



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELAINE DA SILVA SIQUEIRA

**Mecanismos antiproliferativos do tratamento *in vitro* com *trans*-chalcona em
linhagens de carcinoma cervical humano**

Londrina
2023

ELAINE DA SILVA SIQUEIRA

**Mecanismos antiproliferativos do tratamento *in vitro* com *trans*-chalcona em
linhagens de carcinoma cervical humano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Panis

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S618m Siqueira, Elaine da Silva.
Mecanismos antiproliferativos do tratamento *in vitro* com *trans*-chalcona em linhagens de carcinoma cervical humano / Elaine da Silva Siqueira. - Londrina, 2023.
110 f. : il.

Orientador: Carolina Panis.
Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Carcinoma de Células Escamosas - Tese. 2. Adenocarcinoma - Tese. 3. Flavonóides - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Panis, Carolina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 61

ELAINE DA SILVA SIQUEIRA

**Mecanismos antiproliferativos do tratamento *in vitro* com *trans*-chalcona
em linhagens de carcinoma cervical humano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Orientadora: Dra. Carolina Panis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -
UNIOESTE

Prof. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Vanessa Jacob Victorino
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ

Londrina, 28 de setembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida, por ter guiado meus passos e estar presente em todos os obstáculos encontrados ao longo dessa etapa.

À minha orientadora Professora Dra. Carolina Panis não só pela constante orientação neste trabalho, mas pela confiança e por ter proporcionado um melhor desempenho no meu processo de formação profissional.

À minha co-orientadora Professora Dra. Ivete Conchon-Costa que me recebeu com todo carinho e atenção em seu laboratório, pela sua amizade e colaboração inestimáveis em introduzir-me à vida acadêmica e científica.

Ao Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli pelo apoio, incentivo e oportunidade de desenvolver esse trabalho junto à sua equipe de pesquisa.

A Prof. Dr. Mário Sergio Mantovani, por ter aberto as portas de seu laboratório, por ter sido tão atencioso em guiar meu aprendizado, pela paciência e contribuição estrita para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Danielle Lazarin Bidóia por conceder as células tumorais para a realização deste estudo, pela sua amizade, sugestões, disponibilidade em realizar a microscopia eletrônica e colaboração essencial nesse trabalho.

À Profa. Dra. Idessania Nazareth Costa pela amizade e incentivo no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos professores, que ministraram as disciplinas do Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, meus agradecimentos pela oportunidade de partilhar conhecimentos.

À equipe de trabalho do Hospital Dr. Anísio Figueiredo pela colaboração e apoio quando foi necessário flexibilidade em meus horários para dar sequência aos meus experimentos.

Aos integrantes da banca de qualificação, Dra. Marla Karine Amarante, Dra. Karen Brajão de Oliveira, Dr. Mário Sergio Mantovani e a Dra. Vanessa Jacob Victorino, pelo tempo concedido e contribuições ímpares para o

desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço às fontes de fomento CAPES, CNPq e FINEP pelo financiamento do meu projeto.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia e Doenças Negligenciadas e Câncer (LIDNC): Carolina Jacob, Amanda Carloto, Mariana Detoni, Ellen Souza, Thaylon Felipe, Fernanda Tomiotto-Pellissier, Bruna Bortoleti, Manoela Gonçalves, Carolina Jacob, Fabrício Inoue, Yasmin Munhoz, Juliana Bitencourt, Raisa Ferreira, Natália, em especial à Virgínia Concato pela parceria experimental e disponibilidade em ajudar em todos os momentos, enfim, a todos que não pouparam esforços em me ajudar e ensinar. Agradeço todo o apoio, ensinamentos, espírito de equipe e companheirismo.

Ao meu esposo, Antonio Marcos Alves de Sene Junior, companheiro de todas as horas, que me compreendeu minha ausência enquanto eu me dedicava à realização desse trabalho e me concedeu apoio e suporte essenciais para que eu conseguisse finalizá-lo.

Ao meu filho amado, Benjor Sene Siqueira, que chegou em meio à esse processo de conclusão de curso, mas que me encheu de mais força e motivação para que eu não desistisse do meu objetivo.

Aos meus pais, meus maiores exemplos. Obrigada por todo amor, dedicação e incentivo. A minha mãe Maria Elizabete da Silva Siqueira, por não me deixar desistir nas dificuldades, por suas orações e palavras de encorajamento. Ao meu amado pai Edson Bueno de Siqueira, que sempre me deu total apoio e tem sido meu porto seguro durante todo esse tempo.

À minha querida irmã Vanessa da Silva Siqueira, pela amizade incondicional e cuidado comigo, por me incentivar e partilhar do imenso amor de irmã.

Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e certamente impactaram na minha formação acadêmica.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos”*

SIQUEIRA, Elaine da Silva. **Mecanismos antiproliferativos do tratamento *in vitro* com *trans*-chalcona em linhagens de carcinoma cervical**. 110 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

Moléculas derivadas de plantas medicinais tem sido fonte de pesquisa para novas terapias antineoplásicas como monoterapia ou terapia adjuvante. Neste estudo, investigamos o impacto do tratamento com *trans*-chalcona (TC) sobre duas linhagens celulares de diferentes tipos histológicos de carcinoma cervical, com destaque para o adenocarcinoma (HeLa) e carcinoma de células escamosas (SiHa). As linhagens foram tratadas com concentrações crescentes de *trans*-chalcona (6,25 - 100 μM) e a concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi determinada em 28 μM (HeLa) e 23 μM (SiHa) em 24 horas. Para avaliar os mecanismos de ação envolvidos foram realizados ensaios para determinar a viabilidade celular por 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e azul de tripan, microscopia de varredura (MEV) e transmissão (MET) para constatar alterações morfológicas e ultraestruturais, bem como os possíveis mecanismos de morte envolvidos e análises de estresse oxidativo, que incluíram a avaliação do perfil de despolarização mitocondrial, dosagem dos níveis de hidróperóxidos, determinação da capacidade antioxidante, dosagem dos metabólitos do óxido nítrico e avaliação dos perfis dos fatores de transcrição reguladores do balanço redox NRF2 e NFkB, realizados por marcação com tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE), terc-butil hidróperóxido, parâmetro antioxidante total de captura de radicais (TRAP), diclorofluoresceína (DCF) e imunofluorescência, respectivamente. Observamos que o tratamento com TC em linhagens HeLa e SiHa de carcinoma cervical foi capaz de promover a redução da viabilidade celular, induzir alterações morfológicas e ultraestruturais com inibição da capacidade de migração do tecido nas duas linhagens. Posteriormente, descobrimos que o tratamento com TC foi capaz de promover despolarização mitocondrial, induzir a formação de gotículas lipídicas e vacúolos autofágicos com consequente morte celular por apoptose tardia. A TC também induziu a geração de estresse oxidativo observada pelo aumento da geração de hidróperóxidos na linhagem HeLa e diminuição em SiHa. Houve ainda redução na produção dos metabólitos do NOx em ambos modelos avaliados. Concomitantemente, observamos superexpressão de NRF2 e diminuição da regulação do NFkB em células HeLa, enquanto na linhagem SiHa houve apenas estímulo de NFkB. Estes achados sugerem que a TC exerce seu efeito antiproliferativo no câncer cervical a partir da redução significativa da viabilidade das células HeLa e SiHa em todos os tempos testados ($p \leq 0,0001$), indução de atividade citostática e geração de estresse oxidativo via distintos mecanismos de acordo com a origem e tecido acometido, tornando-se uma alternativa terapêutica promissora no desenvolvimento de compostos antitumorais frente ao carcinoma cervical.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas, Adenocarcinoma, Flavonóides, Estresse oxidativo, Alterações Metabólicas.

SIQUEIRA, Elaine da Silva. **Antitumor mechanisms of *in vitro* treatment with *trans*-chalcone in cervical carcinoma cell lines**. 110 f. Thesis (PhD in Clinical and Laboratory Pathophysiology) - State University of Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Molecules derived from medicinal plants have been a source of research for new antineoplastic therapies as monotherapy or adjuvant therapy. In this study, we investigated the impact of *trans*-chalcone (TC) treatment on two cell lines representing different histological types of cervical carcinoma, especially adenocarcinoma (HeLa) and squamous cell carcinoma (SiHa). The lineages were treated with increasing concentrations of *trans*-chalcone (6.25 - 100 μ M) and the 50% cell inhibitory concentration (IC_{50}) was determined at 28 μ M (HeLa) and 23 μ M (SiHa) in 24 hours. In order to assess the mechanisms of action involved, tests were carried out to determine cell viability using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide (MTT) and trypan blue, scanning (SEM) and transmission (MET) microscopy to determine morphological and ultrastructural changes, as well as the possible death mechanisms involved and oxidative stress analyses, which included assessing the mitochondrial depolarization profile, dosage of hydroperoxide levels, determination of antioxidant capacity, dosage of nitric oxide metabolites and evaluation of the profiles of the redox balance regulating transcription factors NRF2 and NF κ B, carried out using tetramethylrhodamine-ethyl ester (TMRE) labeling, tert-butyl hydroperoxide, total radical scavenging antioxidant parameter (TRAP), dichlorofluorescein (DCF) and immunofluorescence, respectively. We observed that treatment with TC in HeLa and SiHa cervical carcinoma cell lines was capable of promoting a reduction in cell viability, inducing morphological and ultrastructural alterations with inhibition of tissue migration capacity in both cell lines. Subsequently, we found that treatment with TC was able to promote mitochondrial depolarization, induce the formation of lipid droplets and autophagic vacuoles with consequent cell death by late apoptosis. TC also induced the generation of oxidative stress, observed by an increase in the generation of hydroperoxides in the HeLa and a decrease in SiHa cell. There was also a reduction in the production of NO $_x$ metabolites in both models. At the same time, we observed overexpression of NRF2 and downregulation of NF κ B in HeLa cells, while in the SiHa cell there was only stimulation of NF κ B. These findings suggest that TC exerts its antiproliferative effect on cervical cancer by significantly reducing the viability of HeLa and SiHa cells at all times tested ($p \leq 0.0001$), inducing cytostatic activity and generating oxidative stress via different mechanisms depending on the origin and tissue affected, making it a promising therapeutic alternative in the development of antitumor compounds against cervical carcinoma.

Key-words: Squamous Cell Carcinoma, Adenocarcinoma, Flavonoids, Oxidative Stress, Metabolic Alterations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da carcinogênese: iniciação, promoção e desenvolvimento	15
Figura 2 – Cânceres com maior incidência no mundo, independente do sexo.....	16
Figura 3 – Incidência de câncer em Mulheres (A) e em Homens (B) no Brasil para o triênio 2023-2025 segundo dados do Instituto Nacional de Câncer.....	17
Figura 4 – Taxas de Mortalidade por câncer em Mulheres (A) e em Homens (B) no Brasil segundo o Instituto Nacional de Câncer.....	18
Figura 5 – Estimativa mundial de câncer em mulheres no mundo (A) e no Brasil (B).....	19
Figura 6 – Taxas de mortalidade por câncer no mundo (A) e no Brasil (B)....	19
Figura 7 – Câncer cervical e seus subtipos.....	21
Figura 8 – Microambiente intraepitelial cervical durante evolução das lesões precursoras em câncer	28
Figura 9 – Formação e metabolismo das espécies reativas (ERs)	29
Figura 10 – Estrutura geral da Chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona).....	37
Figura 11 – Conformações <i>trans</i> e <i>cis</i> da Chalcona.....	39
Figura 12 – Estrutura da <i>trans</i> -Chalcona (1,3-diphenyl-2-propen-1-one).....	41
Figura 13 – Resumo gráfico das linhagens HeLa e SiHa.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Adenocarcinoma
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ALT	Alanina transaminase
AP-1	Proteína ativadora 1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato transaminase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CDKs	Quinase dependente de ciclina
CHC	Carcinoma hepatocelular
cHSILs	Lesões escamosas intraepiteliais de alto grau
cLSILs	Lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau
DCF	2',7'-diclorofluoresceína fluorescente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOE	Desoxielefantopina
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERs	Espécies reativas
FAL	Fosfatase alcalina
GF-R	Receptor de fator de crescimento
GLOBOCAN	Observatório Global do Câncer
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona total
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HFD	Hiperlipídica
HIF-1 α	Fator 1-alfa induzível por hipóxia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HO [•]	Radical hidroxil
HPV	Papilomavírus Humano
HPVA	Associado ao Papilomavírus Humano
HPVI	Independente do Papilomavírus Humano
hrHPV	Papilomavírus Humano de alto risco
HSF1	Fator de choque térmico 1
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IDO-1	Enzima imunorreguladora indoleamina 2,3-dioxigenase-1
IFN- γ	Interferon gama
I-kB	Proteína inibitória kappa B
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina-1-beta
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IST	Infecção Sexualmente Transmissível

KLF9	Proteína dependente de vitamina K
M1	Macrófagos do tipo 1
M2	Macrófagos do tipo 2
MPO	Mieloperoxidase
MET	Microscopia eletrônica de varredura
MEV	Microscopia eletrônica de transmissão
MU	Leiomioma uterino
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCCN	Rede Nacional de Câncer Abrangente
NFκB	Fator de transcrição kappa B
NO	Óxido nítrico
NRF2	Fator nuclear-eritróide 2 p45 relacionado ao fator 2
O ₂ [•]	Radical ânion superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
p53	Proteína 53
Pap	Papanicolau
PD-1	Proteína de morte programada 1
PD-L1	Ligante de morte programada co-inibitória 1
PDT	Terapia fotodinâmica
pRb	Proteína do retinoblastoma
SBO	Sociedade Brasileira de Oncologia
SDT	Terapia sonodinâmica
SIL	Lesão intraepitelial escamosa cervical
SOD	Superóxido dismutase
TC	<i>trans</i> -chalcona
TGF	Fator de crescimento transformador
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TP53	Proteína tumoral p53
Tregs	Células T reguladoras
TSA	Ácido siálico total
VPMA	Varição Percentual Média Anual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	CÂNCER: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA	14
1.2	CARCINOMA	18
1.2.1	Epidemiologia	18
1.2.2	Classificação.....	20
1.2.3	Modelos de estudo <i>in vitro</i> do câncer cervical	23
1.2.4	Patogenia do câncer cervical.....	25
1.2.5	Microambiente tumoral do câncer cervical.....	27
1.2.6	Mecanismo inflamatórios no carcinoma cervical.....	28
1.2.7	Tratamento do câncer cervical.....	34
2	O USO DE COMPOSTOS NATURAIS COMO TERAPIA ADJUVANTE NO CARCINOMA CERVICAL	35
2.1	CHALCONAS: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E POTENCIAL ANTICÂNCER.....	37
2.2	<i>TRANS</i> -CHALCONA	40
2.3	MECANISMOS ANTITUMORAIS DA TC	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	RESULTADOS	44
4.1	ARTIGO 1: <i>trans</i> -chalcona induz atividade antiproliferativa em linhagens HeLa e SiHa de Carcinoma Cervical Humano por meio de estresse celular e autofagia.....	44
4.2	ARTIGO 2: Tratamento com <i>trans</i> -chalcona induz estresse oxidativo, despolarização mitocondrial e distinta expressão dos fatores de transcrição NRF2 e NFkB em células de carcinoma cervical.....	63
5	CONCLUSÃO	83
6	REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA

O câncer é caracterizado como uma massa anormal de tecido cujo crescimento é excessivo e não coordenado em relação aos tecidos normais (ABBAS et al., 2010, OPAS, 2020).

A transformação de uma célula diferenciada normal em uma célula tumoral ocorre pela ação de agentes carcinogênicos, que podem ser biológicos, físicos ou químicos. A partir desses estímulos, inicia-se o processo de formação do câncer, denominado tumorigênese, que compreende quatro estágios: iniciação, promoção, progressão e transformação maligna (MARTÍNEZ-REYES & CHANDEL, 2021).

Na fase de iniciação, por meio de agentes mutagênicos ou carcinógenos, ocorrem modificações em alguns genes das células promovendo alterações irreversíveis no ácido desoxirribonucleico (DNA) que, quando ativadas no próximo estágio, impulsionam a proliferação celular de maneira autônoma. Embora nesta etapa a morfologia seja igual às células normais, o que as difere são as alterações genóticas fundamentais para sua transformação e promoção do crescimento celular (HANAHAN & WEINBERG, 2011, LEMAIRE et al., 2020). No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem o efeito dos oncopromotores, os quais transformam a célula iniciada em célula maligna, de forma lenta e gradual (SBO, 2022).

Na fase de progressão, ocorre a amplificação clonal da célula iniciada com crescimento celular acelerado, e que, através da transformação maligna, origina um tumor maligno capaz de invadir os tecidos circundantes e formar metástases, bem como ocasionar alterações moleculares, bioquímicas, metabólicas e morfológicas locais e sistêmicas (**Figura 1**) (BAERISWYL & CHRISTOFORI, 2009, LEMAIRE et al., 2020).

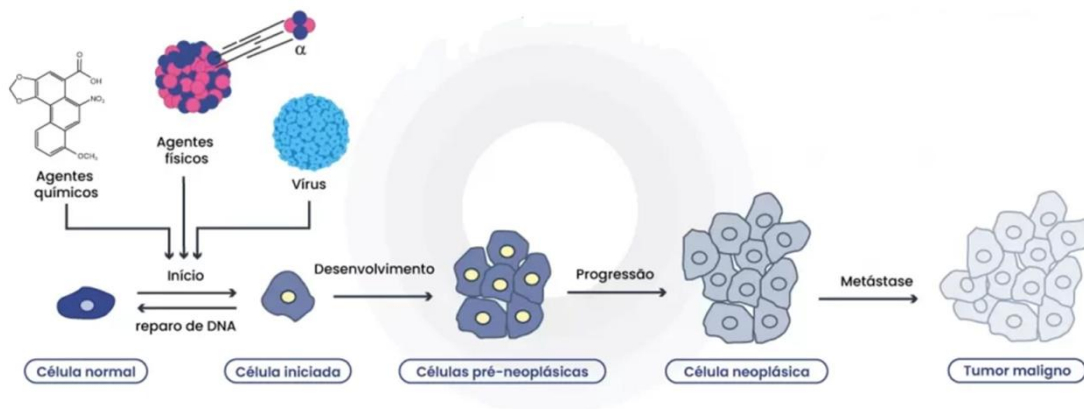
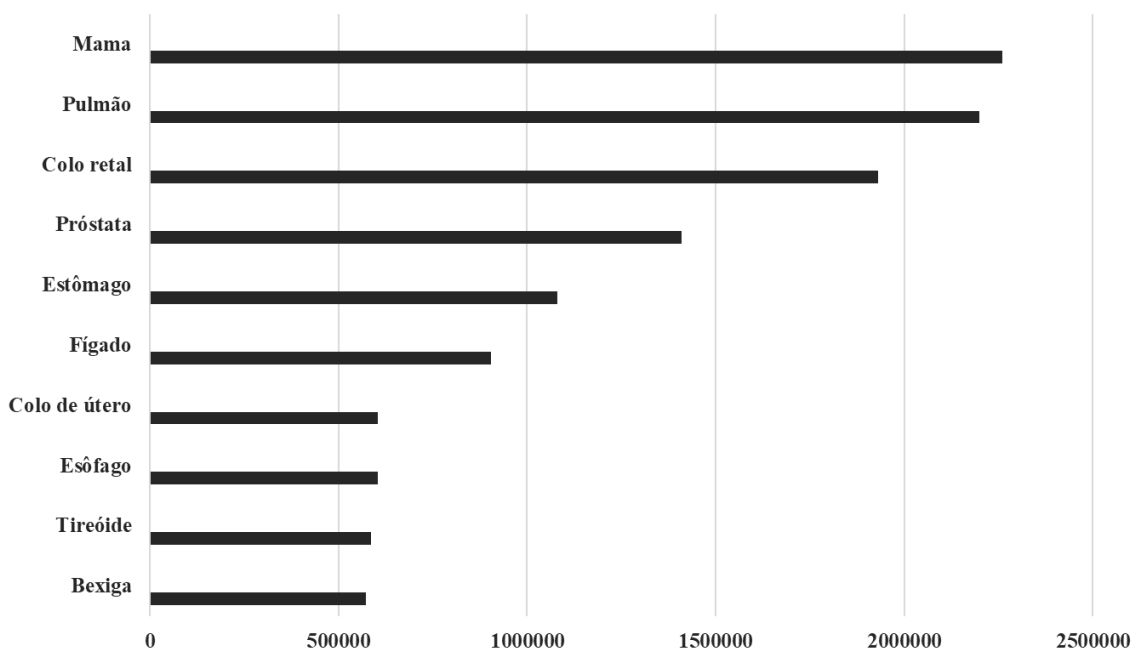


Figura 1: Etapas da carcinogênese: iniciação, promoção e desenvolvimento (adaptado de SBO, 2022).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o risco geral de desenvolvimento de câncer na população é de 20%. Esta é a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por cerca de 9,6 milhões de óbitos (OMS, 2018). Em 2020, foram estimados 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo (GLOBOCAN, 2020). Isso se deve, principalmente, ao processo de envelhecimento natural, que propicia o acúmulo das mutações que favorecem o câncer. Fatores de risco se somam a este processo, como tabagismo, obesidade, doenças cardiovasculares e respiratórias, fatores ocupacionais com exposição às radiações, consumo de álcool e de alimentos não saudáveis. Tais fatores podem ser encontrados no ambiente físico, herdados ou serem resultado de comportamentos, hábitos ou costumes próprios de um determinado ambiente social e cultural (INCA, 2023).

Devido ao aumento tanto da incidência quanto da mortalidade, esta doença tornou-se um dos principais problemas de saúde pública do mundo (BRAY et al., 2018). Estima-se que um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres em todo o mundo desenvolverão câncer ao longo de sua vida, e que um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres morrerão por consequência dessa doença (GLOBOCAN, 2020).

Com base nos dados divulgados pelo Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) em 2020 a sequência dos dez cânceres com maior incidência no mundo é: mama (2,26 milhões de casos), pulmão (2,20 milhões), colorretal (1,93 milhões), próstata (1,41 milhões), estômago (1,08 milhões), fígado (905 mil), colo

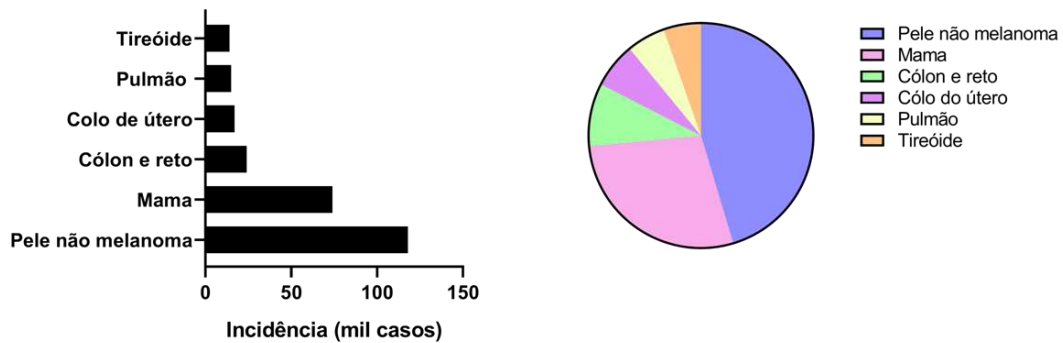


do útero (604 mil), esôfago (604 mil), tireoide (586 mil) e bexiga (573 mil), conforme ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2: Cânceres com maior incidência no mundo, independente do sexo (GLOBOCAN, 2020).

