.

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines

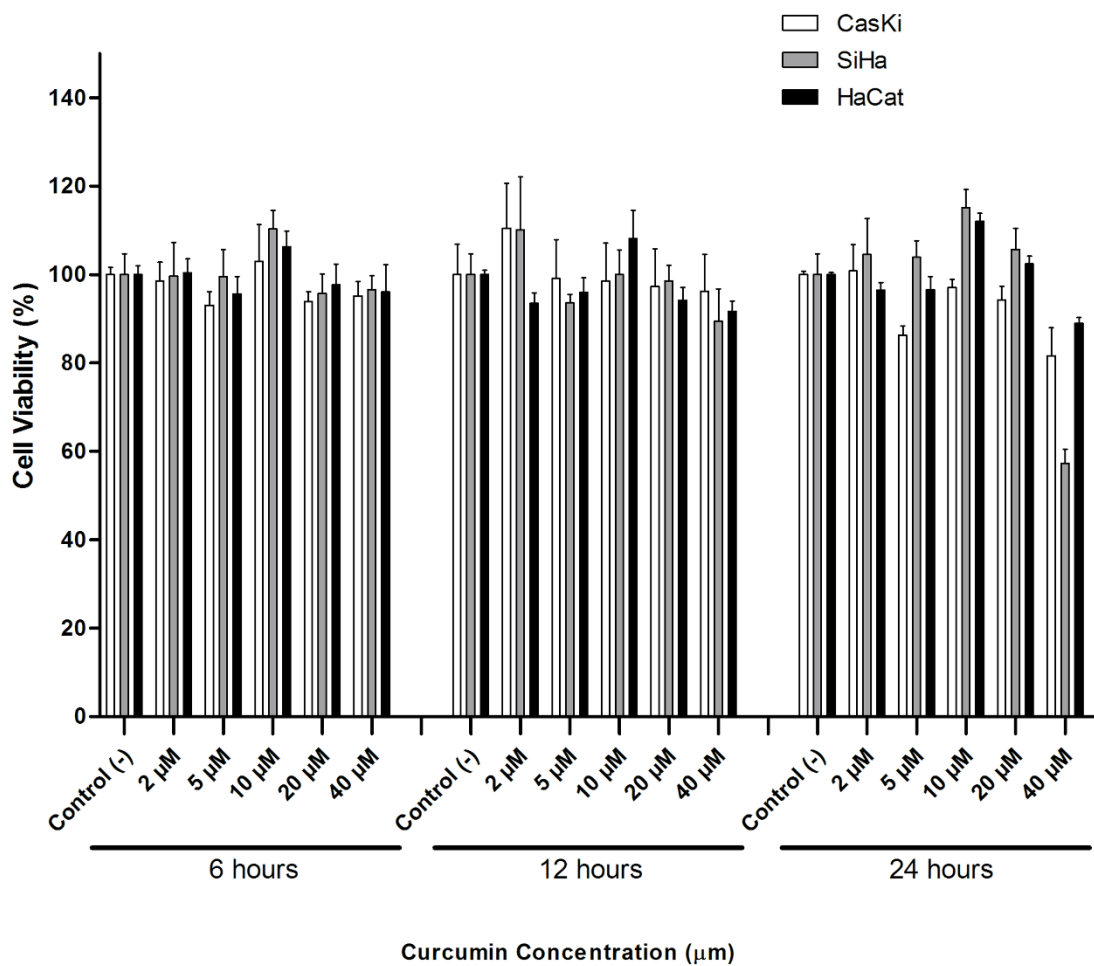


Figure 1: In vitro cytotoxicity of empty nanoemulsion with equivalent volumes of curcumin nanoemulsion at 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM and 40 µM in CasKi cells, SiHa cells and HaCaT cells.