No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2023-2025 é de 704 mil novos casos dessa doença. Nas mulheres, a maior incidência será para tumores de pele não melanoma, com 118 mil casos (32,7%), seguido de câncer mama, com 74 mil casos (20,3%), cólon e reto, com 24 mil casos (6,5%), colo do útero, com 17 mil casos (4,7%), pulmão, com 15 mil casos (4,0%) e tireoide, com 14 mil casos (3,9%). Nos homens, estima-se maior ocorrência de tumores de pele não melanoma, com 102 mil casos (29,9%), próstata, com 72 mil casos (21,0%), cólon e reto, com 22 mil casos (6,4%), pulmão, com 18 mil casos (5,3%), estômago, com 13 mil casos (3,9%), e cavidade oral, com 11 mil casos (3,2%) **Figura 3** (INCA, 2023).

A)



B)

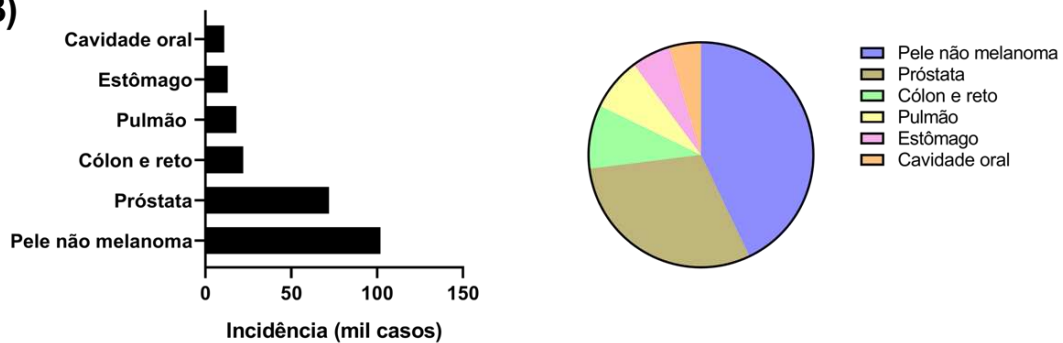


Figura 3: Incidência de câncer em mulheres (A) e em homens (B) no Brasil para o triênio 2023-2025 segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2023).

Em relação às taxas de mortalidade estimadas em 2020 no Brasil (**Figura 4**), nas mulheres o câncer de mama também aparece em primeiro lugar (13,6 óbitos/100 mil), seguido do câncer de pulmão (8,4/100 mil), colorretal (7,4/100 mil) e câncer de colo uterino (7,3/100 mil). Nos homens, há maior número de óbitos relacionado ao câncer de pulmão (14,2/100 mil), posteriormente próstata (14,1/100 mil), colorretal (9,6/100 mil) e estômago (8,6/100 mil) (INCA, 2022).

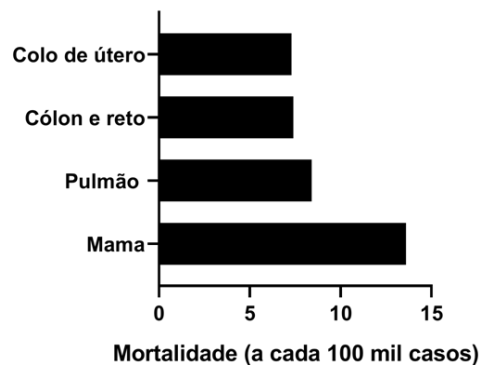
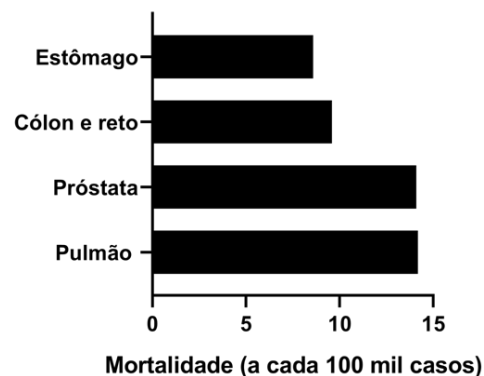
A)**B)**

Figura 4: Taxas de Mortalidade por câncer em mulheres (A) e em homens (B) no Brasil segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022).

Devido à sua elevada incidência, possibilidade de prevenção e alta letalidade se diagnosticado tardiamente, apresentamos a seguir os principais aspectos clínicos patológicos e moleculares do câncer cervical, que foi o modelo de estudo deste trabalho.

1.2 CARCINOMA CERVICAL

1.2.1 Epidemiologia

O câncer cervical ou câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais prevalente em mulheres no mundo, com mais de meio milhão de novos casos a cada ano (MOMENIMOVAHED et al., 2023). De acordo com a GLOBOCAN, a estimativa mundial no ano de 2022 foi de 6,5% novos casos, o que representa 604.127 mil casos em uma população feminina de 9.227.484 milhões, correspondendo a um risco estimado de 13,30 casos por 100 mil mulheres (**Figura 5A**).

No Brasil, representa o terceiro lugar, com 7,4% das ocorrências, número equivalente 77.182 mil casos por câncer cervical (**Figura 5B**). Para cada ano do triênio de 2023 a 2025 estima-se 17.010 mil novos casos, o que corresponde a um risco estimado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres brasileiras (GLOBOCAN, 2022).

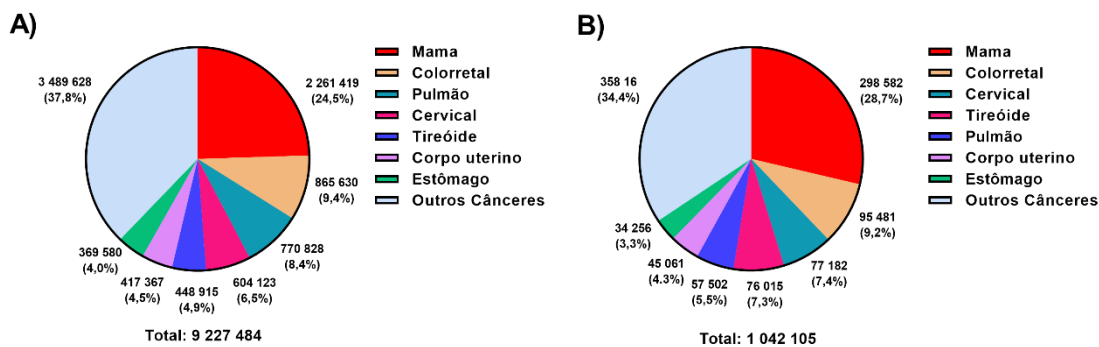


Figura 5: Estimativa mundial de câncer em mulheres no mundo (A) e no Brasil (B) (adaptada de acordo com dados disponibilizados pela GLOBOCAN, 2022).

Em relação ao número estimado de mortes relacionadas a esse tipo de tumor, estatísticas divulgadas em 2020 mostram que esse tipo de câncer foi uma das principais causas de morte em mulheres, representando 7,7% dos casos, com 341.831 mil óbitos no mundo em 4.429.323 mulheres (**Figura 6A**). No Brasil, também representou uma taxa de mortalidade de 8,7%, com 40.750 mil óbitos (BEDEL et al., 2020, GLOBOCAN, 2022) (**Figura 6B**).

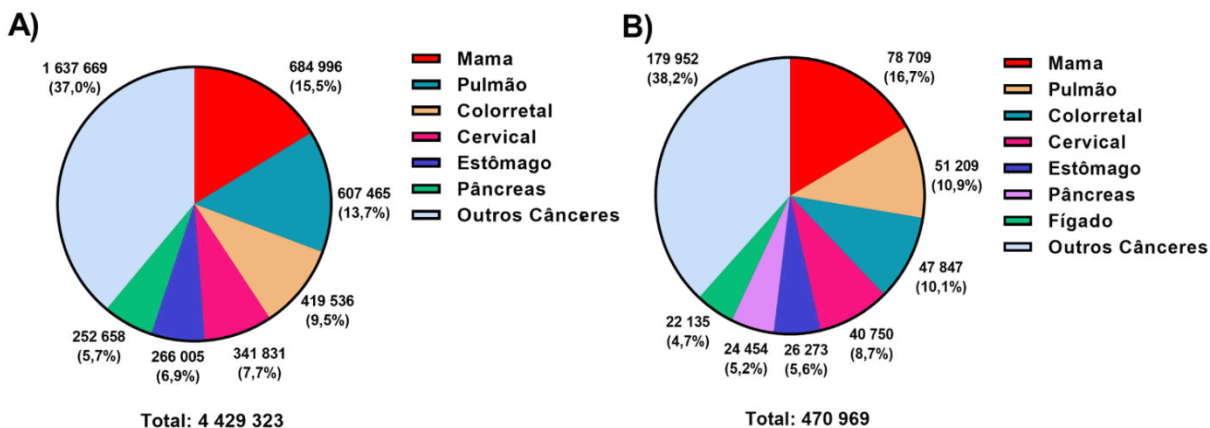


Figura 6: Taxas de mortalidade por câncer no mundo (A) e no Brasil (B) (adaptado de acordo com dados disponibilizados pela GLOBOCAN, 2022).

O último levantamento realizado no período de 2018-2020 indicou 19.749 óbitos por 100.000 mulheres na faixa etária de 0-80 e, a Variação Percentual Média Anual (VPMA) foi de 171,83 casos para o sexo feminino no período de 2018 a 2020 (INCA, 2021).

Portanto, essa neoplasia ginecológica é considerada um problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (GOMEZ & CASTILLO, 2004, SIEGEL et al., 2023).

1.2.2 Classificação

De acordo com a OMS, as neoplasias epiteliais de colo do útero podem ser classificadas como: escamosos ou espinocelulares e precursores, glandulares e seus precursores, epiteliais, tumores mesenquimais de lesões pseudotumorais, epiteliais e mesenquimais mistos, melanocíticos, linfóides e hematopoiético e secundários.

Os subtipos mais comuns são o carcinoma de células escamosas (CCE), localizado na ectocérvix e que representa 70% de todos os casos, representada pela linhagem SiHa, e o adenocarcinoma (ADC), situado na endocérvix, derivado de células epiteliais secretoras/glandulares, com 25% das ocorrências simbolizada pela linhagem HeLa (COHEN et al., 2019, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023) **(Figura 7)**.

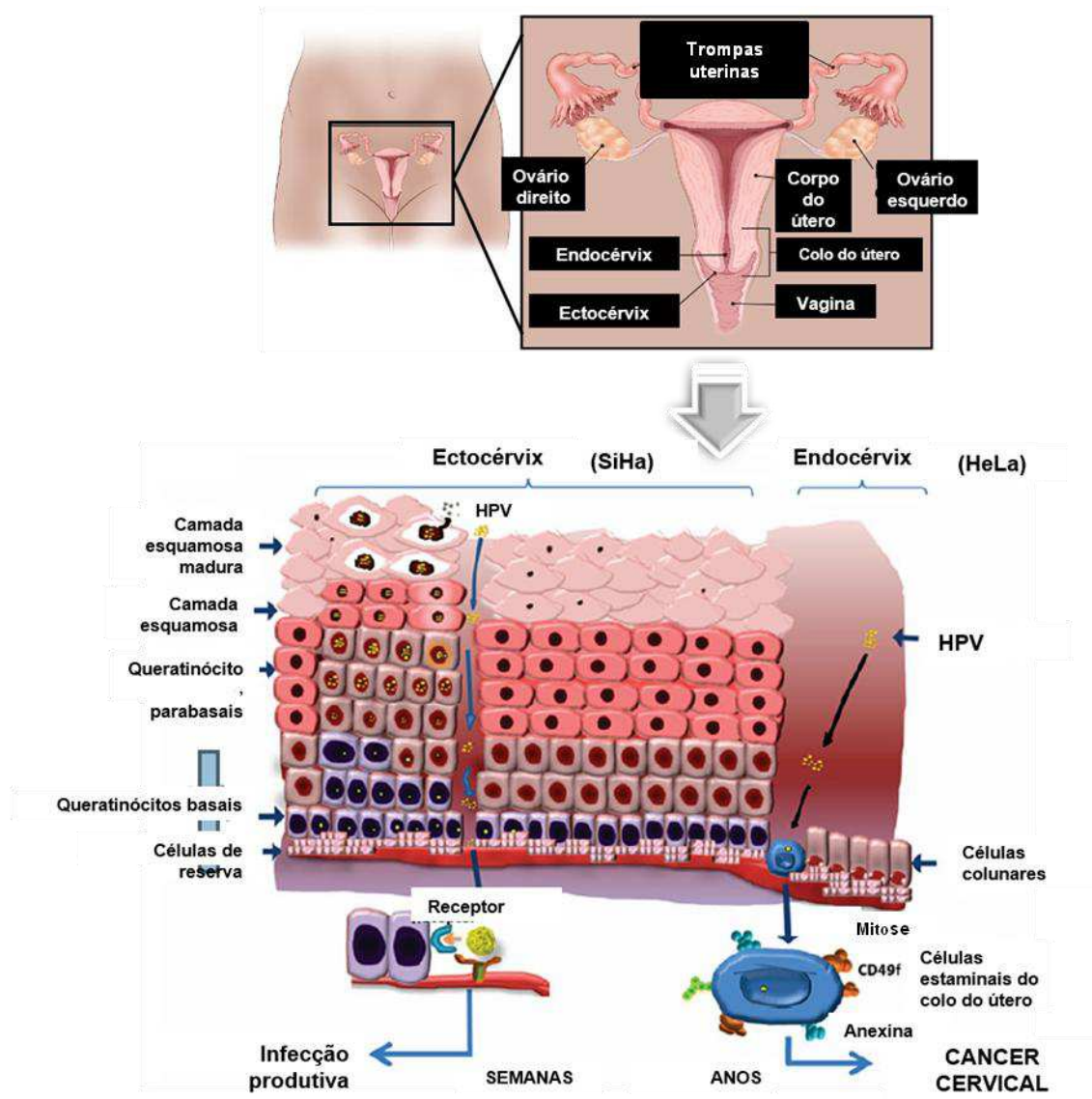


Figura 7: Câncer cervical e seus subtipos. Carcinoma de células escamosas (CCE), localizados na ectocérvix, representada pela linhagem SiHa que, ocasionam proliferação de células basais/parabasais. Adenocarcinoma (ADC) situado na endocérvix, simbolizada pela linhagem HeLa, atingem principalmente as células estaminais, ambas relacionadas à infecção crônica pelo papilomavírus humano (HPV) (adaptado de Tingting et al., 2015).

O câncer de colo de útero normalmente se inicia através da ocorrência de lesões no colo uterino, que apresentam graus de alterações morfológicas distintos. A lesão intraepitelial escamosa cervical (SIL) é uma lesão pré-cancerosa que pode evoluir para câncer cervical se não for tratada (KWOK et al., 2023). É detectada no epitélio escamoso do colo uterino e classificada como lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (cLSILs) ou de alto grau (cHSILs) (OMS, 2020, KWOK et al., 2023). Essa classificação de tumores da

OMS baseia-se na proporção e localização das células imaturas no epitélio escamoso e nas alterações citopáticas causadas pelo papilomavírus humano (HPV) (OMS, 2020).

As cLSILs são caracterizadas pela proliferação de células basais/parabasais no terço inferior do epitélio juntamente com alterações nucleares e citoplasmáticas causadas pelo HPV (OMS, 2020). Por outro lado, as hSILs apresentam proliferação de células basais/parabasais que se estende até o terço médio e superior do epitélio, além de anormalidades nucleares em toda a espessura do epitélio (OMS, 2020, KWOK et al., 2023).

O início e a progressão do CCE estão comumente relacionados à infecção crônica pelo HPV o que representa cerca 80-90% dos carcinomas de células escamosas (KALLIALA et al., 2020, LIU et al., 2023). A presença de inflamação estromal, reação desmoplásica estromal, numerosos grupos únicos ou pequenos de células epiteliais altamente displásicas, cristas alongadas e perda da polaridade nuclear são algumas das características que determinam a invasividade do CCE. Em relação ao grau histológico, podem ser caracterizados como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (JAIN & LIMAEM, 2023, BRAMBS et al., 2019).

Estudo realizado por Hu et al. (2023) mostrou que no CCE o aumento da infiltração de células imunes pode provocar diferenças significativas no prognóstico e evolução do quadro da paciente, por isso, a importância da utilização de biomarcadores emergentes, como células TH1/interferon gama (IFN- γ), a fim prever a eficácia e potenciais efeitos clínicos da imunoterapia tumoral. Já o ADC, com base na morfologia e etiologia usando os Critérios e Classificação Internacional de Adenocarcinoma Endocervical, é categorizado em associado ao HPV (HPVA) ou independente do HPV (HPVI) (STOLNICU et al., 2018, MORI et al., 2023). O HPVA representa a maioria dos ADCs, originado secundariamente de uma infecção persistente e o HPVI, responsável por aproximadamente 15% a 20% de todos os casos (MCCLUGGAGE et al., 2020).

O ADC apresenta mecanismo molecular único, fenótipo mais maligno e pior prognóstico devido à ausência de sintomas ao exame clínico e maior propensão para metástase, recorrência e resistência à quimioterapia. No

entanto, são utilizadas as mesmas estratégias de tratamento convencionais do CCE (QIU et al., 2023).

Um estudo de coorte mostrou que mulheres adultas maduras apresentaram maior probabilidade de serem diagnosticadas com ADC em estágio inicial (44%), sem diferença significativa para o CCE, porém, a incidência absoluta e relativa do ADC entre mulheres jovens tem aumentado (SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2020).

Além disso, essas duas variantes apresentam mutações em genes diferentes, como *PIK3CA* em CCE e expressão de *KRAS* exclusivamente em ADC (OJESINA et al., 2014). Mas, o subtipo ADC está associado a piores resultados de sobrevida do que aqueles com CCE (ZHOU et al., 2017).

Os meios de prevenção disponíveis englobam citologia cervical, teste primário de HPV, ou ambos (co-teste) além de vacinas contra HPV. Todavia, quando detectada alguma anormalidade, o diagnóstico é estabelecido principalmente com base no exame histopatológico e, o método de tratamento comumente usado é a biópsia excisional, sendo o padrão-ouro para avaliação histológica de biópsias cervicais (PETRY, 2011, LIMAEM & MAHDY, 2023).

No entanto, este tipo de tratamento pode afetar a anatomia do colo do útero, e, conseqüentemente, sua funcionalidade, com risco de parto prematuro e resultados neonatais adversos, além de infertilidade (COSTANTINI et al., 2013, KYRGIU et al., 2016). Além disso, há muitos casos recorrentes, diagnosticados geralmente dentro de três anos após o tratamento do tumor primário, bem como casos de recorrências tardias com maior período de tempo (LIMAEM & MAHDY, 2023).

1.2.3. Modelos de estudo *in vitro* do câncer cervical

Considerando-se a importância destes dois tipos histológicos no câncer cervical, existem atualmente dois modelos *in vitro* baseados nos tipos celulares que originam o CCE e o ADC, a SiHa e a HeLa, respectivamente. Estes modelos celulares foram utilizados neste trabalho para estudo do carcinoma cervical.

O estudo dessa neoplasia envolve a utilização de linhagens celulares derivadas de diferentes tipos celulares e relacionadas aos tipos

histopatológicos mais frequentes observados no câncer cervical humano. São várias as linhagens de carcinoma cervical descritas na literatura de acordo com a origem e tecido acometido, como CaSki, ME-180, MS751, SiHa, SW756, CLNH5,5 (carcinoma de células escamosas ou epidermóide), HeLa, HEC-1-A (adenocarcinoma), C-33A (carcinoma células epitelial), dentre outras como HT-3, DoTc2 4510, C4I, RL95-2, C-4II e DAKIKI.

Na linhagem SiHa, as células escamosas cervicais são transformadas pelo HPV, cujos genótipos 16 e 18 representam 70% da prevalência (SANTANA et al., 2016). Sua progressão inclui a integração do HPV no DNA nestas células, os quais evidenciam oncoproteínas virais, especialmente E6 e E7, que são responsáveis pelas alterações iniciais nas células epiteliais, ou seja, infectam as camadas de células basais, ocasionando inativação das duas principais proteínas supressoras de tumor, proteína 53 (p53) e retinoblastoma (pRb) (LONGWORTH et al., 2004).

Essas proteínas são responsáveis pelos mecanismos de reparo do DNA, apoptose ou parada de crescimento, porém, quando inativada induz a proliferação celular acelerada, interrompe a angiogênese, inflama o microambiente (IL-1 β , IL-6) e acelera o desenvolvimento do tumor (SCHIFFMAN et al., 2007, LÖHMUSSAAR et al., 2021, GORVEL & OLIVE, 2023).

Dessa forma, logo após a infecção, a oncoproteína viral E6 degrada a proteína p53 e, assim, desativa sua função normal e impulsiona as células a entrarem na fase de síntese do ciclo celular (STEWART et al., 2004, BALASUBRAMANIAM et al., 2019). Por outro lado, ocorre a ligação de E7 à Rb, ocasionando a liberação do fator de transcrição E2F, o qual ativa a quinase dependente de ciclina (CDKs) e alavanca a promoção de células displásicas anormais (SANTANA et al., 2016, BALASUBRAMANIAM et al., 2019, REINSTEIN et al. 2000).

A linhagem HeLa, derivada de um adenocarcinoma do colo do útero de Henrietta Lacks, em 1951 (também conhecida como células de Henrietta), foi a primeira célula tumoral humana a ser cultivada e usada como modelo em laboratórios de pesquisa (LUCY et al., 2009).

A imortalidade celular é sua característica principal, pois ela sofre uma mutação na enzima chamada telomerase, cuja função é proteger os telômeros

e controlar a renovação dos cromossomos na divisão celular, conseqüentemente possuem a capacidade de se replicarem indefinidamente de maneira extremamente rápida sem sofrer danos quando se multiplica, tornando-a imortal (JONES et al., 1971, AKIYAMA, 1987, CALDAS, 2010, SKLOOT, 2011).

Além disso, por meio de diversos estudos realizados por Gey e colaboradores (1952) ao longo dos anos, confirmou-se que essa linhagem celular é positiva para HPV-18 (MARTINEZ et al., 2008, LUCEY et al., 2009). Os genótipos HPV-16 e HPV-18 estão presentes em mais de 65% das linhagens celulares de carcinomas cervicais invasivos, comumente encontrados acoplados ao cromossomo do hospedeiro (MEISSNER, 1999, MÜNGER & HOWLEY, 2002, ZUR HAUSEN, 2002, HEBNER & LAIMINS, 2006).

Por conta disso, as linhagens celulares HeLa e SiHa apresentam características que se assemelham ao modelo de carcinogênese cervical humano, o que as torna ótimas ferramentas para o estudo de drogas e mecanismos biológicos tumorais.

1.2.4 PATOGENIA DO CÂNCER CERVICAL

Os fatores de riscos associados à elevada probabilidade de desenvolvimento do câncer cervical podem ser de origem comportamental e incluem a atividade sexual, estilo de vida, idade precoce da primeira relação sexual, multiplicidade de parceiros sexuais sem uso de preservativo, número demasiado de gestações, tabagismo, displasia do colo do útero e, principalmente, o HPV (BEDELL et al., 2020, BOSCH & SANJOSE, 2003).

Outros fatores incluem infecções sexualmente transmissíveis (IST), como herpes, clamídia, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), além de co-infecções e imunossupressão (CASTELLSAGUE & MUNOZ, 2003, INCA 2023).

A infecção por alguns subtipos de HPV é um dos principais fatores de risco associados ao câncer uterino, sendo classificada de acordo com o tipo oncogênico do vírus (OYOUNI et al., 2023, GAVINSKI & DINARDO, 2023). As cepas de baixo risco geralmente são assintomáticas, originando lesões benignas sem potencial oncogênico. Por outro lado, as de alto risco

apresentam forte potencial oncogênico, sendo responsáveis por mais de 99% das lesões pré-cancerosas (displasia cervical), neoplasias, carcinomas cervicais e pelas lesões precursoras do câncer uterino (COHEN et al., 2019, BEDELL et al., 2020).

Na cérvix, a infecção inicia-se nas células basais, onde o vírus instaura o processo de replicação no núcleo ou permanece latente. A paciente infectada pelo HPV pode vir a desenvolver o câncer cervical invasivo 10 a 30 anos após a infecção primária (RHANDAL & GHEBRE, 2016, MURTA et al., 2000).

Vários fatores são implicados na carcinogênese cervical induzida pelo HPV, incluindo fatores intrínsecos relacionados ao processo inflamatório, como nucleotídeos extracelulares e adenosina-componentes do sistema purinérgico, integração do genoma viral com o genoma da célula hospedeira (o qual está associado com a progressão de lesões de baixo grau para alto grau), inativação de genes supressores de tumores (p53 e pRB) por oncoproteínas do HPV (E6 e E7), desregulação dos reguladores do ciclo celular (CDKs, ciclinas, APCs), síntese de DNA do hospedeiro e apoptose (JAYSHREE et al., 2009, SHU et al., 2022, KWON et al., 2016, PFAFFENZELLER et al., 2020).

Já os fatores extrínsecos envolvem o processo de tolerância imunológica do HPV e incluem APCs que expressam a enzima imunorreguladora indoleamina 2,3-dioxigenase-1 (IDO-1), diminuição de linfócitos Natural Killer, células T reguladoras (Tregs), aumento de interleucina-10 (IL-10), redução de interleucina-2 (IL-2) no microambiente tumoral, fator de crescimento transformador (TGF) e linfócitos CD4 e CD8 (MONNIER-BENOIT et al., 2006, ADURTHI et al., 2008, JAYSHREE et al., 2009, DE VOS VAN STEENWIJK et al., 2013, YANG et al., 2013, JIANG et al., 2019).

As alterações no equilíbrio citogenético acontecem no momento da transformação do epitélio cervical normal em câncer, onde pode haver participação de agentes carcinogênicos venéreos presentes no sêmen como o vírus de Epstein-Barr, citomegalovírus e herpes simples tipo II (RIVOIRE et al., 2006, VALKOVA et al., 2021). Os mecanismos disfuncionais levam à ruptura de mecanismos que estão envolvidos na diferenciação e morte celular programada, ocasionando cHSILs ou cLSILs (KHIEU & BUTLER, 2020, PFAFFENZELLER et al., 2020, MUNTINGA et al., 2022).

O desenvolvimento desta neoplasia está correlacionado à infecção persistente por HPV de alto risco (hrHPV), que comumente se desenvolve em 10% da população feminina, cujo sistema imunológico não consegue controlar a infecção viral (BASEMAN & KOUTSKY, 2005, VAN DER BURG & PALEFSKY, 2009, MUNTINGA et al., 2022). Portanto, a maior parte das HSIL e câncer cervical decorrem principalmente de dois tipos oncogênicos de hrHPV, o hrHPV-16 e hrHPV-18 (CLIFFORD et al., 2006, BOSCH et al., 2008), apontados como principais patógenos associados ao câncer cervical (BRANKOVIC et al., 2013).

1.2.5 MICROAMBIENTE TUMORAL DO CARCINOMA CERVICAL

Na neoplasia cervical, o microambiente imunológico é variável e determinante para a evolução das lesões precursoras em câncer. Assim, dependendo da resposta imune, as lesões podem regredir espontaneamente, permanecer estáveis ou progredir para cHSILs ou câncer cervical (MUNTINGA et al., 2022) (**Figura 8**).

O sistema imunológico desempenha papel crucial na regulação tumoral, sendo o sistema imune inato o primeiro a ser ativado seguido das respostas antitumorais adaptativas quando em contato com um antígeno. No entanto, a resposta imune inata aos tumores pode ser divergente, polarizando de duas formas: via células apresentadoras de antígenos (APCs) e macrófagos do tipo 1 (M1), impedindo a progressão tumoral, ou via células supressoras derivadas de mieloides e macrófagos do tipo 2 (M2), propiciando o crescimento tumoral (HAGERLING et al., 2015, BERRAONDO et al., 2016).

Em cHSILs, baixas concentrações da expressão de superfície dos antígenos CD4 e CD8 indicam uma evasão do sistema imune adaptativo por uma infecção persistente por hrHPV, o que pode levar à persistência da lesão e progressão para câncer cervical (MUNTINGA et al., 2022). Além disso, altas concentrações de células T com regulação positiva da via proteína de morte programada 1 (PD-1)/ ligante de morte programada co-inibitória 1 (PD-L1) em cHSILs induzem a tolerância das células T e consequente supressão imunológica no microambiente associado à progressão da doença (YANG et al., 2013).

Por outro lado, quando há regressão da cHSILs, as células displásicas são substituídas por células saudáveis, as quais se desenvolvem a partir da camada de células basais. Estas células ainda podem conter o genoma do HPV, persistir em estado de latência e, quando ocorre alteração do estado imunológico da paciente, pode haver a reativação viral com expressão dos seus genes virais resultando em doença recorrente (RAJCANI, 2007, GRAVITT, 2011, MAGLENNON et al., 2011).

No microambiente imune de cLSILs há diminuição do número de células T epiteliais e estromais CD4+ e CD8+ e aumento no número de macrófagos epiteliais M2, células Tregs estromais, proteína PD-L1 e expressão da enzima IDO-1, associados a um perfil de citocinas correlacionadas ao tumor (KOJIMA et al., 2013). Dessa forma, os mecanismos de imunossupressão no microambiente tumoral podem ser por duas vias: imunossupressão intrínseca ao tumor e imunossupressão adaptativa local (KATO et al., 2017, WANG et al., 2021).

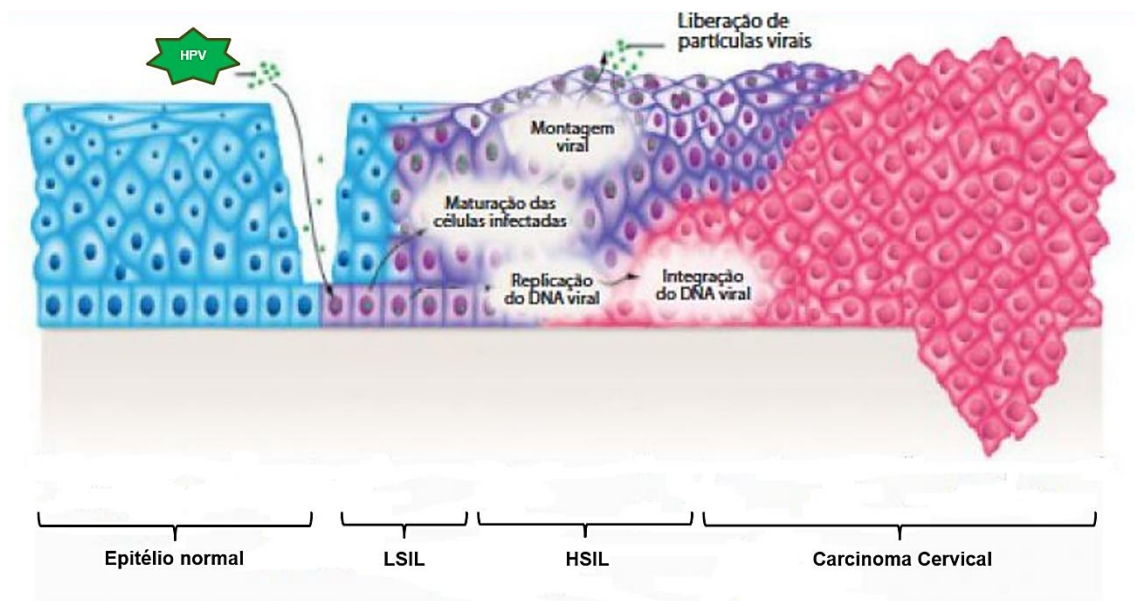


Figura 8: Microambiente intraepitelial cervical durante evolução das lesões precursoras em câncer (adaptado de Woodman et al., 2007).

1.2.6 MECANISMOS INFLAMATÓRIOS NO CARCINOMA CERVICAL

A ativação da resposta imune antitumoral tem como consequência a geração de mediadores que participam da resposta inflamatória. A ativação de subtipos celulares específicos e secreção de citocinas, mediada por fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NFkB), também leva à geração de subprodutos oriundos da redução incompleta do oxigênio durante respiração mitocondrial, conhecidos como espécies reativas (ERs) (YANG Y et al., 2017, YANG L et al., 2023).

A produção excessiva das ERs em situações onde a sua neutralização é ineficiente, gera uma condição denominada estresse oxidativo ou desequilíbrio redox, implicado na fisiopatologia de diversas doenças crônicas como o câncer (MOLONEY & COTTER, 2018, ARFIN et al., 2021).

As células possuem mecanismos bioquímicos e genéticos complexos para manter seu equilíbrio redox. A formação de ERs acontece quando não ocorre a redução completa do oxigênio molecular por meio de 4 reações sequenciais com doações de elétron até resultar em água (H₂O), conforme ilustrado na **Figura 9**. Embora, esses mediadores sejam discutidos como majoritariamente prejudiciais, os mesmos atuam como moléculas de sinalização intracelular no balanceamento pró-oxidante/antioxidante celular (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

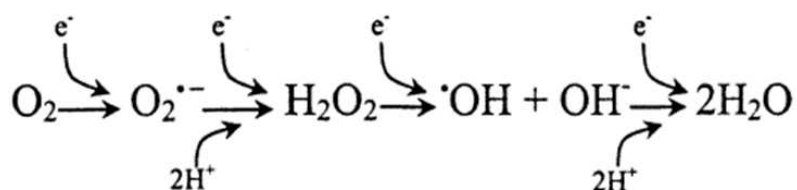


Figura 9: Formação e metabolismo das espécies reativas (ERs) (adaptado de Nordberg & Arnér, 2001).

Dessa forma, as diferentes concentrações de ERs produzidas nas células tumorais podem expressar resultados distintos em relação ao desenvolvimento do câncer (ZHAO et al., 2023). Podendo atuar de forma pró-tumoral através da ativação de sinais de promoção do crescimento, aumento da proliferação e invasão de células tumorais e danos a biomacromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Também, níveis mais elevados de ERs

podem aumentar o sinal antitumoral do corpo, iniciando a apoptose e a autofagia induzidas pelo estresse oxidativo nas células tumorais e, isso tem sido utilizado como uma nova estratégia antitumoral.

Usualmente, nas células tumorais a hiperproliferação é acompanhada por elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical de ânion superóxido [$O_2^{\bullet-}$], peróxido de hidrogênio [H_2O_2] e radical hidroxil [HO^{\bullet}]. Durante este processo também são formadas as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO) e seus metabólitos reativos, como o peroxinitrito ($ONOO^-$) (VAN DER REEST et al., 2018, HAYES et al., 2020).

A fim de amenizar os efeitos nocivos relativos à constante produção de ERs, existem sistemas antioxidantes diretos e indiretos que atuam sobre as EROS e ERNs retardando ou inibindo danos em estruturas celulares. Estas defesas podem ser enzimáticas, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) ou não-enzimáticas como as moléculas de baixo peso molecular de α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato e glutathione redutase (GSH) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).

Além disso, vários fatores de transcrição são ativados pelas ERs e regulam o estado redox das células, como a proteína ativadora 1 (AP-1), o fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α), o fator de choque térmico 1 (HSF1), o fator nuclear-eritróide 2 p45 relacionado ao fator 2 (NRF2) e p53 (MARINHO et al., 2014).

Dessa forma, as células tumorais, quando em condições de estresse oxidativo prolongado, ativam o fator IX, proteína dependente de vitamina K (KLF9) que acabam por regular negativamente NRF2 que, em níveis excessivos, também aciona os interruptores redox adicionais. Ainda, outros fatores de transcrição antioxidantes que modulam genes como NRF2, BACH1 AP-1, FoxO3 e PTEN também são ativados (XIAO et al., 2003, HAYES & DINKOVA-KOSTOVA, 2014).

Os alvos biológicos das ERs são os principais grupos de biomoléculas celulares, como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos graxos, com foco tanto nas ligações peptídicas quanto nas cadeias laterais (LEVINE, 2002). Outro ponto são as fragmentações oxidativas das bases do DNA por meio da depleção de GSH, as quais podem resultar em mutação ou danos nas fitas de DNA (HIGUCHI, 2003).

No câncer, as ERs são amplamente produzidas e atuam rapidamente ocasionando desregulação das funções celulares essenciais, como a replicação e reparo do DNA, além de gerar metabólitos ativos que estão diretamente relacionados aos fenômenos centrais na progressão tumoral, como a angiogênese e a vasodilatação (SHAW et al., 2013, MENCALHA et al., 2014, HE et al., 2023).

Durante a carcinogênese, ocorre oxidação do DNA pelas ERs gerando subprodutos como a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, responsável por ocasionar mutações. Outros alvos do ataque oxidativo são os lipídeos, os quais impulsionam reações de peroxidação lipídica, promovendo o aumento da permeabilidade da membrana e conseqüentemente indução de morte celular (REUTER et al., 2010, REMIGANTE et al., 2023). As proteínas também são afetadas pelas ERs, e por meio da oxidação podem sofrer modificações em sua estrutura, prejudicando seu funcionamento (DI MEO & VENDITTI, 2020, REMIGANTE et al., 2023).

Portanto, o aumento de ERs em células cancerígenas resultam em intensificação de diversas atividades celulares (metabólica, mitocondrial, peroxissomal, sinalização de receptores, oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases, oncogênica dentre outras) podendo agir de maneira pró ou antitumoral (STORZ, 2005, LIOU & STORZ, 2010, MOLONEY & COTTER, 2018).

Em diferentes tipos de câncer também ocorre o estímulo das vias de sinalização por meio de EROs via sinalização do receptor do fator de crescimento (GF-R) que promove ativação da NADPH oxidase (NOX1) ou da mitocôndria, com conseqüente indução de diversas cascatas de sinalização celulares por oxidação reversível de fosfatases como proteína modificadora da localização subcelular de FoxO3 (PTEN), o qual atua como importante inibidora da via PI3K/AKT, que pode culminar em ativação de NFκB (LIOU & STORZ, 2010).

Por outro lado, em 1988, Waters & Stack, foram os primeiros cientistas a manusearem a indução de ERO como terapia anticancerígena, com o uso de cloridarato de procarbazina, um medicamento quimioterápico muito empregado no tratamento de linfoma de Hodgkin e cânceres cerebrais. Desde então, vários fármacos quimioterapêuticos comuns (paclitaxel, vincristina e antifolato), têm

sido utilizados por promoverem a morte celular mitocondrial através da liberação de citocina c via indução de EROs (PANCHUK et al., 2017, MEGÍAS-VERICAT et al., 2018).

Um estudo realizado por Binder et al. (2019), utilizou dissulfonato de ftalocianina de cloralumínio (CIAIPcS₂) em células HeLa tratadas com terapia fotodinâmica (PDT) e terapia sonodinâmica (SDT), os quais estimulou um aumento substancial da fragmentação do DNA, induziu a produção de EROs e diminuição do índice de viabilidade dessas células.

Em linhagem Huh7 de carcinoma hepatocelular (CHC), a geração de EROs após tratamento com vitamina C, ocasionaram dano ao DNA e depleção de adenosina tri-fosfato (ATP), gerando estresse genotóxico e estresse metabólico, respectivamente, com ativação do inibidor de quinase dependente de ciclina p21, e conseqüente parada do ciclo celular na fase G2/M seguida de apoptose nessas células (LV et al., 2018).

Corroborando com estes resultados, Rincheval et al. (2012) também mostraram que as EROs endógenas ou exógenas estimuladas pelo uso de paraquat desencadearam múltiplas vias de morte celular através da ativação de genes relacionados à apoptose, como Bcl-2 e enzimas caspases.

Dessa forma, os estímulos inflamatórios das vias de sinalização influenciam no crescimento/proliferação celular, diferenciação, síntese proteica, metabolismo da glicose, sobrevivência celular e inflamação (REMIGANTE et al., 2023). E, no câncer cervical, essas disfunções podem impactar no desenvolvimento de lesões bem como na persistência do HPV (RIBAS & SUEN, 2013).

Estudos apontam que no carcinoma cervical ocorrem dois mecanismos que envolvem o estresse oxidativo e o HPV: atividade genotóxica do estresse oxidativo e inconstância genômica incitada pelo vírus, o que estimula o desenvolvimento de células neoplásicas e interação do estresse oxidativo com um ou mais estágios de iniciação e/ou progressão neoplásica induzida pela infecção por HPV (BORGES et al., 2018).

Beevi et al. (2007) demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo no câncer cervical através do aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de produtos do NO, com diminuição da atividade das enzimas SOD,

CAT e GPx, e elevação de GST, enfatizando o papel desempenhado por EROs e antioxidantes no câncer cervical.

De modo complementar, Manju et al. (2002) também observaram baixos níveis de SOD e CAT, e altos níveis dos marcadores tumorais como ácido siálico total (TSA), aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (FAL) na circulação de pacientes com câncer cervical. Tais achados revelam que o estresse oxidativo induzido por radicais livres pode ser exacerbado pelo decréscimo da eficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes.

Em outro estudo transversal realizado com pacientes com neoplasia cervical na Coreia do Sul, pesquisadores constataram diminuição nos níveis plasmáticos de múltiplos micronutrientes antioxidantes como carotenoides pró-vitamina A (β -caroteno e criptoxantina), carotenoides não pró-vitamina A (zeaxantina, licopeno e luteína), vitaminas antioxidantes solúveis em lipídios (α -tocoferol e γ -tocoferol), vitamina solúvel em água (ascorbato). Também, houve diminuição significativa dos níveis de glutathione peroxidase, sugerindo que o sistema antioxidante desempenha um papel importante no processo de transformação neoplásica do colo uterino (KIM et al., 2004).

Pandey et al. (2020) utilizaram um fitoquímico natural, desoxielefantopina (DOE) em células de leiomioma uterino (MU) e constataram que o tratamento induziu a produção de ROS através do estímulo da via apoptótica intrínseca mitocondrial mediada por caspase-3, além de inibir a proliferação destas através da parada do ciclo celular na fase G2/M e diminuição do potencial da membrana mitocondrial.

No Brasil, no estado do Pará, um estudo com mulheres de 14 a 60 anos com e sem lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau positivas ou não para HPV, mostrou a ocorrência de níveis mais elevados de malondialdeído e níveis mais baixos de SOD, CAT, GSH total e oxidada (GSSG) (BORGES et al., 2018).

Nesse contexto, a terapia antioxidante tem certa contingência, pois ao estimular o aumento de ERs, seu acúmulo intracelular pode interferir com a produção de alguns marcadores tumorais e ativar as vias da apoptose e da autofagia além de induzir parada do ciclo celular (LV et al., 2018, ZHAO et al.,

2023). Portanto, devido ao efeito bidirecional dos ERs, é surpreendente encontrar a sua ampla perspectiva de aplicação no tratamento de tumores.

Todavia, estas variações dos mecanismos inflamatórios e redox observadas nas pacientes com câncer de colo uterino podem representar possíveis alvos de investigação para futuras intervenções terapêuticas nestas pacientes (SOUZA et al., 2021).

1.2.7 TRATAMENTO DO CÂNCER CERVICAL

A escolha da terapia para o carcinoma cervical é baseada em uma série de fatores, incluindo o estágio do câncer, sua extensão e presença de metástases, além da idade e saúde geral do paciente (JOHNSON et al., 2019).

De acordo com as diretrizes de tratamento, recentemente atualizadas pela Rede Nacional de Câncer Abrangente (NCCN, 2023), os tratamentos farmacológicos para câncer cervical compreendem paclitaxel, fluorouracil, topotecano, doxorrubicina e fármacos à base de platina como, por exemplo, cisplatina e carboplatina (DUENAS-GONZALEZ, 2023, SHIRI et al., 2023, SINGH et al., 2020).

Além disso, são comumente usadas imunoterapias, visando estimulação do sistema imunológico através de produtos farmacêuticos (conjugados anticorpo-droga, nanopartículas de captura de antígeno, inibidores do ponto de controle imunológico, anticorpos monoclonais, terapias imunológicas baseadas em células e vacinas contra HPV), além de terapias combinadas, como associação de drogas PD-1/PD-L1 ou com outras terapias, radioterapia pélvica, quimioterapia (concomitante ou adjuvante), braquiterapia, quimiorradioterapia e intervenção cirúrgica delineadas como preservação ou não da fertilidade (RIZVI et al., 2018, JAIN, 2021, LÖHMUSSAAR et al., 2021, PATEL et al., 2023). Mas, para aumentar a eficiência do resultado, geralmente é realizada a combinação de dois ou mais desses tratamentos (LEITE et al., 2020, DE JAEGHERE et al., 2022, TOSSETTA & MARZIONI, 2023).

Todavia, a paciente com câncer de colo de útero é submetida ao tratamento polimodal, ou seja, que associa radioterapia, imunoterapia e, principalmente, quimioterapia citotóxica. Esta última apresenta elevada toxicidade e nem sempre é efetiva no câncer cervical (MOTOKI et al., 2012, SCHIFFMAN, 2017, VIZZA et al.,

2019, SINGH et al., 2020). Além disso, apresentam resistência à droga, causada pela inativação e metabolismo de drogas por diferentes enzimas, como citocromos P450 e, efeitos colaterais graves, principalmente neurotoxicidade e nefrotoxicidade, causando recorrência do tumor (MANDERS et al., 2018, AL-SARAIREH et al., 2021).

Apesar de o câncer cervical ser uma doença quase que 100% prevenível, seu diagnóstico ainda ocorre de forma tardia em diversos países, levando as pacientes ao tratamento quimioterápico (VALE et al., 2010, RANDALL & GHEBRE, 2016). Mesmo com avanços das terapias disponíveis para impedir a progressão dessa neoplasia, como cuidados preventivos por meio da vacinação para HPV e realização de testes regulares de Papanicolau (Pap), ainda há muitos problemas relacionados com a resistência do tumor, metástase, radiorresistência excessiva, quimiorresistência e altas taxas de recorrência, além dos diversos efeitos adversos a longo prazo, como toxicidade hematológica, gastrointestinal e geniturinária, recorrência local ou disseminação secundária (30-40% dos pacientes), micrometástases, sobrevida global de 5 anos (68%) e sobrevida livre de progressão (66%) (MUNDT et al., 2003, VALE et al., 2010, RANDALL & GHEBRE, 2016, DURU BIRGI et al., 2018, LÖHMUSSAAR et al., 2021, MA et al., 2023, WANG et al., 2023).

Além disso, no microambiente pró-oxidante o efeito dos fármacos antineoplásicos acaba por afetar a adaptação das células tumorais e assim, compromete a eficácia da quimioterapia, cuja atribuição é a modulação da homeostase redox sistêmica (VICTORINO et al., 2014, LEMOS et al., 2015).

Portanto, há uma necessidade de triagem e investimento em terapias antineoplásicas que possuam menos toxicidade e sejam mais eficazes em induzir a destruição celular primária, bem como limitar a disseminação metastática impedindo assim, a progressão para carcinomas invasivos (RAZLOG et al., 2023).

2 O USO DE COMPOSTOS NATURAIS COMO TERAPIA ADJUVANTE NO CÂNCER

A busca por compostos naturais que possuem propriedades anticancerígenas têm sido impulsionada como alternativa terapêutica no tratamento do câncer (YANG et al., 2023, ZHAO et al., 2023).