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines

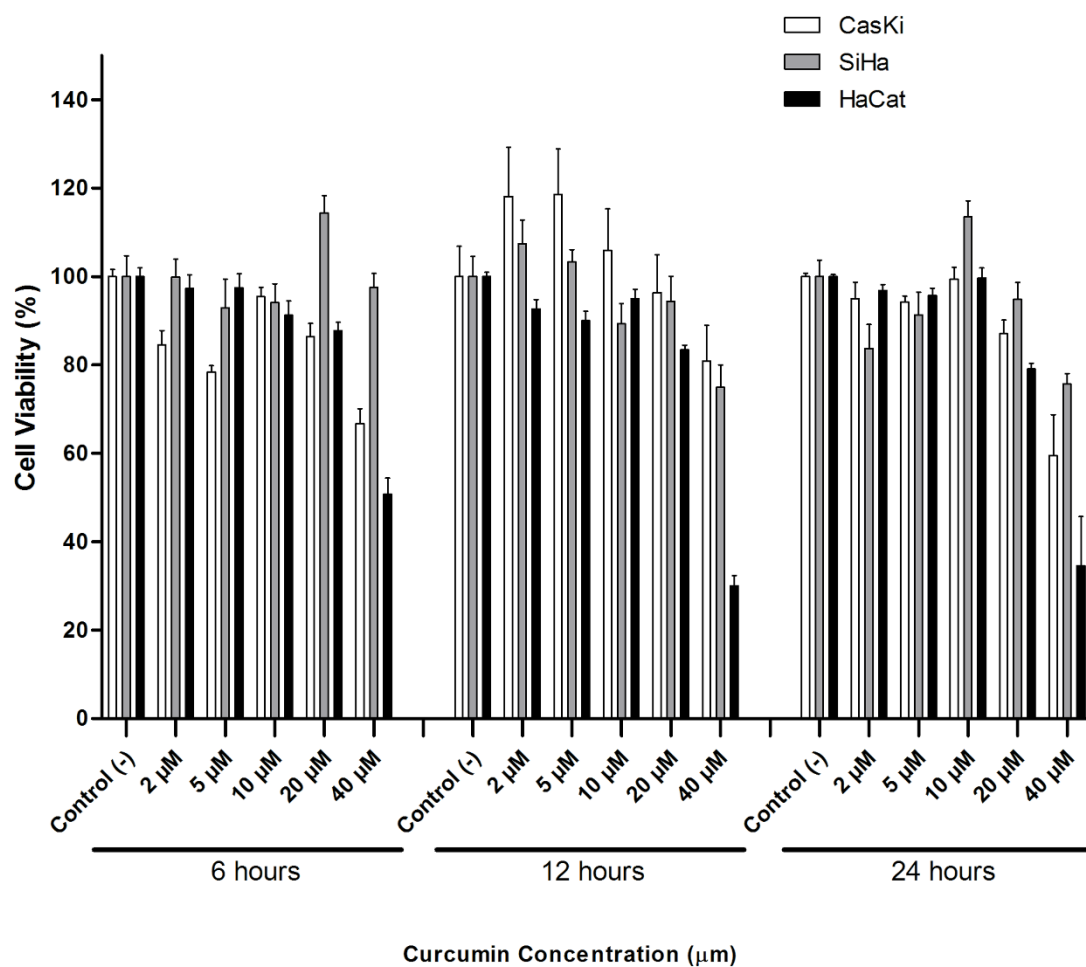


Figure 2: In vitro cytotoxicity of nanoemulsion-curcumin with curcumin concentrations at 2 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM and 40 μM in Caski cells, SiHa cells and HaCaT cells