Terapias adjuvantes baseadas em produtos naturais têm sido utilizadas no câncer cervical. Um exemplo é o resveratrol, que apresenta efeitos

antiangiogênese, antiproliferação, antimetastático e pró-apoptótico comprovado clinicamente (SHAFABAKHSH et al., 2023).

Extratos de polifenóis obtidos de fontes naturais da casca da romã também demonstraram atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antivirais, além de atividade antiproliferativa e antineoplásica em modelos *in vitro* em linhagem celular HeLa de câncer cervical por atuar na regulação do equilíbrio redox celular, induzir parada do ciclo celular e modulação de diferentes vias de sinalização (ativação das caspases 3, 7 e 9, Bax, p53, mRNA) e regulação negativa da expressão da proteína NFκB, com conseqüentes alterações na morfologia do núcleo da célula e morte por apoptose (TENIENTE et al., 2023).

O extrato metanólico dos caules de *Calystegia silvatica* apresentou propriedades antitumorais contra algumas linhagens de câncer cervical (HeLa), próstata (PC3), mama (MCF7), colorretal humano (Caco2) e hepatocelular (HepG2). No entanto, nenhuma parte do extrato vegetal apresentou qualquer citotoxicidade para as células normais (WI38) (YOUSSEF et al., 2023).

Já espécies de *Macleaya microcarpa* (Maxim.) foram estudadas utilizando-se o extrato etanólico (95%) das vagens desse fruto, no qual isolou-se 19 alcalóides que posteriormente foram testadas em células MCF-7 e HeLa, cujo resultado foi apresentar atividade citotóxica sob essas linhagens (SAI et al., 2023).

Recentemente, Vani e colaboradores (2023) realizaram uma análise *in silico* com alguns produtos naturais (Apigenina, Baicaleína, Baicalina, Ponicidina, Oridonina, Lovastatina, Triterpenóide, Narirutina, Ácido Rosmarínico e Xantona) visando triá-los potencialmente contra a proteína E6 do HPV do câncer cervical. Após estar de acordo com a Regra dos Cinco de Lipinski, regra utilizada para avaliar se as características físico-químicas de um determinado composto químico com atividade farmacológica está viável para sua administração via oral e, também ser feita a análise ADME (Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), a Apigenina e a Ponicidina foram consideradas as mais adequadas como potenciais inibidores contra a proteína HPV-16 E6 para prosseguirem com futuros ensaios.

Outra análise fitoquímica com extratos metanólicos de raiz de *Pulsatilla vulgaris*, composta por saponinas triterpenóides, flavonóides e ácido

fenólico, suprimiram fortemente o crescimento e a proliferação de células HeLa, alterando as principais moléculas de sinalização envolvidas na progressão do ciclo celular, com inibição da ativação dos fatores de transcrição (AP-1, NFκB, ETS), oncogenes (MYC, NOTCH), vias de sinalização (Wnt, E2F, STAT3, Smad, Hedgehog), além de induzir mitose no ciclo celular e morte apoptótica (LASKA et al., 2023).

Assim, nota-se que nos últimos anos, o uso de compostos naturais apresenta potencial como uma alternativa viável no tratamento dos cânceres em geral. Por conta disso, neste trabalho investigamos o potencial antitumoral da *trans*-chalcona, um composto natural pouco explorado e cujos mecanismos de ação ainda necessitam de estudos mais aprofundados.

2.1 CHALCONAS: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E POTENCIAL ANTICÂNCER

As chalconas (1,3-difenil-2-propen1-ona) pertencem à um grupo de compostos fenólicos de cadeia aberta α,β -insaturadas, que possuem dois anéis aromáticos ligados por um fragmento propenona de três carbonos, sendo que um anel aromático está diretamente ligado à carbonila (anel A) e o outro ao carbono β da função olefínica (anel B) conforme ilustrado na **Figura 10** (EDDARIR et al., 2003, NOWAKOWSKA, 2006).

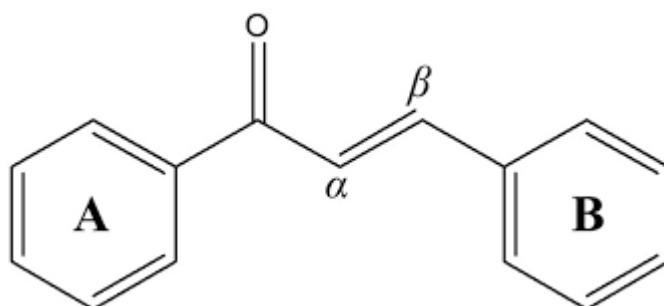


Figura 10: Estrutura geral da Chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) composta por dois anéis aromáticos: carbonila (A) e olefínica (B) (adaptado de Custodio et al., 2018).

São derivados flavonóides e bioflavonóides naturais ou sintetizados em plantas medicinais, sendo relevantes para a pigmentação de algumas flores conferindo cor amarela às pétalas (KUETE et al., 2015, HORTA et al., 2023).

São consideradas uma das principais classes de produtos naturais, abundantemente encontradas em plantas das famílias *Leguminosae*, *Compositae* e *Moraceae*, com ampla distribuição em frutas (ex. cítricos, maçãs), vegetais (ex. tomate, batata), grãos, raízes, vinhos, especiarias e chás (NOWAKOWSKA, 2006, BUKHARI et al., 2012, LIMA et al., 2017).

Essa classe de compostos já foi descrita como antioxidantes (SIMIRGIOTIS et al., 2008, NOORI et al., 2023), anti-inflamatória (ZHUANG et al., 2017), antimalária (KUMAR et al., 2023), antifúngica (OSMANIYE et al., 2023), anti-hiperglicêmica (DAMAZIO et al., 2010), anticancerígenas (BHOJWAN et al., 2023, YANG et al., 2023), citotóxicas (CHENG et al., 2001, VOGEL et al., 2008), anti helmíntica (NERYA et al., 2004), antibacterianas (XU et al., 2019) e antimicrobianas (THEBTI et al., 2023).

As chalconas naturais e sintéticas também apresentaram potente atividade anticancerígena contra diferentes linhagens celulares devido à sua capacidade de se ligar a elementos de resposta no DNA, o qual essa ligação inibe a transcrição de genes que regulam a proliferação celular, também exibe atividade anti-inflamatória, que pode ser devida à inibição de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (DIMMOCK et al., 1999, NI, 2004, BATOVSKA & TODOROVA, 2010, BORTOLOTTI et al., 2017, PINTO et al., 2019, HORTA et al., 2023).

Algumas chalconas são fototransformadas a partir de irradiação de luz em solução metanólica, sendo então isomeradas nas conformações *cis* (isômero Z ou 2) ou *trans* (isômero E ou 1) de acordo com a posição do grupo hidroxila na molécula, sendo intermediários comuns, considerados precursores encontrados em plantas de uso medicinal (**Figura 11**) (IWATA, 1997, NI et al., 2004, NOWAKOWSKA, 2007). O isômero E (*trans*-) é considerado termodinamicamente mais estável, com sua estrutura predominante entre as chalconas e, portanto, encontradas em maior concentração nas plantas (AKSÖZ & ERTAN, 2011, 2012, WALYELDEEN et al., 2023).

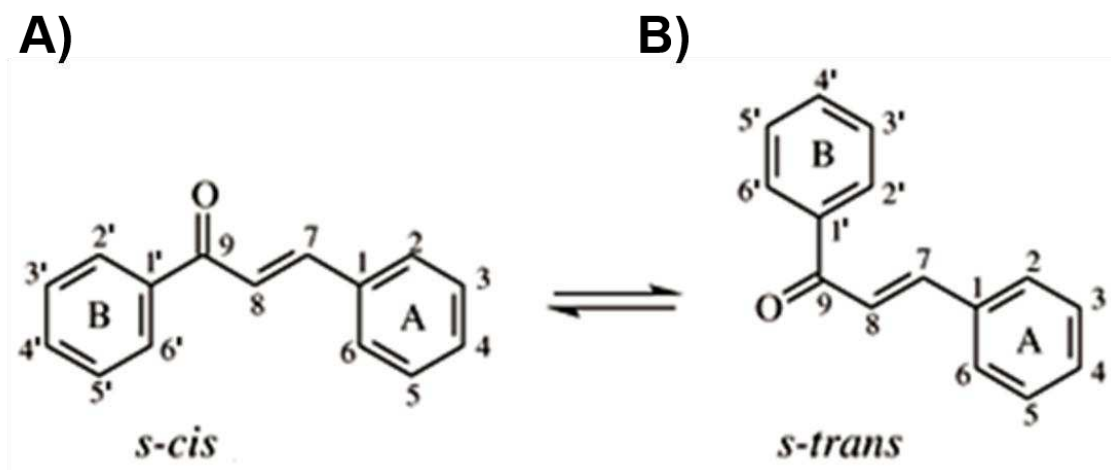


Figura 11: Conformações *trans* (A) e *cis* (B) da Chalcona (adaptado de Cesarin-Sobrinho et al., 2001).

Nos últimos anos as chalconas vêm sendo sintetizadas com o intuito de desenvolver fármacos contra uma diversidade de doenças como leishmaniose, malária, fungos, bacterianas, virais, degenerativas, infecciosas e diversos tipos de câncer (EDDARIR, 2003; JAYASINGHE et al., 2004, HEIDARI et al., 2009, VANANGAMUDI et al., 2018, FERREIRA et al., 2018, MIRANDA-SAPLA et al., 2019). Derivados de chalcona, testados na linhagem MDA-MB-231 de câncer de mama, apresentaram efeitos citotóxicos confirmados, além de induzir a morte celular por apoptose, decorrentes da ativação de vias apoptóticas e ação antiproliferativa (BORTOLOTTO et al., 2017, PADAULENG et al., 2023).

Foi comprovado que esse composto também inibe a cascata de sinalização JAK/ STAT reduzindo a fosforilação de STAT e inibe a via Wnt, importante na carcinogênese, conseqüentemente diminui o crescimento e proliferação de neoplasias malignas (MAHAPATRA et al., 2015).

Em estudo realizado com derivados de chalcona (1–18) revelou atividade antiproliferativa associado a um efeito antimitótico contra as linhagens celulares melanoma (A375-C5), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e câncer de pulmão de células não pequenas (NCI-H460) (PINTO et al., 2019, HORTA et al., 2023). Nesse caso, todas as chalconas foram capazes de afetar a viabilidade metabólica de linhagens de células tumorais, derivadas de tumores líquidos e sólidos (Jurkat, LNCaP, PC-3 e HeLa).

Em linhagens celulares de câncer de bexiga humano (T24 e HT-1376), a chalcona inibiu a proliferação delas, induzindo a apoptose e bloqueando a

progressão do ciclo celular na fase G2/M (SHEN et al., 2007). Já em células DU145 e PC3 de câncer de próstata suprimiu a proliferação e sua migração além de ocasionar danos ao DNA celulares (XIAO et al., 2023).

Os efeitos anti-inflamatórios das chalconas e seus derivados, de acordo com Nowakowska (2006) incluem a redução dos níveis de TNF- α , NO, IFN- γ , prostaglandinas e IL-6. Segundo estudos, este efeito se deve ao fato da inativação de NF κ B, que regula mais de 400 genes envolvidos na inflamação, sobrevivência e proliferação celular, invasão, angiogênese e metástases (YADAV, 2011, NOURBAKHSI et al., 2023).

Ela foi capaz também de inibir a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), a expressão de TNF- α , a produção de IL-6 além da translocação do NF- κ B para o núcleo celular da colite induzida com ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos (PARK et al., 2012).

Já em quatro linhas celulares de câncer humano, incluindo Hela, A549, HepG2 e HL-60, mostrou ter atividade antitumoral via produção de EROs com consequente indução de apoptose. Em específico na linhagem HeLa, melhorou o fluxo de autofagia sem depender da via de sinalização mTOR (WALYELDEEN et al., 2023).

Gunasekaran e colaboradores (2023) avaliaram derivados de chalconas de acrilamida quanto a atividade para inibição da multiplicação celular contra duas linhagens de células cancerígenas MCF-7 e HeLa, e seus resultados *in vitro* mostraram ação antiproliferativa sob as mesmas.

Portanto, este composto e seus derivados são considerados promissores para a concepção de novos fármacos contra células cancerígenas devido à aplicação terapêutica para muitos tipos de câncer, em especial no carcinoma cervical.

2.2 TRANS-CHALCONAS

A *trans*-Chalcona (TC) é um produto biossintético que possui dois anéis aromáticos unidos por um ligante de três carbonos e, a partir da estrutura do núcleo são obtidos vários derivados conforme ilustrados na **Figura 12** (1,3-diphenyl-2-propen-1-one), também denominado de núcleo bifenólico dos precursores flavonóides, o qual pode ser sintetizado pela combinação de

benzaldeído e acetofenona (KARKHANEH, 2016, OMIDI-SHAHSAVANDI et al., 2023).

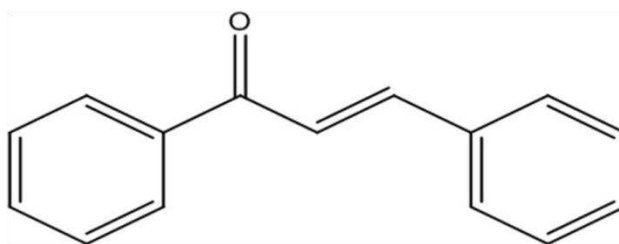


Figura 12: Estrutura da *trans*-Chalcona (1,3-diphenyl-2-propen-1-one) (autor).

Um estudo *in silico* realizado por Miranda-Sapla et al. (2019) mostrou que a TC está de acordo com a Regra dos Cinco de Lipinski (Ro5) (LIPINSKI et al., 1997), pois apresentou parâmetros seguros e biodisponíveis por via oral, devido a semelhança com medicamentos seguida pela regra adicional proposta por Veber et al., (2002). Em relação às propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) também se mostrou favorável a elas, inferindo boa chance para ser desenvolvida como uma candidata a medicamento (LIPINSKI, 2004).

2.3 MECANISMOS ANTITUMORAIS DA TC

TC administrada por via oral apresentou influência positiva na fibrose hepática induzida por dieta hiperlipídica (HFD), por ocasionar efeitos hepatoprotetores, como ação antioxidante, anti-obesidade e aumento dos níveis de adiponectina, hormônio proteico responsável pela regulação de glicose e catabolismo de ácidos graxos no fígado (KARIME-SALES et al., 2017).

Segundo estudos realizados por Shen et al. (2007), a TC também inibiu a proliferação de cultura de células cancerígenas humanas por bloquear a ativação do NFκB, ocasionando então aumento da degradação da proteína inibitória de kappa B (I-κB) pelo fator IKK no citoplasma. No entanto, resultados contrários, com concentrações aumentadas desses fatores no núcleo e no citoplasma de células infectadas pelas proteínas E6 e E7 do HPV já foi descrita em neoplasia invasora do colo uterino (JAMES et al., 2006).

Na linhagem tumoral HepG2 de carcinoma hepatocelular (CHC), a TC melhorou a sobrevivência celular ao diminuir a peroxidação lipídica e promoveu retardo do consumo de antioxidantes celulares no estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (SIKANDER et al., 2011).

Em outra linhagem de CHC, células tumorais HuH7.5, a TC reduziu a viabilidade dessa linhagem, causando alterações mitocondriais, atuando de maneira citostática com concomitante parada no ciclo celular nas fases G0/G1 via aumento da expressão p-p53 e diminuição de β -catenina (SIQUEIRA et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação antitumoral *trans*-chalcona (TC) em modelos *in vitro* de carcinoma cervical utilizando as linhagens tumorais HeLa e SiHa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se o tratamento *in vitro* com *trans*-chalcona inibe a proliferação e sobrevivência das linhagens tumorais HeLa e SiHa;
- Verificar se o tratamento com TC provoca alterações morfológicas e ultraestruturais;
- Analisar se a TC inibe o potencial migratório de ambas as linhagens celulares;
- Mensurar se a TC altera os níveis de estresse oxidativo das células tratadas, através da medida da produção de hidroperóxidos e metabólitos do óxido nítrico;
- Avaliar se a TC promove despolarização mitocondrial, induz formação de gotículas lipídicas e vacúolos autofágicos nas células HeLa e SiHa;
- Analisar o perfil de expressão dos fatores de transcrição NFκB e NRF2 nas células tratadas com TC envolvidos no carcinoma cervical.

4 RESULTADOS

4.1 *TRANS-CHALCONE* INDUCES ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY IN HELA AND SIHA CERVICAL CARCINOMA CELL LINES THROUGH CELLULAR STRESS AND AUTOPHAGY

Elaine da Silva Siqueira¹, Virgínia Márcia Concato¹, Luan Vitor Alves de Lima², Ellen Mayara Souza Cruz¹, Fabrício Seidy Ribeiro Inoue¹, Mariana Barbosa Detoni¹, Ana Carolina Jacob Rodrigues^{1,3}, Amanda Cristina Machado Carloto¹, Bruna Taciane da Silva Bortoletti¹, Taylon Felipe Silva¹, Maria Beatriz Madureira¹, Fernanda Tomiotto-Pellissier⁶, Vanessa Jacob Victorino⁷, Karen Brajão de Oliveira⁸, Marla Karine Amarante⁹, Danielle Larazin Bidóia^{1,4}, Mário Sérgio Mantovani², Wander Rogério Pavanelli¹, Ivete Conchon-Costa¹, Carolina Panis⁵.

¹Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

²Departament of General Biology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

³Graduate Program in Biosciences and Biotechnology, Carlos Chagas Institute (ICC), Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brazil.

⁴Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Paraná, Brazil.

⁵Laboratory of Tumor Biology, State University of West Paraná, Unioeste, Francisco Beltrão, Brazil.

⁶ Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

⁷Department of Biology, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro, Brazil.

⁸Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

⁹Oncology Laboratory, Department of Health Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

***Corresponding author:** Elaine da Silva Siqueira

(elaine_siqueira15@hotmail.com and Carolina Panis

(carolina.panis@unioeste.br and carolpanis@hotmail.com).

Department of Pathology Science, Laboratory of Immunopathology of

Neglected Diseases and Cancer, State University of Londrina – UEL. Rodovia

Celso Garcia Cid Campus Zip Code 86057-970, Post Box 10.011. Londrina, PR.

Phone: +0554333714539.

E-mail: elaine_siqueira15@hotmail.com

Highlights

TC reduces viability of HeLa and SiHa tumor cells;

TC induces mitochondrial depolarization, formation of lipid bodies and autophagic vacuoles;

TC causes morphological and structural changes in cell lines;

TC inhibits the migratory potential of both cell lines.

Abstract

Background: In this study, the antitumor action of trans-chalcone (TC) on HeLa and SiHa cell lines of cervical carcinoma was investigated.

Methods: Tumor cells of HeLa and SiHa strains were treated with TC at increasing concentrations and the 50% cell inhibitory concentration (IC₅₀) was determined within 24 hours. Thereafter, assays were performed to determine the morphological and ultrastructural changes by scanning and transmission microscopy respectively, cell viability by MTT and trypan blue, as well as the possible death mechanisms involved.

Results: We observed that TC treatment was able to promote reduced cell viability of HeLa and SiHa cervical carcinoma cell lines, induce morphological and ultrastructural changes of these cells with inhibition of tissue migration ability. Subsequently, we found that TC treatment was able to induce lipid droplet formation and autophagic vacuoles with consequent cell death by late apoptosis.

Conclusion: TC treatment was able to reduce the viability of HeLa and SiHa cells, showed cytostatic activity with reduction of the same, showed a metabolic stress profile due to the formation of lipid droplets and autophagic vacuoles, with consequent apoptotic cell death confirmed by MET and SEM images.

Keywords: Uterine Cervix; Squamous Cell Carcinoma; Adenocarcinoma; Flavonoids; Metabolic Stress; Cell Death.

Abbreviations: SCC: squamous cell carcinoma; ADC: adenocarcinoma; HPV: human papillomavirus; TC: *trans*-chalcone; CIS: cisplatin; DMSO: dimethylsulfoxide; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; FBS: fetal bovine serum; PBS: Phosphate-buffered saline; MTT: dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; IC₅₀: 50% inhibitory concentration; MDC: monodansylcadaverine; SEM: scanning electron microscopy; TEM: transmission electron microscopy; LD: lipid droplets.

1. Introduction

Cervical cancer is the fourth most prevalent type of cancer among women worldwide, with an estimated 604,127 new cases and 341,831 deaths in 2020, with more than 90% of new cases and deaths occurring in countries low- and middle-income groups (WHO, 2020). According to the International Agency for Research on Cancer (IARC) (2022), the worldwide incidence was 7.7% cases, in Brazil it represented 8.7% of occurrences.

The most important etiological agent that lead to the development of cervical cancer is the human papillomavirus (HPV), responsible for 99% of all cases, with the hrHPV-16 and hrHPV-18 genotypes being the most prevalent (Siddig et al., 2023; Brankovic et al., 2013). Among the cases, 70% correspond to squamous cell carcinoma (SqCa), located in the exocervix, followed by 25% of occurrence of adenocarcinoma (AdCa), located in the endocervix, derived from secretory/glandular epithelial cells (Cohen et al., 2019; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023).

According to treatment guidelines, recently updated by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN, 2023), pharmacological treatments for cervical cancer include paclitaxel, topotecan, doxorubicin and platinum-based drugs such as cisplatin and carboplatin (Kitagawa et al., 2015; Siegel et al., 2020; Markandeywar et al., 2023; Duenas-Gonzalez, 2023). In addition, immunotherapies with pharmaceuticals (antibody-drug conjugates, antigen-capturing nanoparticles, immune checkpoint inhibitors, monoclonal antibodies),

cell-based immune therapies, immunogenic therapy (vaccines), combination therapies (combination of programmed cell death protein 1 (PD-1)/programmed cell death protein 1 (PD-L1) ligand drugs or with other therapies), pelvic radiotherapy, chemotherapy (concurrent or adjuvant), brachytherapy, chemoradiotherapy, and surgical intervention outlined preservation or not of fertility (Rizvi et al., 2018; Jain, 2021; Löhmußaar et al., 2021; Patel et al., 2023; Xing et al., 2023).

Despite advances in treatments available to prevent the progression of this neoplasm, there are still many problems related to tumor resistance, metastasis, excessive radioresistance, chemoresistance, metastasis, high recurrence rates, in addition to the various long-term adverse effects, such as hematological toxicity, gastrointestinal and genitourinary tract, local recurrence or secondary dissemination (30-40% of patients), micrometastases, 5-year overall survival (68%) and progression-free survival (66%) (Vale et al., 2010; Randall & Ghebre, 2016; Duru Birgi et al., 2018; Löhmußaar et al., 2021; Ma et al., 2023; Mundt et al., 2003; Wang et al., 2023). Therefore, there is a need for screening and investment in antineoplastic therapies that have less toxicity and are more effective in inducing primary cell destruction, as well as limiting metastatic spread, thus preventing progression to invasive carcinomas (Razlog et al., 2023).

Chalcones (1,3-diaryl-2-propen-1-ones), one of the main classes of natural products, are derived from flavonoids and bioflavonoids synthesized in plants (Nowakowska, 2006; Bukhari et al., 2012). It has already been described as antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, antiprotozoal, anti-inflammatory and antitumor (Dimmock et al., 1999; Ni et al., 2004; Batovska & Todorova, 2010; Bortolotto et al., 2017). This class is phototransformed from photochemical reactions, either by irradiation of light in methanolic solution into a *cis* or *trans* conformation according to the position of the hydroxyl group in the molecule and also by photomechanical effects of molecular crystals caused at molecular dihedral angles in the α,β -insaturated ketones of the chalcone structure (Iwata et al., 1997; Yue et al., 2023). However, *trans* is considered thermodynamically more stable than *cis*, found in higher concentrations in plants, but it can also be synthesized in the laboratory by combining benzaldehyde and acetophenone (Aksöz & Ertan, 2011; Sahu et al., 2012; Karkhaneh et al., 2016).

Trans-chalcone (TC) is a common flavonoid precursor, a natural product obtained from chalcone, as illustrated in **Figure 1** (1,3-diphenyl-2-propen-1-one), and can also be synthesized chemically or biologically (Iwata et al., 1997; Aksöz & Ertan, 2011; Karkhaneh et al., 2016). An *in silico* study conducted by Miranda-Sapla et al. (2019) showed that TC is in accordance with Lipinski's rule of five (Ro5) (Lipinski et al., 1997), as it showed safe and bioavailable parameters by oral route due to drug similarity and also proved favorable for most ADMET properties (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) (Lipinski, 2004).

Thus, studies show its various biological effects as antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative in different lineages, such as bladder cancer (T24 and HT-1376), liver carcinoma (HepG2), endometrial carcinoma (Ishikawa strain), breast cancer (MCF-7 and MDA-MD-231), osteosarcoma (U2OS and SJSA-1), colon carcinoma (HCT-116), epithelial carcinoma (FaDu) and fibroblast (3T3) (Shen et al., 2007; Bortolotto et al., 2017; Mateeva et al., 2017; Silva et al., 2018, 2016). Recently, a study showed that TC reduced the viability of HuH7.5 hepatocellular carcinoma tumor cells by causing mitochondrial alterations, thus reducing viability. In addition, the compound acted in a cytostatic manner leading to cell cycle arrest in G0/G1 phases via increased expression of p53 and decreased β -catenin (Siqueira et al., 2020).

However, as there are still no studies described in the literature using this flavonoid *in vitro* on cervical epithelium or cancers derived from it, we investigated the possible effects of TC on HeLa and SiHa cell lines of cervical carcinoma, as well as its related mechanisms.

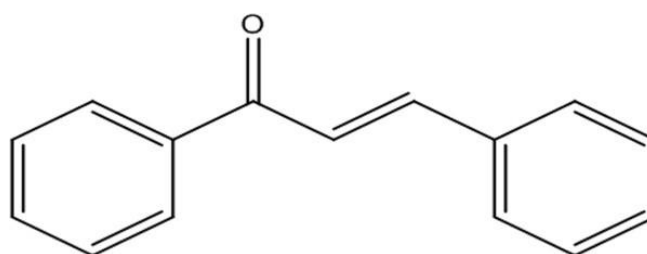


Figure 1: Chemical structure of *trans*-chalcone (TC)

2. Materials and methods

2.1 *Trans*-chalcone

Commercial *trans*-chalcone (TC), with a purity of 97%, was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz Biotechnologies, CA- Catalog Number sc-204681 - Dallas, TX, USA). The TC stock solution was dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (GIBCO, Invitrogen, New York, USA). The concentration of DMSO did not exceed 0.01% in all experiments.

2.2 Culture of tumor cells

Established cervical carcinoma cell lines, HeLa and SiHa, were cultured in RPMI (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) and DMEM (Lifetechnologies) medium, respectively. Both supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB, GIBCO, Invitrogen, New York, USA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Santa Cruz Biotechnologies) and maintained in an incubator at 37°C, 5% CO₂ (Sanyo, Japan). Since there have been no studies using this compound as a treatment for cervical carcinoma, we investigated the mechanisms of action on these tumor cells.

2.3 Evaluation of cell viability by MTT assay

HeLa and SiHa cells (10⁴/96 well) were plated and treated with TC at various concentrations (1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µM). The viability evaluation took place after 24, 48 and 72 h of treatment through the metabolization of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), as previously described (Siqueira et al., 2020). Thus, after the treatment time, the culture medium was removed, and 100 µL of MTT solution (0.33 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added. After 3 hours of incubation, 100 µl of DMSO (Sigma-Aldrich) was added for dilution of formazan crystals. The controls would consist of: negative control (culture medium), positive control (50 µM Cisplatin) and vehicle (0.01% DMSO). Quantification of MTT metabolism was performed by means of spectrophotometric reading (Thermo Scientific Multiskan, GO) at 540 nm. To evaluate the inhibitory concentration for 50% of the cells (IC₅₀) treated with TC, logarithmic regression

was performed. Thus, IC₅₀ values of 28 µM for HeLa and 23 µM for SiHa were determined within 24 h, used in the following experiments.

2.4 Viability assessment by trypan blue exclusion

HeLa and SiHa cells (10⁴/96 well) were treated with their respective IC₅₀ (28 µM (HeLa) and 23 µM (SiHa)). Photomicrographs were taken using the EVOS Microscope FL Auto Cell microscope (Thermo-Fisher Scientific, Multiskan GO, Waltham, MA, USA) at 400× magnification. Then, the cell suspension was diluted in a 0.4% trypan blue solution in a 1:1 ratio. The total number of viable and dead cells were counted by light microscopy (Olympus BX41, Olympus Optical Co, Ltd., Tokyo, Japan) with the aid of a Neubauer chamber.

2.5 Determination of autophagic vacuoles

For quantification of autophagic vacuoles, cells treated with TC-IC₅₀ 28 µM (HeLa) and 23 µM (SiHa) (10⁴ cells/96 well) were stained with monodansylcadaverine (MDC) (50 µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as described by Siqueira et al. (2020). Analysis was performed on a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland) using excitation wavelengths of 380 nm and emission of 525 nm.

2.6 Detection of lipid bodies

To evaluate the formation of cytoplasmic lipid bodies, HeLa and SiHa cells (10⁴ cells/96 well) were treated with TC-IC₅₀ 28 µM (HeLa) and 23 µM (SiHa) for 24 h. Then, they were labeled with Villus Red (10 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min and analyzed in a Perkin-Elmer Victor X3 fluorimeter using wavelengths of 530 nm (excitation) and 635 nm (emission), as described by Concato et al. (2020).

2.7 Cellular scratch test

To evaluate cell migration, HeLa and SiHa cells (10⁶/6 well) were kept in an incubator until they reached confluence. Subsequently, a “scratch” was made in the monolayer with a delicate passage of a 10 µL pipette tip over the bottom of each well, which predisposed a discontinuity in the monolayer, whose

cells at its margin tend to migrate to empty spaces. Then, the cells were treated with concentrations of TC-IC₅₀ 28 µM (HeLa) and 23 µM (SiHa) and photomicrographs (40x objective) taken by the EVOS microscope (Life Technologies) at times 0 and 24 h. Migration was evaluated as free area (region with no cells) and this was measured using the Image-Pro Plus program, and the percentage decrease in area characterized the cell migration index.

2.8 Assessment of morphological changes by scanning electron microscopy (SEM)

For analysis of morphological alterations by SEM, cells (5×10^5 cells/6 well) were treated with TC-IC₅₀ 28 µM (HeLa) and 23 µM (SiHa) for 24 h. Subsequently, the cells were washed in PBS and fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 0.1 M sodium cacodylate buffer for 24 h. Then, the cells were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer and dehydrated in increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90, 95 and 100%). The cells were then subjected to the critical point by replacing ethanol with CO₂, metallized with gold and visualized in a double-beam scanning electron microscope (FEI Scios, Oregon, USA).

2.9 Evaluation of ultrastructural changes by transmission electron microscopy (TEM)

For analysis of ultrastructural changes by TEM, cells (5×10^5 cells/6 well) were treated with TC-IC₅₀ 28 µM (HeLa) and 23 µM (SiHa) for 24 h. Then, the cells were washed in PBS and fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 0.1 M sodium cacodylate buffer for 24 h. Afterwards, the cells were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferrocyanide at room temperature, washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer, dehydrated in increasing concentrations of acetone (30, 50, 70, 90, 95 and 100%), embedded in Epon resin and polymerized in an oven at 60 °C for 72 h. Ultrathin cuts were made in an ultramicrotome (PowerTomer BMC – Germany), and then inserted in a copper grid, counterstained with uranyl acetate for 20 min, and lead citrate for 10 min, and visualized in a transmission electron microscope JEOL JEM 1400 (Tokyo, Japan).

2.10 Cell death assay

HeLa and SiHa cells (10^6 cells/6 well) were treated with TC-IC₅₀ 28 μ M (HeLa) and 23 μ M (SiHa) for 24 h, and analysis was performed by Annexin V staining and cell death kit. For each sample, 2,500 events were acquired and analyzed in a flow cytometer (Muse Cell Analyzer, Merck Milipore, Billerica , MA, USA) as described by Concato et al. (2020).

3. Results

3.1 TC reduced the viability of HeLa and SiHa cells

We observed in the MTT assay that the cell viability of the HeLa and SiHa lineage in the groups treated with TC decreased significantly ($p < 0.0001$) at all times tested, when compared to the control and vehicle ($p < 0.0001$). Furthermore, it was observed that after 24 h of treatment, doses of 25, 50 and 100 μ M of TC were more effective on tumor cells than the positive control (CIS) ($p < 0.0001$) and and vehicle ($p < 0.0001$), with reductions of 51.95, 44.49 and 40.52% in the HeLa (**Fig. 2A**) and in the SiHa cell there was a reduction of 40.39, 40.82 and 26.01%, respectively (**Fig. 2D**).

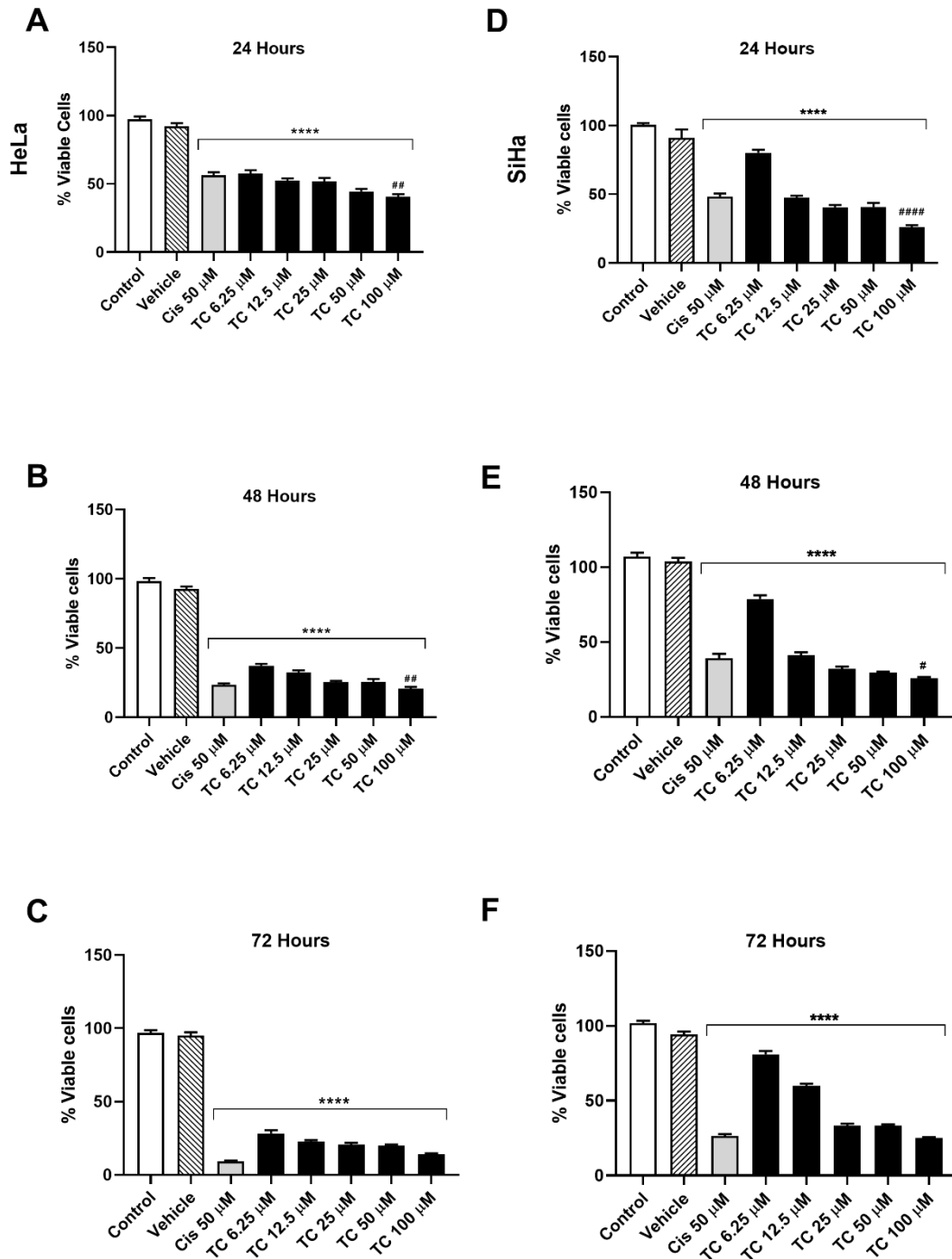


Figure 2: Effect of different TC concentrations on the viability of HeLa and SiHa cell lines.

HeLa and SiHa cells were treated with TC for 24, 48 and 72h at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ M for 24 (A, D), 48 (B, E) and 72h (C, F). The relative survival rate of HeLa and SiHa cells were detected by the MTT assay. Control (culture medium), Vehicle (DMSO 0.01%) and Positive Control (Cisplatin 50 μ M). Values represent the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments performed in triplicate. The One-way ANOVA statistical method was used followed by the Tukey Test.**** Significant difference in relation to the control

($p \leq 0.0001$). ## Significant difference compared to the positive control ($p \leq 0.01$) and ##### ($p \leq 0.0001$).

From the viability assay, the TC inhibitory concentrations for 50% of the cells (IC_{50}) of each time analyzed in both cell lines were calculated. The results obtained for HeLa were 27.95 μM (± 0.06) at 24 hours, 1.15 μM (± 0.07) and 0.52 μM (± 0.10) at 48 and 72 hours (data not show) and for SiHa were 23.00 (± 0.03) at 24 hours, 17.32 (± 0.06) and 17.12 (± 0.04) at 72 hours (data not show). Thus, as the values obtained at 48 and 72 hours affected more than 50% of cell viability, we proceeded with the other experiments with the IC_{50} (28 $\mu\text{M} \pm 0.06$) for HeLa and (23 $\mu\text{M} \pm 0.03$) for SiHa at time of 24 h, period in which TC showed effective antiproliferative activity by eliminating tumor cells, without causing aggressive damage to these cells (**Table 1**).

IC_{50} (\pm SEM)	
Cell Type	24h
HeLa	27.95 μM (± 0.06)
SiHa	23 μM (± 0.03)

Table 1: Evaluation of inhibitory concentration for 50% of cells treated with *trans*-chalcone (TC- IC_{50}) at 24 h for HeLa and SiHa tumor lines.

In the next experiments the 24 h IC_{50} values were used. Additionally, after 24 h of treatment of HeLa and SiHa cells, the total number of viable cells was counted by the trypan blue exclusion method. We found that treatment with IC_{50} of TC in both lineages significantly reduced the number of viable cells when compared to control ($p \leq 0.0001$), with 51.72% in HeLa and 34.83% in SiHa (**Fig. 3A, B**).

Corroborating with these data, representative images demonstrated that growth was altered in both cell lines after treatment with TC- IC_{50} at 24 h, as well as visible morphological changes, such as phenotypic mischaracterization, with increased cell spacing and elongation, compared to the control group (**Fig. 3C**).

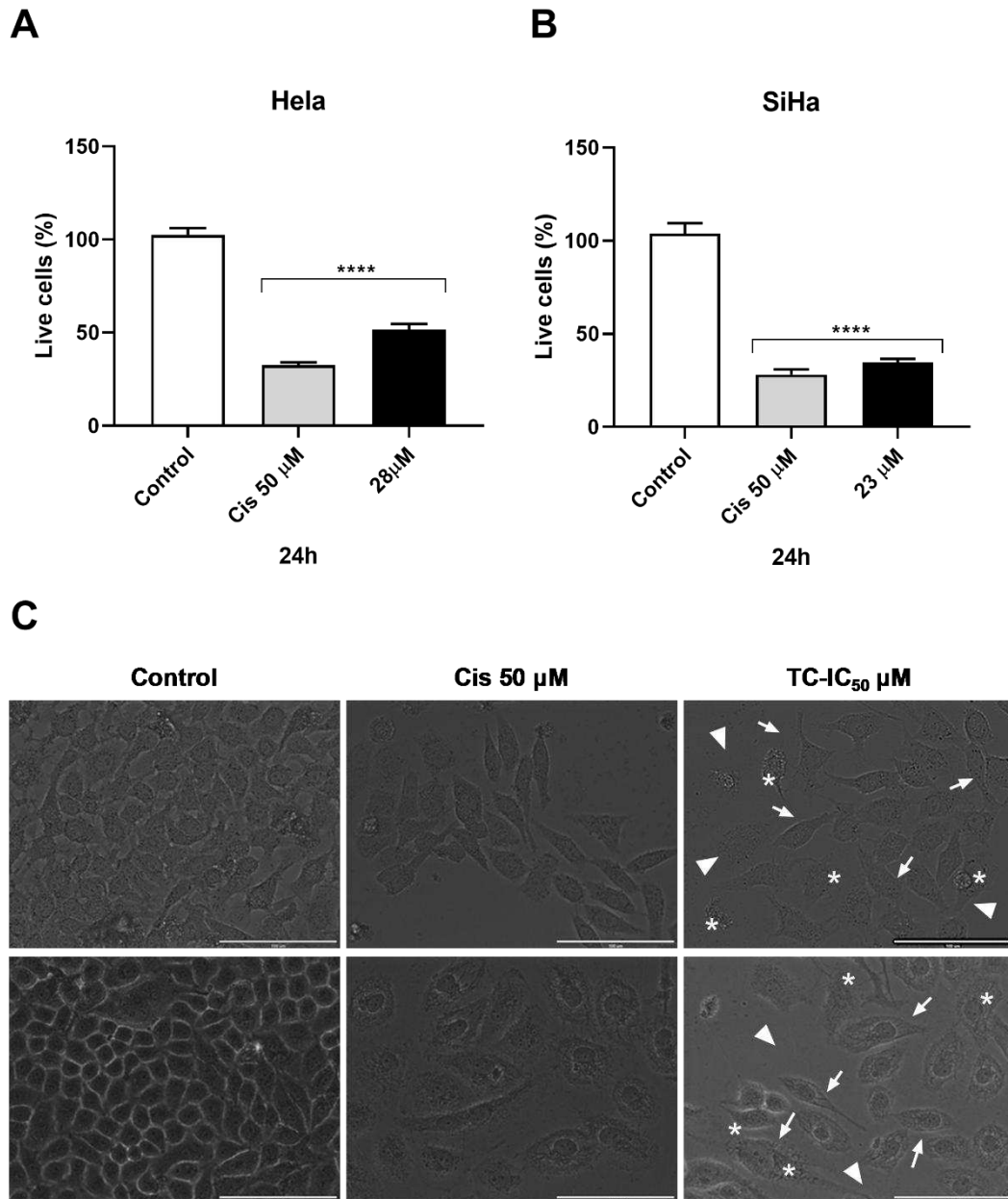


Figure 3: Effect of TC-IC₅₀ on viability and morphology of HeLa and SiHa cell lines. HeLa and SiHa were treated with their respective TC-IC₅₀. The number of viable cells was determined by the Trypan Blue exclusion method after 24 h of treatment in HeLa (A) and SiHa (B). The morphology evaluation was observed by light microscopy, representative images were captured (400x) (C). Control (culture medium) and Positive control (Cisplatin 50 μM). Values were expressed as mean \pm standard error of mean. **** $p \leq 0.0001$ vs. control. Phenotypic descharacterization (*); Increased spacing (▶), Cell elongation (→).

3.2 TC induced morphological and ultrastructural changes in HeLa and SiHa

In order to evaluate morphological changes, cells treated with TC-IC₅₀ were analyzed by SEM. Thus, both cells from the control group HeLa (**Fig. 4Ae D**) and SiHa (**Fig. 4G and J**) presented adhered to the substrate, with the presence of membrane projections (lamellipodia and filopodia). In addition, the cell membrane was intact and had projections, the so-called microvilli, all over the cell surface. However, HeLa (**Fig. 4B, C, E and F**) and SiHa (**Fig. 4H, I, K and L**) cells treated with TC-IC₅₀ for 24 h exhibited severe morphological changes characterized by size reduction and breakage of lamellipodia and filopodia, cell membrane shrinkage, irregular surface, reduced microvilli, damage and membrane rupture. These data show that the treatment besides inhibiting cell proliferation is efficient in causing morphological alterations in the cells and consequent reduction of cell movement capacity.

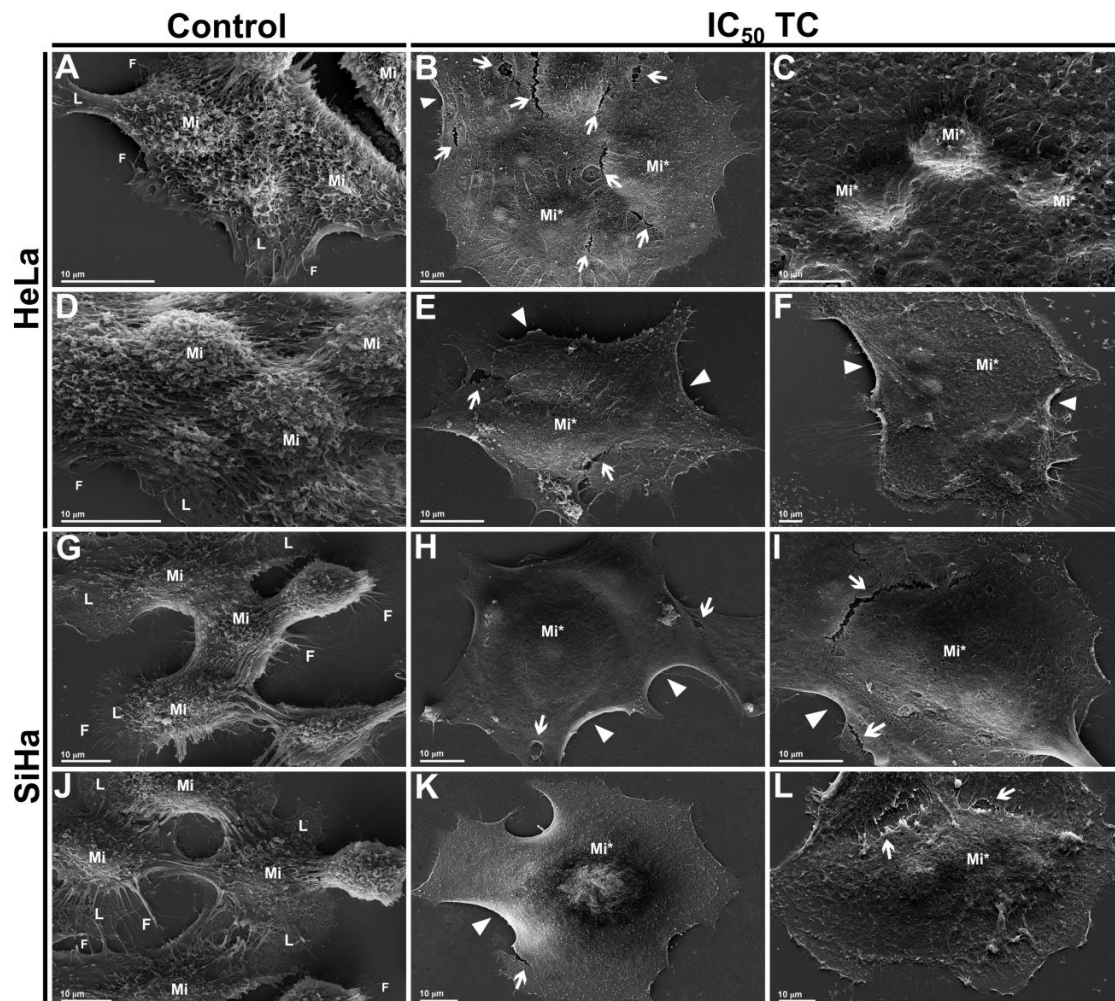


Figure 4: Morphological changes in HeLa and SiHa cells treated with TC IC₅₀ for 24 h. HeLa and SiHa cells incubated with TC (IC₅₀) for 24 h were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). HeLa cells incubated with culture medium (control) (A, D) and treated with TC IC₅₀ (B, C, E and F). SiHa cells incubated with culture medium (control) (G, J) and treated with IC50 of TC (H, I, K and L). Filipodia (F); Lamellipodia (L); Microvilli (Mi); Microvilli reduction (Mi*); Cell membrane retraction (▶); Cell membrane damage and rupture (→). Scale bars: 10 µm.