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines

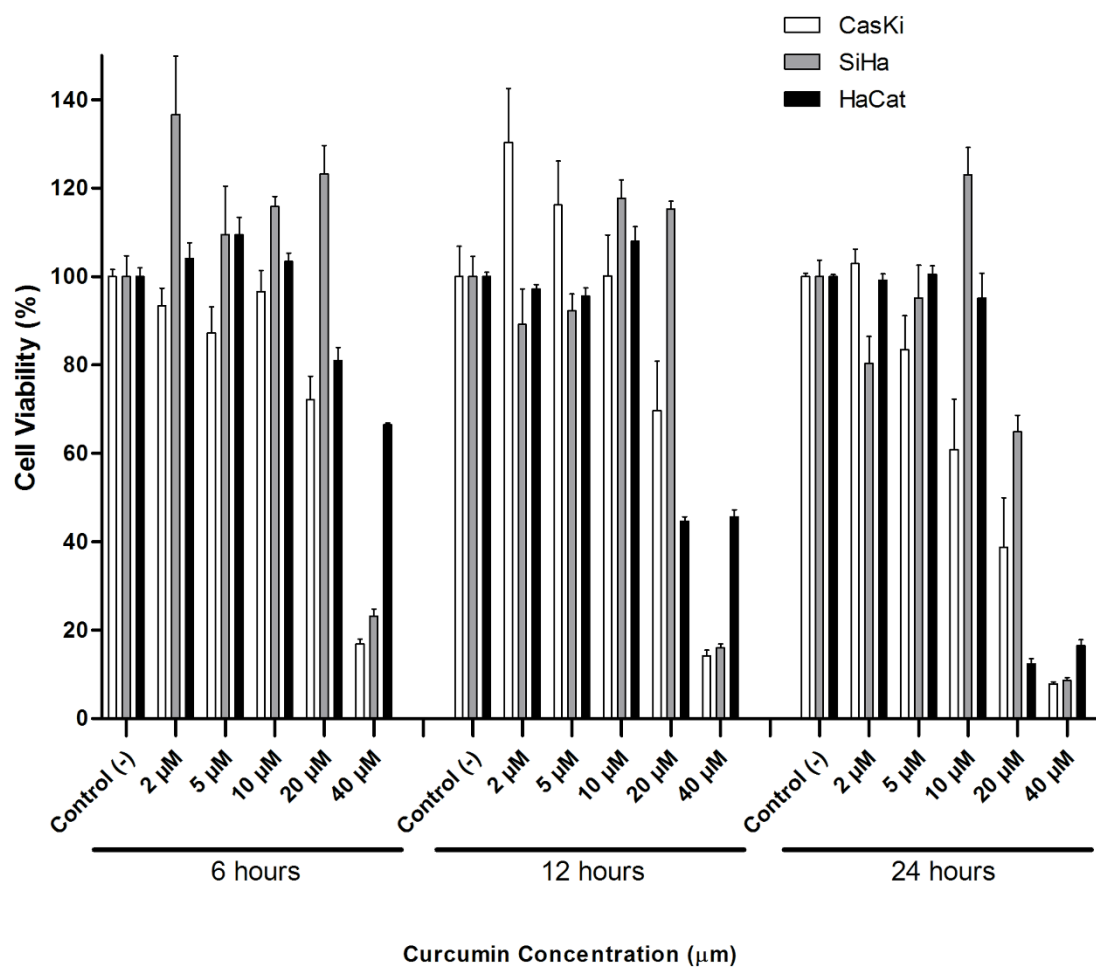


Figure 3: In vitro cytotoxicity of free curcumin with curcumin concentrations at 2 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM and 40 µM in CasKi cells, SiHa cells and HaCaT cells.