Ultrastructural changes were evaluated by transmission electron microscopy after treatment with TC-IC₅₀ HeLa and SiHa cells. Comparative analyses of untreated and TC-treated tumor cells are depicted in **FIG. 5**. HeLa (**Fig. 5A and D**) and SiHa (**Fig. 5G and J**) cell lines of the control group show well-preserved cell structures, such as mitochondria, nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi complex, plasma membrane, and presence of microvilli. However, HeLa (**Fig. 5B, C, E and F**) and SiHa (**Fig. 5H, I, K and L**) cells treated with TC-IC₅₀ for 24 h showed ultrastructural changes characterized by

increased accumulation of lipid bodies and autophagic vacuoles, mitochondrial changes, reduction of microvilli, damage and rupture of the cell membrane.

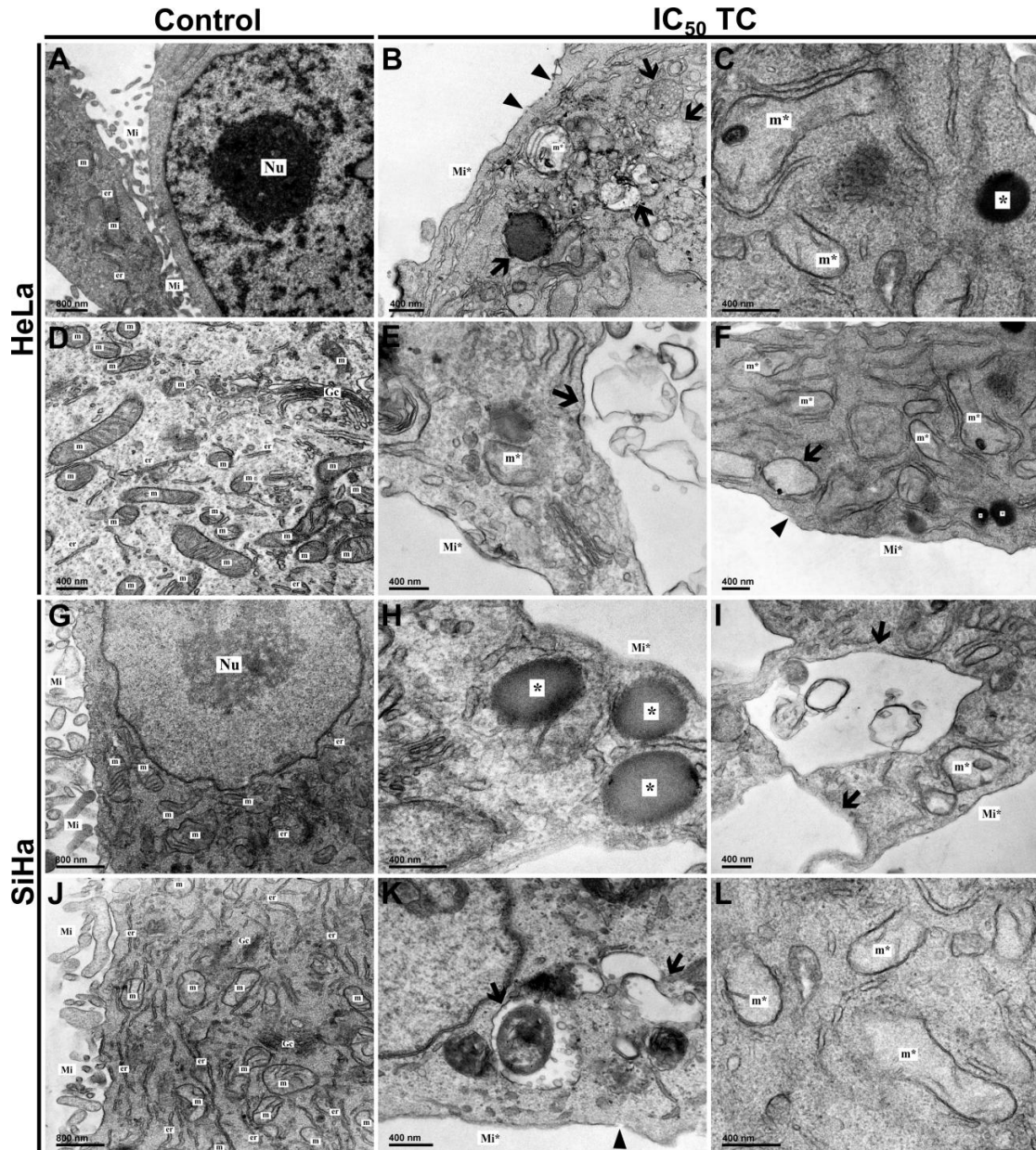


Figure 5. Ultrastructural changes in HeLa and SiHa treated with TC-IC₅₀ for 24 h. (A,D) Untreated HeLa cells (control); (B,C,E,F) HeLa cells treated with TC-IC₅₀. (G,J) Untreated SiHa cells (control); (H,I,K,L) SiHa cells treated with TC-IC₅₀. Golgi complex (Gc); Microvilli (Mi); Mitochondria (m); Nucleus (Nu); Endoplasmic reticulum (er); Mitochondrial change (m*); Microvilli reduction (Mi*); Cell membrane damage and rupture (▶); Autophagic vacuoles (→); Lipid bodies (*). Scale bars: 800 nm (A,G,J) 400 nm (B-F,H,I,K,L).

3.3 TC treatment reduced the migratory capacity of HeLa and SiHa cells

The capacity for migration and tissue invasion was performed through the wound closure assay, in order to investigate the in vitro migratory potential of HeLa and SiHa cells treated with TC-IC₅₀ and monitored at time intervals 0 and 24 hours (**FIG. 6**). Quantitative analysis revealed that the control group of both lineages migrated to the wound site covering 100% closure within 24 hours. The group that received the treatment regressed in this process, confirming the reduced capacity for migration, characteristic of these tumor cells. Regarding the quantification of the distance, we observed that the treatment further expanded this space when compared to the control HeLa e SiHa (100%) (**Fig. 6A,C**).

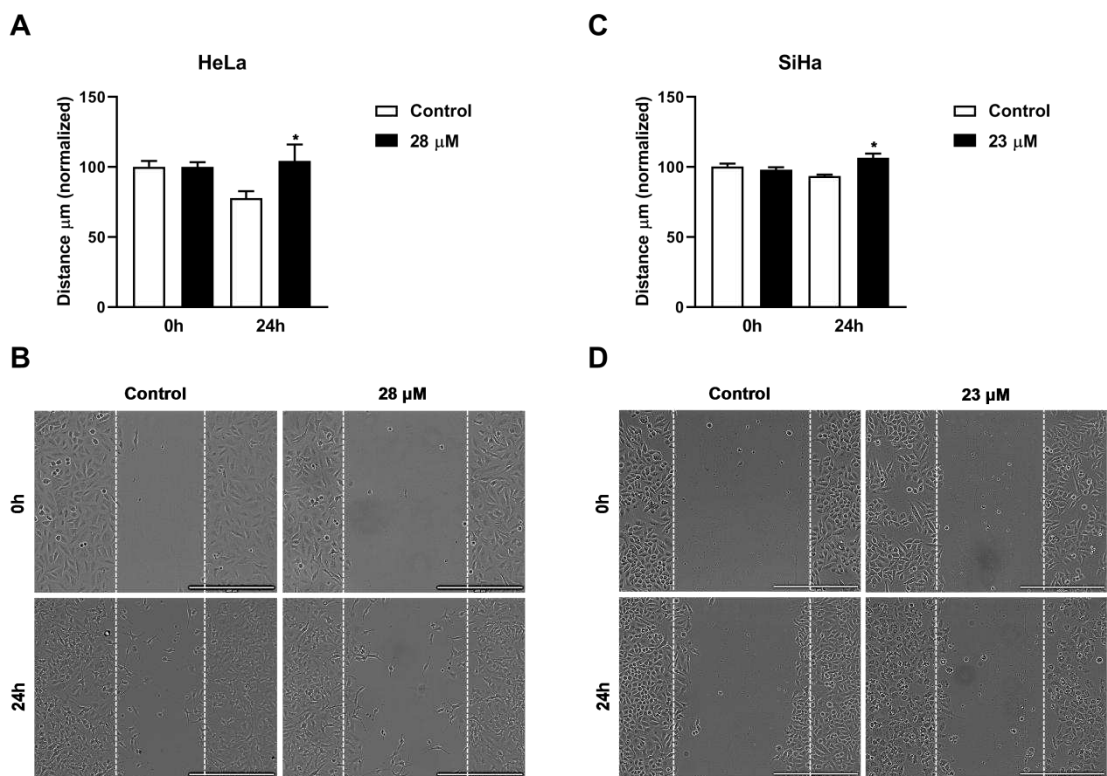


Figure 6: Cell migration with scratch wound healing assay in HeLa and SiHa cell lines treated with TC-IC₅₀ for 24 h. Analysis of the scratch distance done between 0 and 24 hours after treatment with TC-IC₅₀ (6A,C). Observation of the calculated trace width using the ImageJ microscope application (6B,D). Data are presented as mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$ vs. control.

3.4 TC induced the formation of lipid droplets and autophagic vacuoles in HeLa and SiHa cells

In order to elucidate the mechanism involved in the elimination of HeLa and SiHa cells treated with TC-IC₅₀, we evaluated whether the treatment causes metabolic alteration. We found that TC increased the fluorescence intensity of Nile Red by 54% in HeLa and 73.20% in SiHa, indicating cytoplasmic lipid droplet (LD) formation in both strains ($p \leq 0.0001$) (**Fig. 7A,B**). Also, the treatment was able to increase the intensity of MDC fluorescence, 73% in HeLa and 54.50% in SiHa, indicating cellular stress with consequent formation of autophagic vacuoles and possible metabolic damage in HeLa and SiHa cells ($p \leq 0.0001$) (**Fig. 7C,D**).

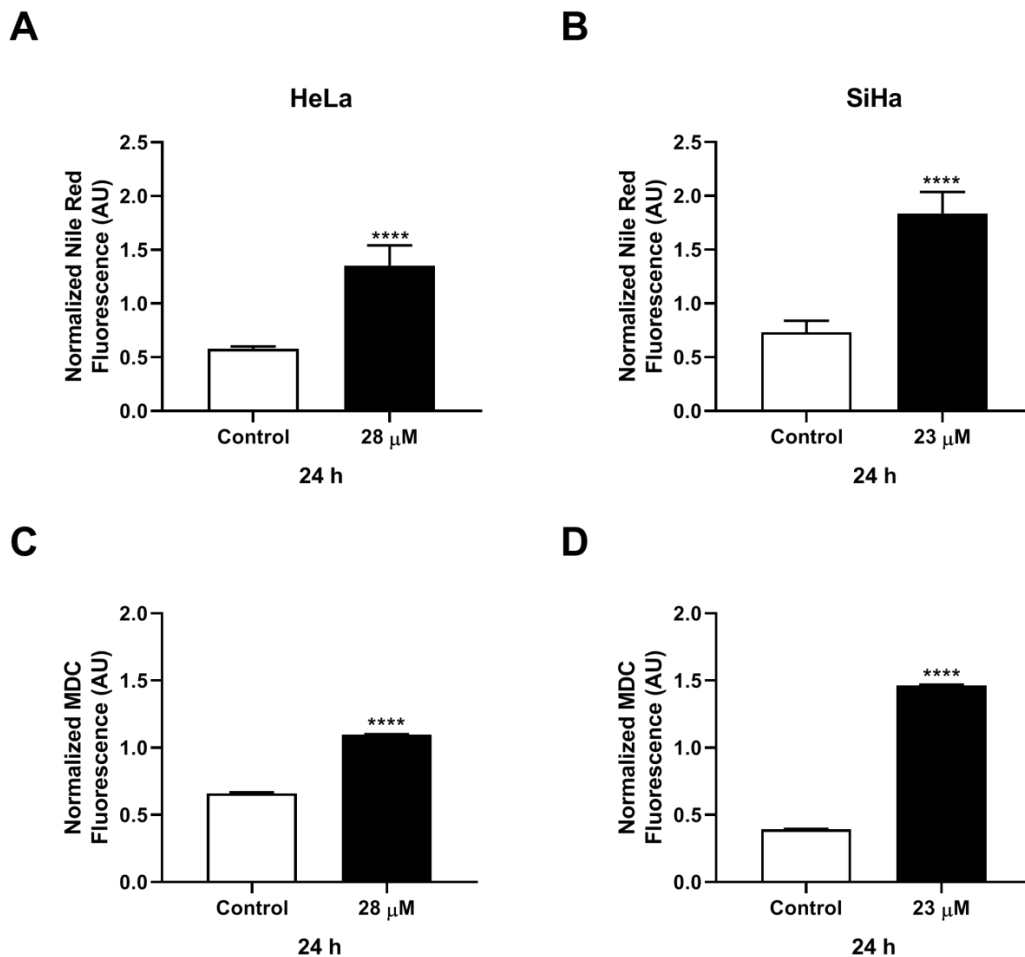


Figure 7: Metabolic stress induced by TC-IC₅₀ treatment in HeLa and SiHa cells. HeLa and SiHa cells incubated with culture medium or TC-IC₅₀ were evaluated for the formation of lipid droplets and autophagic vacuoles after 24 h of treatment. The formation of lipid droplets was determined by staining with Nile Red (A, B). Detection of autophagic vacuoles was assessed using MDC labeling (C, D).

3.5 TC promotes late apoptosis

The programmed cell death pathway is involved in the normal cycle of cell development and maturation and, results in the formation of apoptotic bodies that are rapidly phagocytosed and digested by macrophages or neighboring cells (Hänggi & Ruffell, 2023; Meng et al., 2023). The detection of late apoptosis was verified for HeLa and SiHa cells after 24 h of exposure to TC-IC₅₀ treatment.

Fig. 8A,B shows that in HeLa cells treated with TC promoted reduced cell viability by 71.09%, increased annexin 2.81% and comarcation (13.72%) ($p \leq 0.0001$). In **Fig. 8C,D**, the treatment with TC in SiHa caused a reduction in cell viability of 92.85%, an increase in annexin 4.70% and comarcation (1.20%) in relation to the control, respectively, indicating death by a process similar to apoptosis ($p \leq 0.0001$).

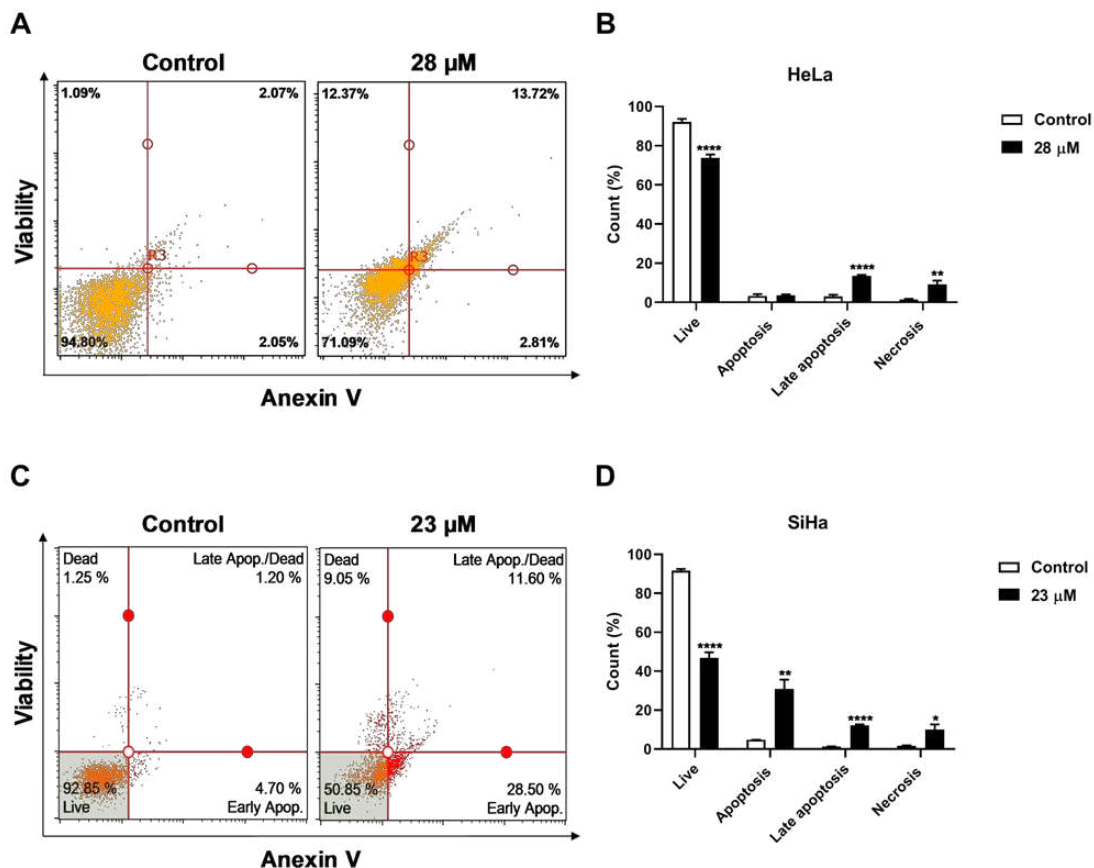


Figure 8: Treatment with TC-IC₅₀ induce apoptosis in HeLa and SiHa cells. For analysis in dot plots of cytometry, the viable cell induction, apoptosis and necrosis were evaluated for 24 h for HeLa (A) and SiHa (C) cells. Quantitative analysis of viable, apoptotic and necrotic HeLa (B)

and SiHa (D) cells. Values are expressed as mean \pm standard deviation. Cytometry data were expressed in % vs. control; and mean \pm standard deviation. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ vs. control.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brazil), Universidade Estadual de Londrina (UEL, Brazil) and Financing of Studies and Projects (FINEP).

Funding

Not applicable.

Conflict of interests

Authors declare that they have no conflict of interest

Authors' contributions

E.S.S. study design, literature review, analyses and manuscript writing. **V.M.C.**, **M.D.G.**, **B.T.S.B.** and **M.B.D.** and data analyses and manuscript writing. **E.M.S.C.**, **F.S.R.I.**, **M.B.M.**, **T.F.S.**, **W.R.P.**, **D.L.B.**, and **M.S.M.** experimental support and study design. **A.C.J.R.**, **A.C.M.C.**, **B.T.S.B.** and **F.T.P.** text correction and organization. **C.P.**, **I.C.C.**, **M.K.A.**, **K.B.O.** and **V.J.V.** study design, text correction and organization. All authors read and approved the final manuscript.

4.2 TREATMENT WITH *TRANS*-CHALCONE INDUCES OXIDATIVE STRESS, MITOCHONDRIAL DEPOLARIZATION AND NRF2 AND NFκB DISTINCT REGULATION IN CERVICAL CARCINOMA CELLS

Elaine da Silva Siqueira¹, Virgínia Márcia Concato¹, Luan Vitor Alves de Lima², Ellen Mayara Souza Cruz¹, Fabrício Seidy Ribeiro Inoue¹, Mariana Barbosa Detoni¹, Ana Carolina Jacob Rodrigues^{1,3}, Amanda Cristina Machado Carloto¹, Bruna Taciane da Silva Bortoletti¹, Taylon Felipe Silva¹, Maria Beatriz Madureira¹, Fernanda Tomiotto-Pellissier⁶, Vanessa Jacob Victorino⁷, Karen Brajão de Oliveira⁸, Marla Karine Amarante⁹, Danielle Larazin Bidóia^{1,4}, Mário Sérgio Mantovani², Wander Rogério Pavanelli¹, Ivete Conchon-Costa¹, Carolina Panis⁵.

¹Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

²Departament of General Biology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

³Graduate Program in Biosciences and Biotechnology, Carlos Chagas Institute (ICC), Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brazil.

⁴Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Paraná, Brazil.

⁵Laboratory of Tumor Biology, State University of West Paraná, Unioeste, Francisco Beltrão, Brazil.

⁶ Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

⁷Department of Biology Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro, Brazil.

⁸Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

⁹Oncology Laboratory, Department of Health Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

***Corresponding author:** Elaine da Silva Siqueira

(elaine_siqueira15@hotmail.com and Carolina Panis

(carolina.panis@unioeste.br and carolpanis@hotmail.com).

Department of Pathology Science, Laboratory of Immunopathology of Neglected Diseases and Cancer, State University of Londrina – UEL. Rodovia Celso Garcia Cid Campus Zip Code 86057-970, Post Box 10.011. Londrina, PR.

Phone: +0554333714539.

E-mail: elaine_siqueira15@hotmail.com

Highlights

trans-chalcone has anti-proliferative activity in cervical cancer cell lines;
Treatment with *trans*-chalcone leads to the generation of oxidative stress;
trans-chalcone promotes NO_x reduction and increased NRF2/NFκB expression.

Abstract

Molecules derived from medicinal plants have been a source of research for new antineoplastic therapies as monotherapy or adjuvant therapy. In this study, we investigated the impact of *trans*-chalcone (TC) treatment on two cell lines representing different histological types of cervical carcinoma, HeLa and SiHa. The cell lines were treated with TC at the inhibitory concentration for 50% of the cells (IC₅₀), respectively 28 μM (HeLa) and 23 μM (SiHa) for 24 hours. To investigate the mechanisms involved in the antiproliferative activity, oxidative stress analyses were carried out, including evaluation of the mitochondrial depolarization profile, measurement of hydroperoxide levels, determination of antioxidant capacity, measurement of nitric oxide metabolites and evaluation of the expression of transcription factors that regulate the redox balance NRF2 and NFκB. We observed that treatment with TC was capable of promoting mitochondrial depolarization, inducing the formation of lipid droplets and autophagic vacuoles, with consequent cell death. TC also induced the generation of oxidative stress observed by the increased generation of hydroperoxides. Concomitantly, we observed an increase in the expression of the transcription factors NRF2 and NFκB in both lineages. There was also a reduction in the production of NO metabolites in both models. These results suggest that TC exerts its antiproliferative effect on cervical cancer by generating oxidative stress and activating the NRF2 and NFκB transcription factors.

Keywords: Cervical carcinoma; HeLa; SiHa; Flavonoid; Antineoplastic therapy, Metabolic stress.

Abbreviations:

TC: *trans*-chalcone; DMSO: dimethyl sulfoxide; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS: fetal bovine serum; PBS: phosphate buffered saline; MTT: dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; H2DCFDA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; NO: nitric oxide; ROS: reactive oxygen species; TMRE: tetramethylrhodamine-ethyl ester; CCCP: carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone.