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines

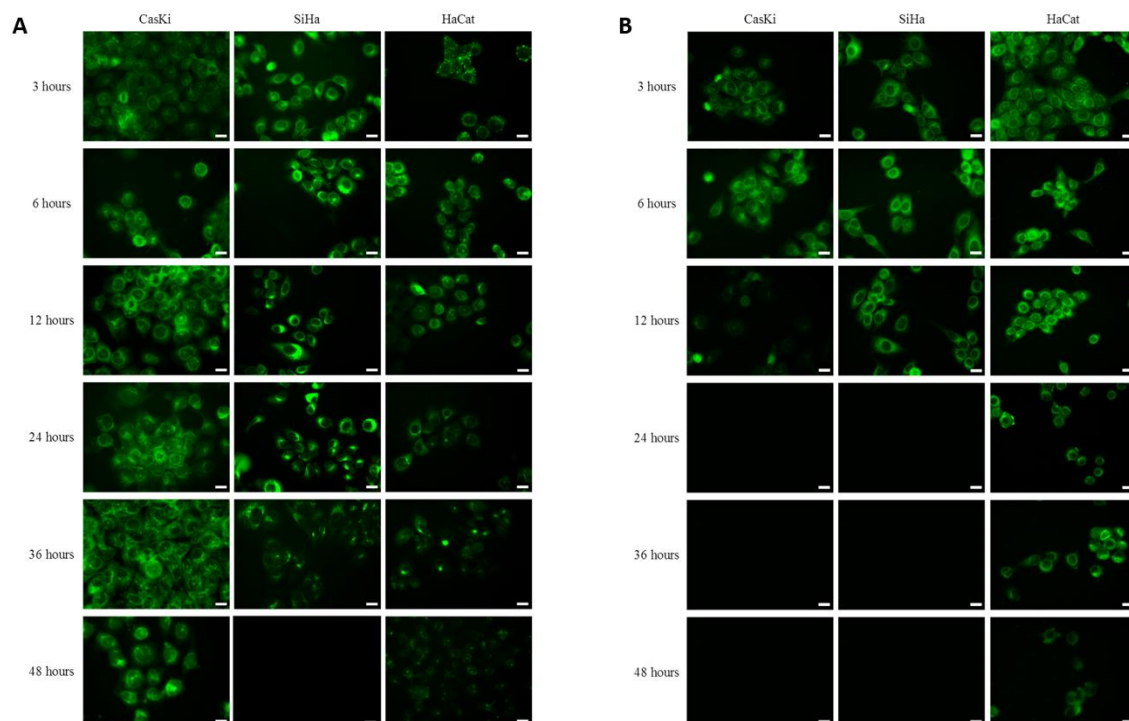


Figure 4: Fluorescence microscopy images of cells incubated with nanoemulsion-curcumin (A) and free curcumin (B). The pictures were taken after 3, 6, 12, 24, 36 and 48 hours of incubation. Scale: 20 μ m

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines

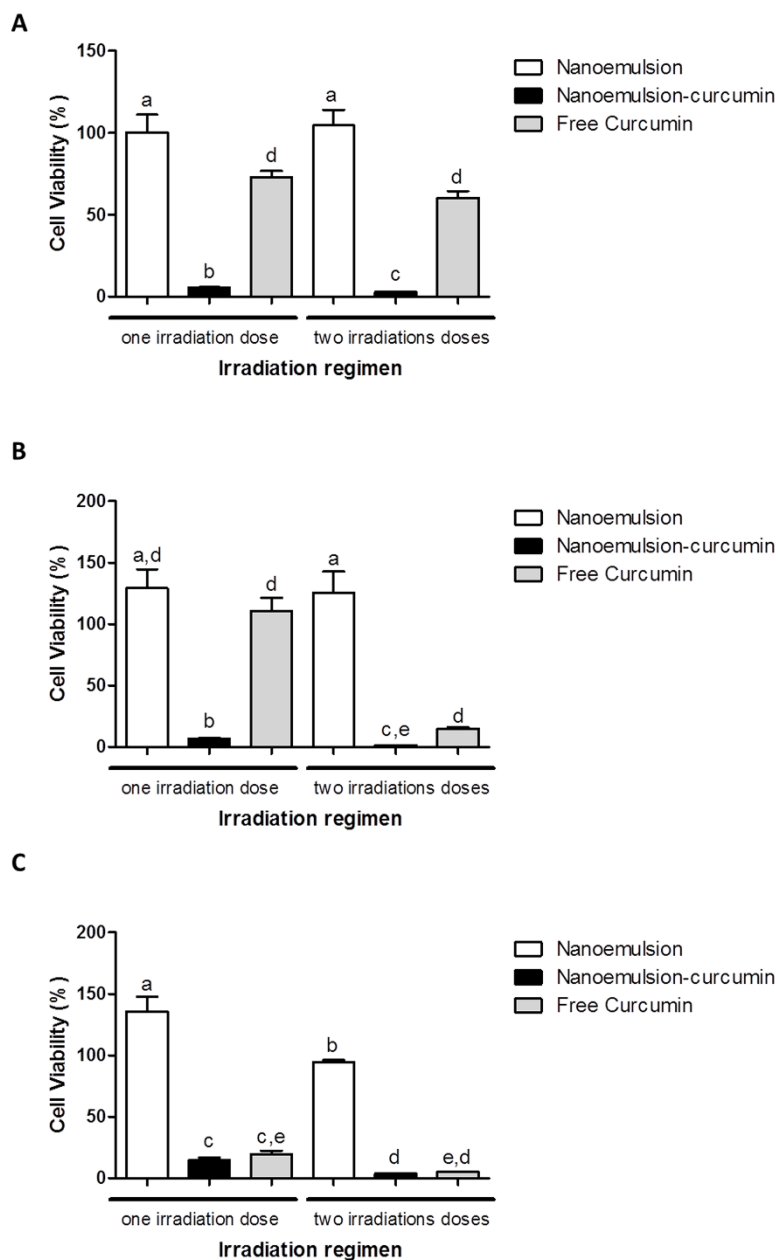


Figure 5: Phototoxicity assay in CasKi cells (A), SiHa cells (B) and HaCaT cells (C) under two different irradiation regimes. Percentage of cell viability performed with irradiation after 3 hours incubation and irradiation carried out after 3 and 48 hours of incubation. Different letters indicate statistical significance.

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines

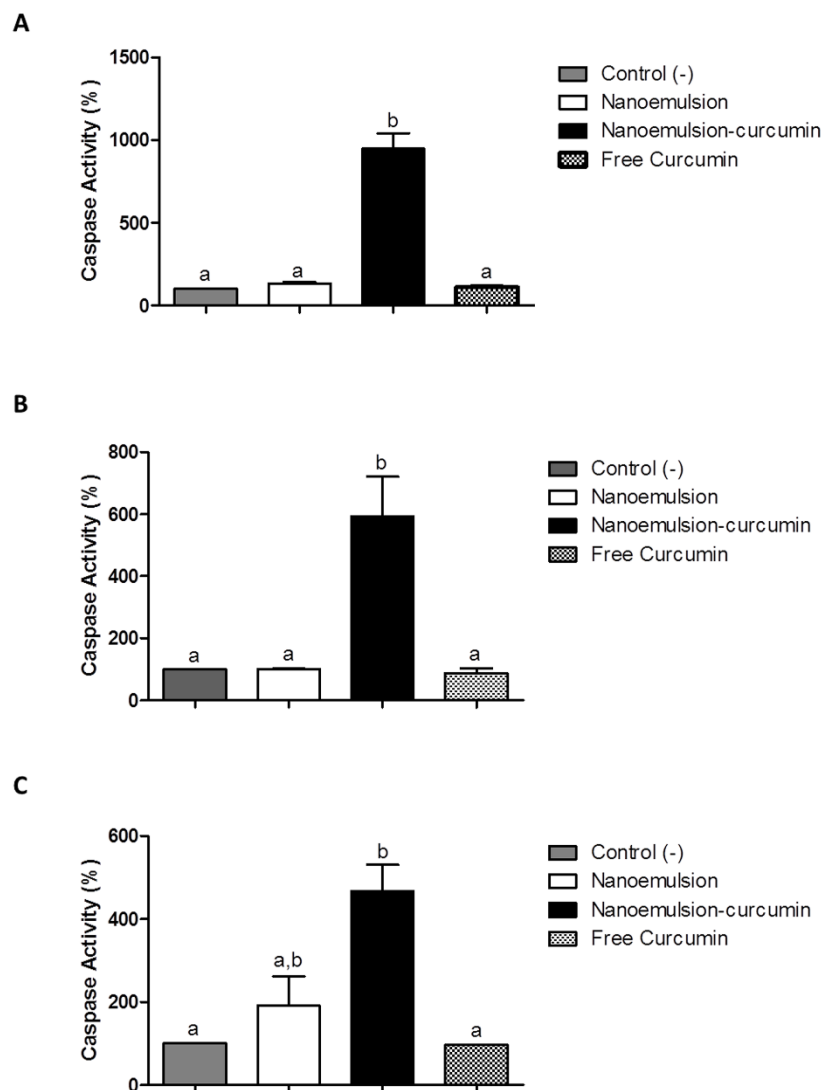


Figure 6: Enzymatic activity of caspase -3 and -7 shown as a percentage in relation to the control samples (100%). A) CasKi cells; B) SiHa cells; C) HaCaT cells. Different letters indicate statistical significance.

Effect of curcumin-nanoemulsion associated with Photodynamic Therapy in HPV-16 positive cervical carcinoma cell lines

Table 1 – Characterization of curcumin-nanoemulsion by dynamic light scattering (DLS) technique

Analyzes	Nanoemulsion	Curcumin-nanoemulsion
Size (nm)	200 ± 9.9	199 ± 0.2
Zeta Potential (mV)	-40.2	-46.3
Polidispersivity Index (Pdl)	0.248	0.179

Capítulo III

Conclusões

A Curcumina encapsulada por nanoemulsão gera boa resposta fotodinâmica nas diferentes linhagens celulares de carcinoma cervical positivas para HPV-16, com indução de apoptose das células submetidas à irradiação, demonstrando seu grande potencial para atuar como agente fotossensível em um sistema de terapia fotodinâmica.