1. Introduction

Cervical cancer is a gynecological malignant neoplasm with a high incidence and responsible for a significant number of women's deaths worldwide (GLOBOCAN, 2020). It is considered a public health problem and has a strong association with infection by oncogenic strains of the human papilloma virus (HPV) (Singh et al., 2020; Seshadri, 2021; Fan et al., 2022; Derby et al., 2023).

The oncogenic strains HPV-16 and HPV-18 have a prevalence of 65% in cervical carcinoma (Boch et al., 2008; Clifford et al., 2006; Brankovic et al., 2013; Hebner & Laimins, 2006). This association with HPV infection is linked to prolonged deregulation of the cell cycle, chromosomal instability, resistance to apoptosis and oxidative damage with consequent alteration of essential cellular functions, such as DNA replication and repair. As a result, active metabolites that are directly related to central phenomena in tumor progression, such as angiogenesis, vasodilation and invasion are generated (Woo et al., 2008; Shaw et al., 2013; Mencialha et al., 2014; Akki et al., 2018).

Once the precursor lesions of cervical carcinoma have been established, the disease tends to progress variably, depending on intrinsic host factors such as the immune response (Pfaffenzeller et al., 2020; Lu et al., 2022). The disease is classified into different histological types, particularly squamous cell carcinoma, which accounts for the majority of cases, and adenocarcinoma, the second most common type. Squamous cell carcinoma originates in the squamous cells lining the cervix, while adenocarcinoma originates in the glandular cells of the cervix (Cohen et al., 2019, American Cancer Society, 2023). In addition to these, there are less common types, such as adenosquamous carcinoma, small cell carcinoma and reserve cell

carcinoma. Identifying the histological type is fundamental for accurate diagnosis, treatment planning and assessing the prognosis of cervical cancer (He et al., 2014; NHI, 2020).

In general, during the cancer phase, patients undergo polymodal treatment, which combines radiotherapy, immunotherapy and chemotherapy, mainly with platinum-based drugs. However, these therapies have high toxicity and are not always effective in cervical cancer due to drug resistance and serious side effects, especially neurotoxicity and nephrotoxicity (Motoki et al., 2012; Manders et al., 2018; Vizza et al., 2019; Singh et al., 2020).

Therefore, there is growing interest in the study of phytochemicals present in medicinal plants, for the potential development of antineoplastic therapies. These compounds are expected to show selective cytotoxicity and greater efficacy on tumor cells (Wang et al., 2021).

In this context, *trans*-chalcone (TC) stands out, a flavonoid with a wide range of pharmacological effects, including cytotoxicity on various cancer cell lines such as lung, breast, bone, colorectal and oral cancer (Shen et al, 2007; Bortolotto et al., 2017; Mateeva et al., 2017; Silva et al., 2016, 2018) and liver, as described by our studies (Siqueira et al., 2020), which showed high selectivity for tumor cells when compared to non-tumor cells (Siqueira et al., 2020).

However, the *in vitro* effect of TC on the cervical cell lines HeLa (adenocarcinoma) and SiHa (squamous cell carcinoma) has not yet been described. Therefore, this study investigated the effect of TC treatment on two cervical carcinoma cell lines derived from different histological types. Therefore, we evaluate the redox mechanisms involved in this process, by measuring oxidative stress markers (hydroperoxides, antioxidant capacity and nitric oxide metabolites), mitochondrial depolarization and the expression of redox balance regulating transcription factors, NRF2 and NF- κ B.

2. Materials and methods

2.1 *Trans*-chalcone

Commercial *trans*-chalcone (TC), with a purity of 97%, was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz Biotechnologies, CA- Catalog Number sc-204681 - Dallas, TX, USA). The TC stock solution was dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (GIBCO, Invitrogen, New York, USA). The concentration of DMSO did not exceed 0.01% in all experiments.

2.2 Culture of tumor cells

Established cervical carcinoma cell lines, HeLa and SiHa, were cultured in RPMI (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) and DMEM (Lifetechnologies) medium, respectively. Both supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB, GIBCO, Invitrogen, New York, USA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Santa Cruz Biotechnologies) and maintained in an incubator at 37°C, 5% CO₂ (Sanyo, Japan). Since there have been no studies using this compound as a treatment for cervical carcinoma, we investigated the mechanisms of action on these tumor cells.

2.3 Determination of the Oxidative Stress profile

In order to assess whether ROS production would be able to influence the HeLa and SiHa tumor cell lines, we quantified lipoperoxidation levels using the t-butyl hydroperoxide-induced chemiluminescence (QL) method described by Gonzales-Flecha et al., (1991) and adapted by Victorino et al., (2014). 600 µL of sample was added to 300 µL of 10 mM monobasic phosphate buffer pH 7.4 in 0.9% NaCl and incubated at 37° C for 5 minutes. To trigger the reaction, an aliquot of 20 µL of the t-butyl solution was added. The reaction was read on a Glomax luminometer (Promega, Madison, WI, USA) at a rate of one reading per second for 30 minutes, where the qualitative photon emission curve was evaluated, measured in relative light units (RLUs).

2.4 Evaluation of the Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

To evaluate the total radical scavenging antioxidant parameter (TRAP) by chemiluminescence, we used the technique described by Repetto et al.,

(1996) and adapted by Victorino et al., (2016). The compound 2-azobis-(2-amidinopropane) (ABAP) reacts with the lipids present in the plasma to form lipoperoxides. This reaction emits photons in small quantities, which cannot be detected by spectrophotometry. To amplify this reaction, luminol was added, a more unstable compound than lipoperoxides, capable of capturing the unpaired electrons of these lipoperoxides, amplifying the emission of light and the emission of a signal to the luminometer. The greater the amount of antioxidants present in the sample, the greater the delay in the rise of the ABAP curve, which corresponds to the impediment in the formation of lipoperoxides due to the level of low molecular weight antioxidants. Aliquots of 5 μL of the samples were added to 830 μL of 1M glycine buffer, pH 8.6, plus 50 μL of luminol solution (0.0398 mg/mL) and 50 μL of ABAP solution (54.24 mg/mL) to start the reaction. The results were analyzed in OriginLab 7.5 software (OriginLab) and expressed in nM of trolox, based on the inhibition profile of the ABAP curve of a standard solution of the water-soluble analogue of vitamin E (Trolox 0.5 mg/mL).

2.5 Determination of nitric oxide metabolites (NO_x)

Nitric oxide metabolites (NO₂) levels were determined using the Griess reaction, according to a protocol adapted from Panis et al., (2011). Aliquots of 60 μL of sample were deproteinized by adding 50 μL of 75 mM ZnSO₄ solution (Merck), shaken and centrifuged at 12,298 G for 2 minutes and then 70 μL of 55 mM NaOH (Merck) were added. They were then shaken and centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. The clear supernatant was recovered and diluted in glycine buffer solution (45g/L pH 9.7, Merck) in a 5:1 ratio. The cadmium beads (Fluka) stored in 100 mM H₂SO₄ solution (Merck) were washed 3 times in sterile distilled water and added to a 5 mM CuSO₄ solution in glycine-NaOH buffer (15 g/L, pH 9.7, Merck) for 5 minutes. The activated beads (600-1000 mg, approximately 1-2 beads) were then added to the supernatant diluted in glycine buffer and shaken for 10 minutes.

Aliquots of 200 μL were recovered in tubes suitable for nitrite determination and the same volume of Griess reagent was added (Reagent I: 50 mg of N-naphthylenediamine in 250 mL of distilled water; reagent II: 5 g of

sulphanilic acid in 500 mL of 3 M HCl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After a 10-minute incubation at room temperature, the tubes were centrifuged at 12,298 G for 2 minutes and 100 μ L were added to 96-well microplates in triplicate. To determine the nitrite concentration of the sample, the calibration curve was prepared by diluting NaNO₂ (Merck) in sterile distilled water to concentrations of 125 to zero μ M and 100 μ L of the curve point + 100 μ L of Griess reagent were added in triplicate to the microplate wells. The absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader. The results were expressed in μ M.

2.6 Determination of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

Analysis of $\Delta\Psi_m$ was performed by labeling with tetramethylrhodamine-ethyl ester (TMRE) (Sigma-Aldrich), as described by Siqueira et al. (2020). The cells (10^4 /96 well) were seeded with their respective culture media and incubated for 24 hours. Controls and treatments with 28 μ M TC-IC₅₀ (HeLa) and 23 μ M (SiHa) were incubated for a further 24 hours. They were then washed with buffered saline (PBS) and incubated with TMRE for 30 min at 37°C. The depolarization profile of the mitochondrial membrane was assessed by fluorescence TMRE labeling using an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 580 nm in a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland).

2.7 Analysis of reactive oxygen species (ROS)

To evaluate the production of ROS, the intensity of the fluorescence emitted from the conversion of non-fluorescent H₂DCFDA into highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) by intracellular free radicals was quantified. HeLa and SiHa cells (10^4 cells/96 well) were seeded and incubated for 24 hours. After this period, they were treated with TC-IC₅₀ 28 μ M (HeLa) and 23 μ M (SiHa) and incubated for 24 hours. The cells were then washed and H₂DCFDA solution (10.0 M) was added and left in the dark for 45 min. Fluorescence intensity was quantified using a Glomax spectrophotometer

(Promega, USA) (excitation: 488 nm; and emission: 530 nm), as described by (Concato et al., 2023).

2.8 Immunolabeling for NRF2 and NF- κ B

For NRF2 and NF- κ B labeling, HeLa and SiHa cells ($10^6/6$ well) were cultured on round coverslips for 24 hours and previously treated with 3-aminopropyl-triethoxysilane. The coverslips were incubated overnight with specific primary antibodies (both from Santa Cruz Biotechnology, diluted 1:2000). After washing, incubation was carried out with secondary antibody diluted 1:3000 (Texas Red, BD Biosciences) for 2 hours. The nuclei were labeled with 4,6 diamidinophenylindol (DAPI) (Sigma-Aldrich), 5 mg/mL solution, for 30 minutes and the final slides were mounted in glycerol. The images were captured on a Motic BA410E fluorescence microscope coupled to a MOTICAM ProS5 Plus camera and Motic Images Plus 3.0 ML image acquisition and processing software. The slides were scanned using a DAPI excitation filter at a magnification of 200 or 400 \times . The following settings were preset: automatic exposure, gain + 20 and zero deviations. The images obtained were stored in BMP format, with a resolution of 2048 \times 1536 pixels.

2.9 Statistical analysis

Data is expressed as mean \pm standard error of the mean. Three independent experiments were carried out, each in triplicate. Data were analyzed using GraphPad Prism 9.0 statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego California, USA). Significant differences between the groups were determined using one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 TC interferes with the viability of HeLa and SiHa cells

According to work previously published by our group, the results of the MTT assay showed that, after the 24 h treatment period, TC (6.25-100 μM) significantly decreased the cell viability of the HeLa and SiHa cell lines compared to the control group ($p \leq 0.0001$) (FIG. 1A,B). In addition, concentrations higher than TC-IC₅₀ (28 $\mu\text{M} \pm 0.06$) in HeLa and (23 $\mu\text{M} \pm 0.03$) in SiHa were shown to be more effective on tumor cells than the positive control (CIS) ($p \leq 0.0001$) (Siqueira et al., 2023).

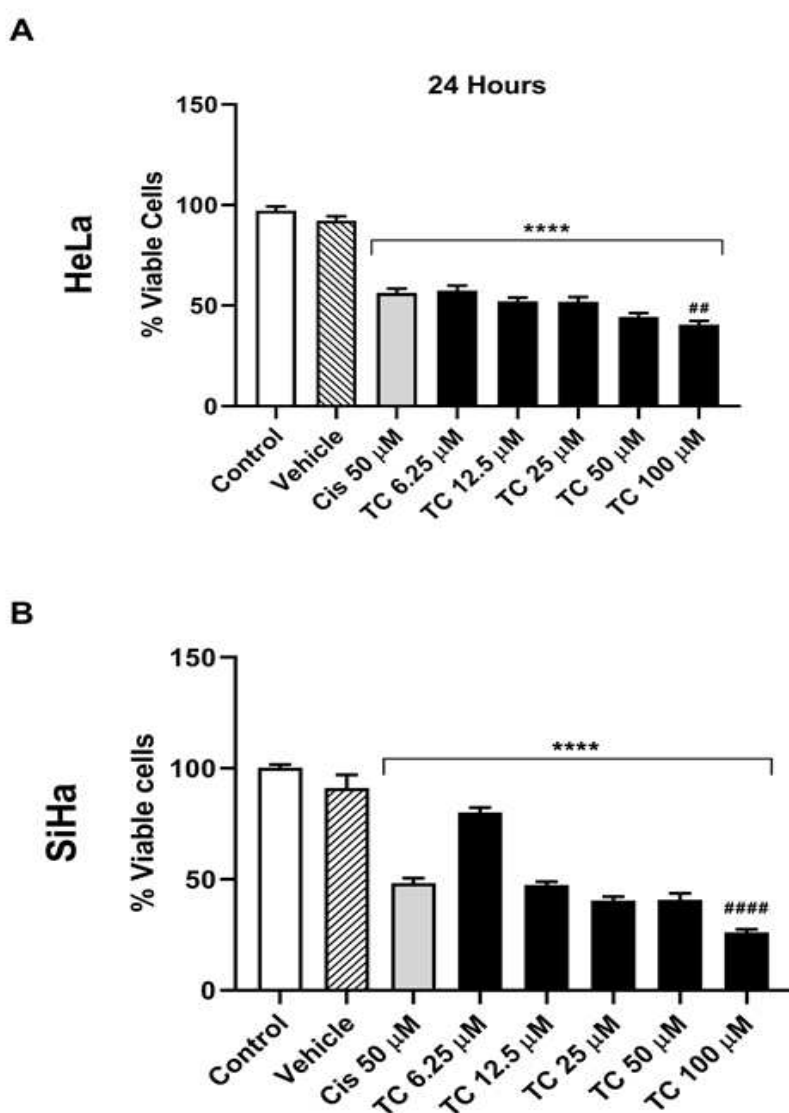


Figure 1: Effect of different concentrations of TC on the viability of HeLa and SiHa cell

lines over 24 hours. HeLa and SiHa cells were treated with TC at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 μ M for 24 hours (A,B). The relative survival rate of HeLa and SiHa cells was detected by the MTT assay. Control (culture medium), Vehicle (DMSO 0.01%) and Positive control (Cisplatin 50 μ M). The values represent the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments carried out in triplicate. The ANOVA statistical method was used, followed by the Tukey test. **** Significant difference compared to control ($p \leq 0.0001$). ## Significant difference compared to the positive control ($p \leq 0.01$) and ##### ($p \leq .0001$).

3.2 TC induces oxidative stress in HeLa and SiHa cell lines through mitochondrial depolarization and an increase in ROS

Once the reduction in viability in HeLa and SiHa cells treated with TC had been verified, the mechanisms involved in this effect were investigated. Firstly, the depolarization profile of the mitochondrial membrane was assessed using the TMRE fluorescent probe. It was found that, after treatment for 24 hours with TC-IC₅₀, there was a significant reduction in total fluorescence intensity of 29.41% and 27.63% compared to the control group, respectively for HeLa and SiHa cells ($p \leq 0.0001$), indicating that the treatment induced mitochondrial depolarization in both strains (**FIG. 2 A,B**).

In addition, treatment with TC-IC₅₀ induced an increase in RS by 63.81% and 63.92%, respectively in HeLa and SiHa cells compared to the control group ($p \leq 0.01$) (**FIG. 2C, D**). In both lineages, treatment with TC reduced the production of nitric oxide metabolites (**FIG. 2E, F**).

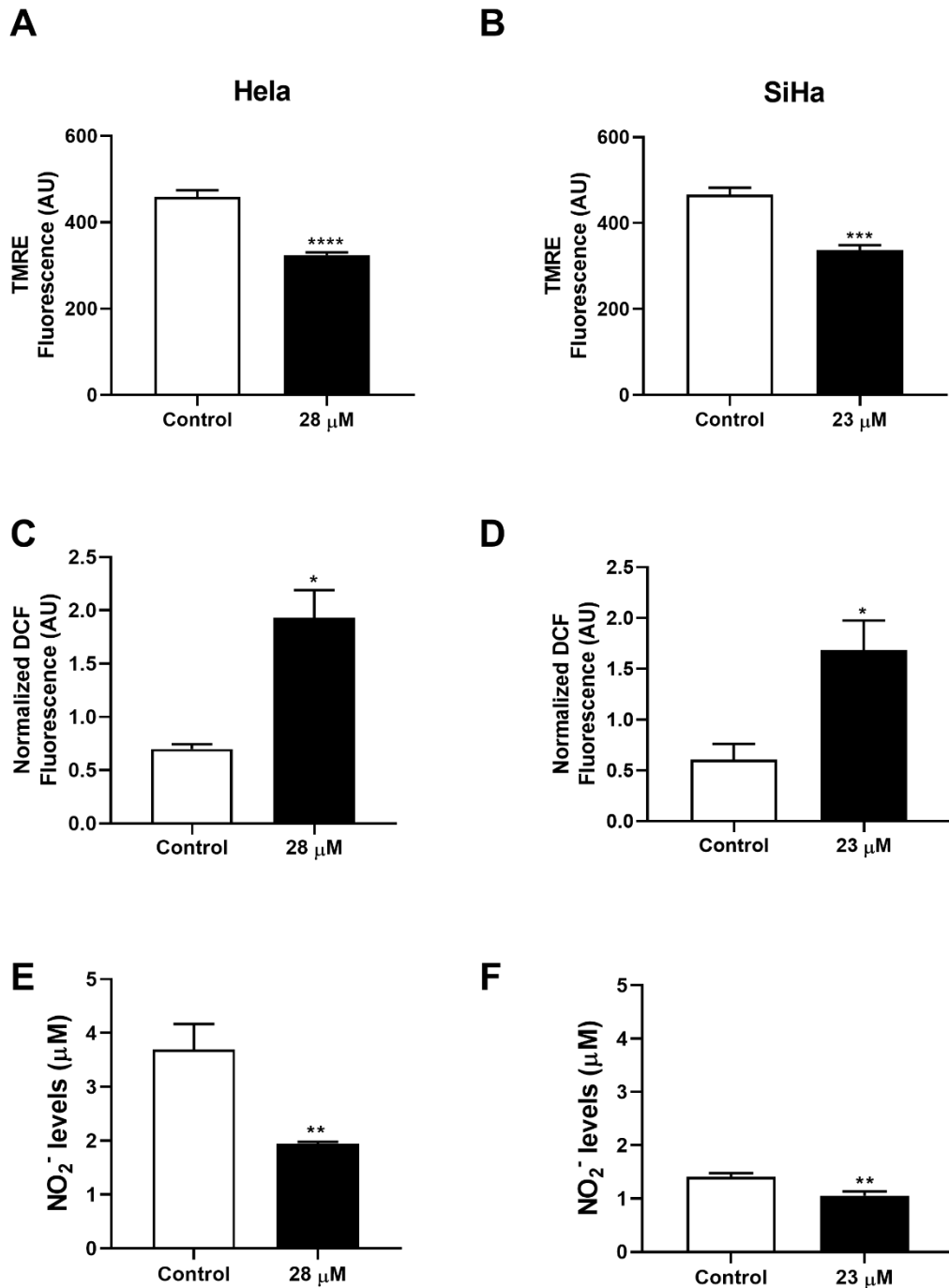


Figure 2: Mitochondrial depolarization, ROS production and NOx estimates in HeLa and SiHa cells after treatment with TC-IC₅₀ after 24 h. The TMRE assay was performed for fluorimetric analysis of $\Delta\Psi_m$ after 24 h (A,B). Data are expressed as DCF and analyzed at 24 h (C,D) to determine ROS levels. NOx were measured by Griess colorimetric reaction, as an estimate of nitric oxide at 24h (E,F). Values represent the mean \pm SEM of three different experiments carried out in triplicate. **Significant difference compared to control ($p \leq 0.01$), ***($p \leq 0.001$) and ****($p \leq 0.0001$).

3.3 TC shows different lipoperoxidation profiles in HeLa and SiHa cell lines

Based on this result, we investigated whether this RS production was capable of damaging tumor cell lines membranes. To this end, we evaluated the lipoperoxidation profile of cells treated for 24 hours with TC-IC₅₀. We observed that in HeLa cells there was an increase in lipoperoxidation induced by TC ($p \leq 0.001$) (FIG. 3A,C), while in SiHa cell lines we observed a reduction in this phenomenon ($p \leq 0.0001$) (FIG. 3B,C).

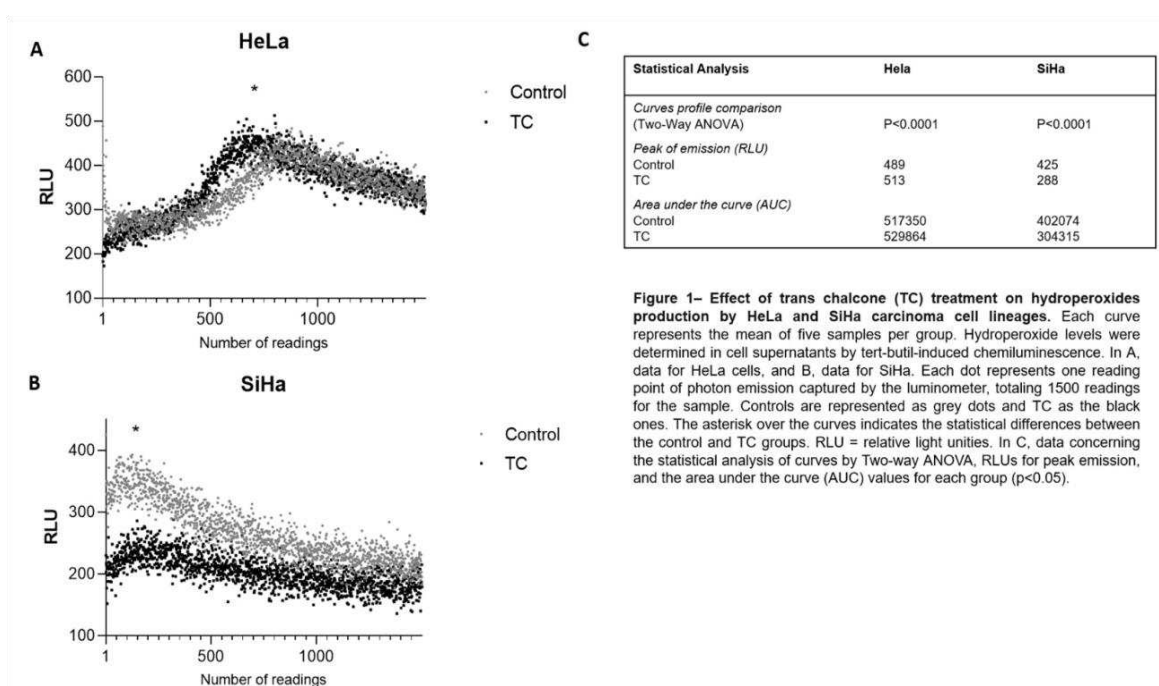


Figure 3: Effect of TC treatment on hydroperoxide production in HeLa (A) and SiHa (B) carcinoma cell lines after 24 hours of treatment with TC-IC₅₀. Hydroperoxide levels were determined by tert-butyl-induced chemiluminescence. Each curve represents the average of five samples per group and each point represents a photon emission reading captured by the luminometer, totaling 1500 readings per sample. Controls are represented by gray dots and TC-treated cells by black dots. *Statistical differences between the control and TC groups. In C, data relating to the statistical analysis of the curves by Two-way ANOVA, relative light units (RLU) for the peak emission values and the area under the curve (AUC) values for each group ($p < 0.05$).

3.4 TC alters the antioxidant capacity of SiHa cells, but does not influence HeLa cells

Since oxidative stress is correlated with the antioxidant capacity of cells, we analyzed these profiles in both strains. Analysis of the antioxidant capacity of the exposed cells revealed that TC reduces the antioxidant content only in the SiHa cells, without altering the levels in the HeLa cells (**FIG. 4A,B**). In HeLa from control (358 ± 2 nM) to treated (336.5 ± 50.5) and in SiHa from control (324.5 ± 24.5 nM) to treated (199 ± 9 nM) ($p\leq 0.01$).

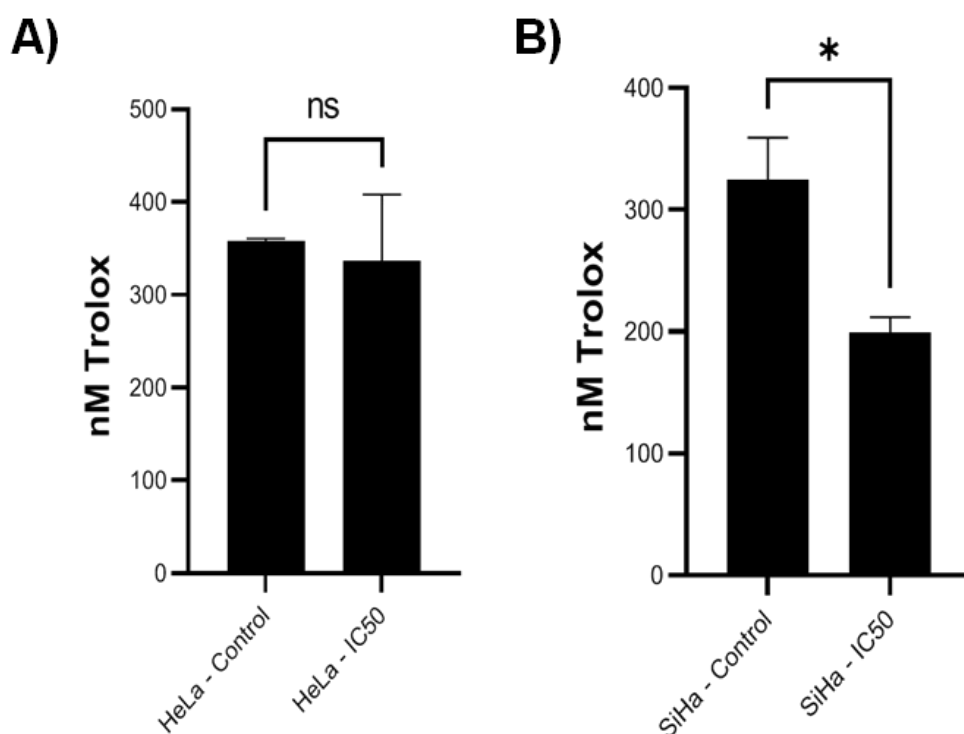


Figure 4: Analysis of total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) after treatment with TC-IC₅₀ for 24 hours in HeLa (A) and SiHa (B) cells. Antioxidant capacity was measured by chemiluminescence and expressed in nM Trolox (water-soluble vitamin E standard). Data are expressed in nM. *Statistical differences between the control and TC groups ($p\leq 0.05$). NS = not significant.

3.5 TC interferes with the levels of transcription factors NRF2 and NFκB in HeLa and SiHa cells

In addition to the redox variations observed, we also assessed the

levels of the transcription factors NRF2 and NFκB, key regulators of the oxidative stress process. A reduced expression of NFκB and an increased expression of NRF2 were observed in HeLa cells when compared to the control ($p \leq 0.01$) (FIG. 5A,B). In SiHa cells, there was an increase in NF-κB expression when compared to the control ($p \leq 0.01$), with no significant differences in NRF2 levels (FIG. 5A,B).

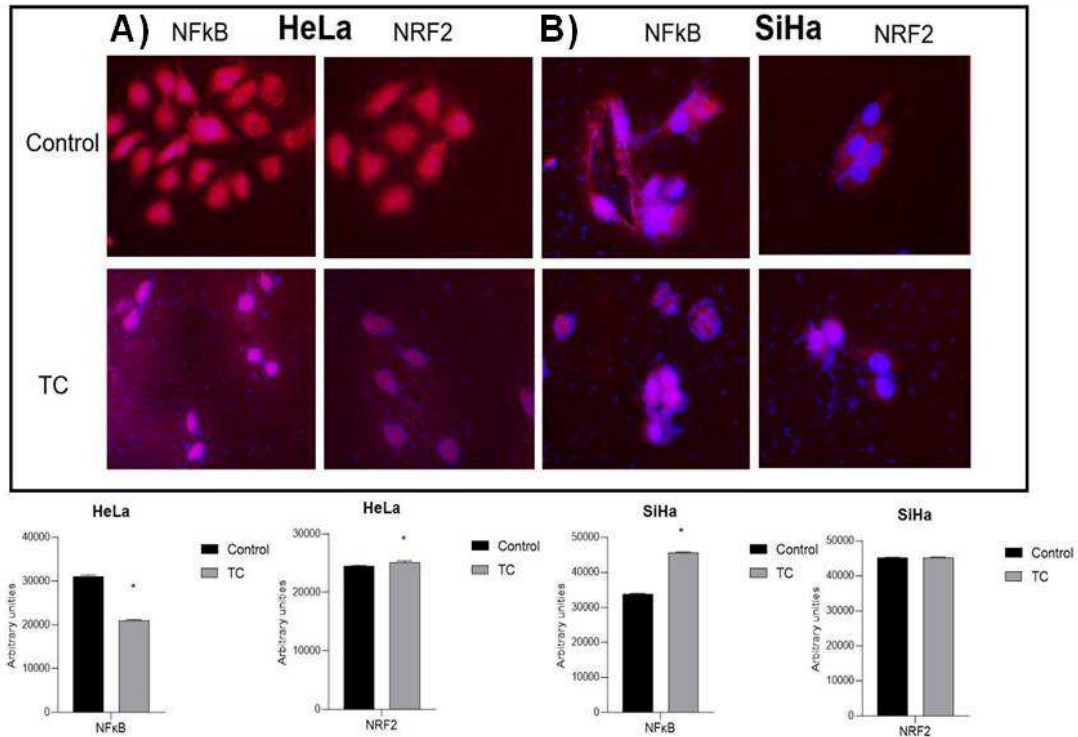


Figure 5: Immunofluorescence of HeLa and SiHa cell cultures for NRF2 and NFκB labeling. Nuclear staining with DAPI was performed and images were captured after 24 hours. The values represent the mean \pm SEM of three different experiments carried out in triplicate. *Significant difference compared to control ($p \leq 0.01$) and ($p \leq 0.001$).

4 DISCUSSÃO

Invasive carcinomas such as cervical carcinoma tend to present problems related to excessive radioresistance, chemoresistance and metastasis, in addition to long-term adverse effects (Vale et al., 2010; Randall & Ghebre, 2016). Therefore, the choice of therapy is based on a several factors, including cancer stage, tumor extension and metastasis. Immunotherapy, radiotherapy and chemotherapy alone or in combination (chemoradiation), in

addition to surgical intervention, are the most commonly used oncotherapies (Lõhmussaar et al., 2021). Considering this, the mechanisms underlying the anti-tumor properties of TC are still being discovered and there is a search for less toxic strategies that are more effective in inhibiting malignant proliferation.

In a previous study, we revealed that TC has potential activity in decreasing the migration ability of the HuH7.5 (hepatocellular carcinoma) cell line, evidencing for the first time the efficacy of this flavonoid in selectively combating liver cancer cells (Siqueira et al., 2020). TC has also been shown to be a potent antioxidant with antimicrobial, anti-inflammatory and anti-neoplastic properties (Alharthi et al., 2023; Shen et al., 2007; Sikander et al., 2011).

In the present study, we demonstrated the cytotoxicity of TC against HeLa and SiHa cervical carcinoma cell lines using the mean inhibitory concentration (IC_{50}) previously defined in a previous study, which showed inhibitory activity without affecting more than 50% of cell viability and causing damage to non-tumor cells. TC treatment was able to reduce the viability of cell lines, in which TC reduced cell viability, caused morphological/ultrastructural changes, and induced apoptosis-like cell death. Given these promising results, this study investigated the possible redox mechanisms by TC treatment on HeLa and SiHa cervical cancer cells.

Similar results were also demonstrated in BT-20 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines, which TC- IC_{50} showed antiproliferative activity and induced cell death by apoptosis (Komoto et al., 2021). In MCF-7 Luminal Abreast cancer it effectively inhibited their growth and caused apoptosis (Bortolotto et al., 2017). In U2OS and SJSA-1 osteosarcoma cell lines there was inhibition of cell growth in a dose- and time-dependent manner (IC_{50} 10 μ M after 48 h) and consequent cell death by apoptosis (Silva et al., 2016). Silva and colleagues (2018) also tested TC (IC_{50} 50 μ M for 24 h) on various cell lines such as HCT-116 (colorectal cancer), U2OS and SJSA-1 (osteosarcoma), and FaDu (oral cancer), and the results obtained showed that HSP40 and ATF3 genes were highly induced, which are involved in increasing the stability and activation of tumor suppressor protein (p53). In addition, the IC_{50} of TC used in HeLa and SiHa strains proved to be more efficient than the concentrations tested in these cited studies.

Under pathological conditions, such as the metastatic process involved in cancer, cell adhesion, proliferation, migration, differentiation, and invasion are part of this systematics (Venter & Niesler, 2019). In wound healing assay, positive regulation of TC suppressed cell migration at the wound site, with consequent growth restriction of both cervical carcinoma tumor cell lines (Liu et al., 2021). Corroborating these data, it was observed that TC caused morphological changes through decreased protrusive cell activity, as filopodia in association with lamellipodia act as local detection antennae and contacts, responsible for persistent cell migration (Vaidžiulytė et al., 2022; Caballero et al., 2014; Ruiz-Lafuente et al., 2021).

In association, these results corroborate with the SEM images showing cell membrane shrinkage, irregular cell surface, reduction of microvilli, damage and rupture of the cell membrane of both HeLa and SiHa tumor lines. From transmission electron microscopy it is possible to unravel the ultrastructural and compositional properties, and by scanning electron microscopy to analyze the cell topography/surface of macromolecular complexes *in vitro* in addition to all subcellular processes taking place there (Golmohammadzadeh et al., 2023; Yang et al., 2023). Through these analyses in conjunction with the other methodologies performed we found that TC promoted changes in cell size, morphology, and functionality. In addition, TC interfered with the morphology of microvilli, whose ability is to increase the surface area for nutrient uptake or secretion by cells (Liu et al., 2019). Such findings suggest that TC interferes with the locomotion, adhesion, absorption, and secretion of these cells.

In addition, TC stimulated the increase of LD, which are tasked to store excess cellular fatty acids in the form of neutral lipids and, serve as an energy source for cell proliferation (Guštin et al., 2017). However, in response to cellular stress states and nutrient availability, their lipid and protein composition changes according to specific cellular needs, i.e., there is alteration in their biogenesis and turnover (Petan, 2023; Bosh et al., 2020).

The high energy consumption by tumor cells affects intracellular metabolism contributing to lipid metabolic alterations, which impact the growth, dissemination and resistance of tumor cells to chemotherapy treatment (García-Chico et al., 2023; Fernández et al., 2020; Hojman et al., 2018). The use of TC has been shown as a potential therapeutic opportunity in the action of these

cancer cells, by influencing the metabolic reprogramming of cancer, impelling stress and consequent cell death, thus preventing tumor progression (Jarc & Petan, 2020). Therefore, the alteration of these markers post-treatment signals that the cells suffer an imbalance in their homeostasis that tend to be characteristic of metabolic alterations caused by TC culminating in cell death.

Recent studies also point out that the dynamics and multifunctionality of LDs is of paramount importance for the process of efficient autophagy regulation (Ogasawara et al., 2020). Thus, TC was shown to have an antitumor effect by influencing the formation of autophagic vacuoles, a catabolic process that needs the collaboration of autophagosomes and lysosomes to perform cell recycling, but due to the tumor pathological process and association with damage to mitochondria and lysosomes, the treatment possibly induced the cells to metabolic stress (Settembre et al., 2011; Bordin et al., 2013; Martins et al., 2019). When activated in tumor cells, autophagy can act in the degradation of harmful and damaged proteins/organelles, thus minimizing the accumulation and spread of damage, and is a plausible approach to inhibit tumor progression (Kumar et al., 2023).

Concomitant to these data, there was a stimulation of the apoptotic machinery in response to the cellular and metabolic stress suffered, resulting in cell destruction. Apoptosis occurs in an organized and controlled manner, which allows the elimination of dysfunctional cells and damaged tissues for the maintenance of cellular homeostasis (García-Chico et al., 2023). Therefore, along with autophagy, activation of late apoptosis plays an active role in cell death, showing the effectiveness of TC treatment in cervical cancer, especially under HeLa and SiHa cell lines.

We have also shown that TC causes metabolic changes through the induction of lipid droplets and autophagic vacuoles that culminate in the late apoptotic death of these cells (Siqueira et al., 2023). Furthermore, we have seen that these events depend on the type of cell lineage. This information is new and contributes to understanding the mechanisms of TC's anti-tumor action.

Thus, considering its potential to generate oxidative stress (Sikander et al., 2011), we began our investigation by determining whether TC was capable of inducing changes in mitochondrial potential, triggering the production of ROS.

Mitochondria are organelles that are directly linked to energy metabolism and the regulation of various processes and, under metabolic stress, they are damaged, resulting in cell bulging (Zheng et al., 2007; Schäfer et al., 2022). The intrinsic (i.e. mitochondrial) programmed cell death pathway detects and integrates signals originating intracellularly (García-Chico et al., 2023). In this context, we found that TC treatment triggered mitochondrial alterations corresponding to a decrease in $\Delta\Psi_m$ and consequent interference in mitochondrial homeostasis and dysfunction, according to studies by (Vijayarathna et al., 2017; Neill et al., 2022), which could affect the generation of ROS and the production of oxidative stress.

In this respect, we showed that TC increased ROS production in the HeLa and SiHa lineages. Depending on the level of ROS production, metabolic diseases and even apoptosis can be induced. High oxidative stress stimulates the generation of ROS (hydroxyl radicals, superoxide and hydrogen peroxide), which can also be attributed to mitochondrial dysfunction (Alharthy et al., 2023; Shpilt et al., 2023; Tuli et al., 2023) and triggers apoptosis, as demonstrated in a previous study (Siqueira et al., 2023), in addition to the activation of transcription factors such as NF κ B, MAPK and NRF2.

In contrast, after treatment with TC there was a depletion in the production of nitric oxide metabolites in both cell lines. In tumor cells, in addition to the production of ROS, reactive nitrogen species (RNSs) are also formed, such as nitric oxide [NO \bullet] and its reactive metabolites (Hayes et al., 2020). In these conditions of prolonged oxidative stress, TC has been shown to inhibit tumor hyperproliferation, in addition to improving damage to cell structures, acting on the antioxidant defense system by reducing NO x (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Akki et al., 2018; Remigante et al., 2023).

Concomitantly to the production of NO x and ROS, treatment with TC was able to increase lipid peroxidation in HeLa cells, a hallmark of oxidative stress that arises from the attack of ROS on unsaturated lipids in cell membranes, with the incorporation of a molecular oxygen (free radical) into the fatty acids, generating some radicals (alkyl (L-), alkoxy (LO-) and peroxy (LOO-)), which lead to the destruction of their structure, the failure of metabolite exchange mechanisms and even cell death (Benzie, 1996; Lima et al. 2001; Catalá, 2009). Interestingly, SiHa cells showed a reduction in lipid peroxidation

when treated with TC. These results are probably due to the distinction between the two cell types due to their different origins and tissues.

Since the generation of oxidative stress directly affects the antioxidant capacity of cells, we investigated TRAP levels in both cervical carcinoma cell lines after treatment with TC. Only SiHa cells showed depleted TRAP, which may help to explain why lipid peroxidation levels were reduced in this cell line after TC treatment. This suggests that TC probably triggered lipid peroxidation in these cells, whose defense was the consumption of antioxidants. Modifications in the intracellular redox state, especially antioxidant levels, have been described in cancer (Peng et al., 2021; Bhardwaj et al., 2023).

Due to the observed redox variations, we further investigated the expression profiles of the two major transcription factors that regulate oxidative stress responses, NF κ B and NRF2. NF- κ B plays an essential role in immune regulatory responses, viral replication, inflammation, cancer initiation and progression, acting as a stress response factor (Hayden et al., 2006; Hoesel & Schmid, 2013; Taniguchi & Karin, 2018). On the other hand, it plays an important role in regulating metabolism and cytoprotective genes and was highly expressed in the cell nucleus in HeLa and SiHa tumor cell lines. When activated by increased ROS, NRF2 binds to antioxidant response elements (AREs) and induces the expression of antioxidant enzymes, such as heme oxygenase, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase, activating the transcription of their genes and also neutralizing ROS, protecting cells against damage caused by oxidative stress (Baird et al., 2020; Tossetta & Marzioni, 2023).

Our results showed that NRF2 and NF κ B were differentially expressed after TC treatment, depending on the type of cervical carcinoma cell. HeLa cells downregulated NF κ B and overexpressed NRF2, while SiHa cells only increased NF κ B expression.

Both lineages are associated with HPV, which when activated there is negative regulation of NF- κ B in order to inhibit replication triggered by the immune system, regulate HPV and control the expression of E6 and E7 proteins of HPV-16 and increase several target genes (James et al., 2006; Wong et al., 2011; Tilborghs et al., 2017). The treatment used can act to prevent the formation of cells in the cervical region, in addition to functioning as a tumor

suppressor, inhibiting its growth and stimulating the expression of apoptosis-inducing genes, as happened in the HeLa strain, in which TC reduced NFκB expression, with consequent inhibition of cell growth and late apoptosis (Disis, 2010; Vandermark et al., 2012; Hoesel & Schmid, 2013).

However, in SiHa cells, TC positively regulated NFκB, evidencing the intensification of nuclear labeling post-treatment (Tilborghs et al., 2017; Nair et al., 2003). NFκB translocates to the nucleus, with gradual increase and binding of NFκB to DNA from normal tissue to precancerous and carcinoma, a fact that is significantly associated with cancer progression, characteristic of adenocarcinoma (Branca et al., 2006; Tilborghs et al., 2017).

Finally, these results show us that TC modulates several features of cervical cancer, such as reduced viability and cell survival, decreased migratory capacity, morphological and structural changes of cells, increased metabolic stress with consequent apoptotic cell death, becoming a promising therapeutic alternative in the development of antitumor compounds.

These findings demonstrate that TC acts on cervical carcinoma cell lines by triggering oxidative stress-driven mechanisms in distinct ways. This is not a phenomenon of cervical cancer, but this is probably because they have distinct mechanisms due to the origin and tissue affected, in the case of our study, two cell types that originate SCC and ADC, SiHa and HeLa, respectively. The different mechanisms of action of this flavonoid, combined with its stability and low toxicity, make it a strong candidate for chemotherapeutic drug. However, further studies need to be conducted to complement our findings and elucidate the mechanisms involved in the context of these cancer cells.

5 CONCLUSÃO

Com base nos nossos resultados, podemos concluir que os carcinomas do colo do útero apresentam níveis elevados de danos oxidativos resultantes da peroxidação lipídica, da nitração de proteínas e da oxidação do DNA. No entanto, embora os estudos com TC em HeLa e SiHa sejam iniciais para essas linhagens, esse composto não só mostrou atividade antiproliferativa em ambas as células tumorais, mas também induziu alterações morfológicas e ultra-estruturais confirmadas por alterações metabólicas através da formação de gotículas lipídicas citoplasmáticas e vacúolos autofágicos, além de estresse oxidativo com redução de NOx por meio de diferentes mecanismos em relação à expressão de NRF2/NFκB e lipoperoxidação, que resultou em morte apoptótica tardia em ambas as linhagens, e isso pode ser um possível efeito pró-oxidante envolvido na citotoxicidade das moléculas de flavonóides.

Portanto, como não há estudos com esse composto em relação às linhagens HeLa e SiHa de carcinoma cervical, surgiu o interesse em investigar a ação antiproliferativa e antitumoral da *trans*-chalcona, um potente antioxidante com propriedades anti-neoplásicas menos tóxicas do que as atuais existentes confirmadas por vários estudos em diversos tipos de câncer.

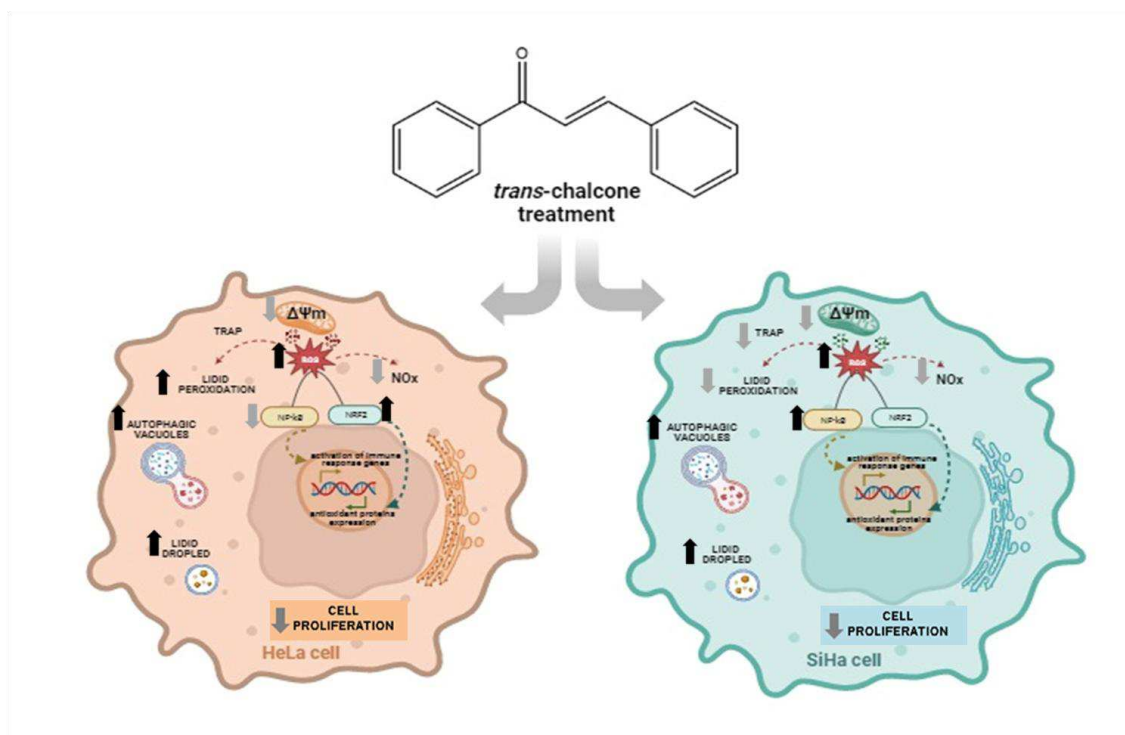


Figura 13: Resumo gráfico das linhagens HeLa e SiHa (Autor).

6 REFERÊNCIAS

Adurthi S., Krishna S., Mukherjee G., Bafna UD, Devi U., Jayshree RS. **Células T Reguladoras em um Espectro de Lesões Cervicais Induzidas por HPV: Cervicite, Neoplasia Intraepitelial Cervical e Carcinoma de Células Escamosas.** Sou. J. Reprod. imunol. 2008, 60 :55–65. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00590.x.

Akiyama S. **HeLa cell lines.** Methods Enzymol. 1987, 151:38-50. doi: 10.1016/s0076-6879(87)51007-2. PMID: 3431450.

Akki R., Siracusa R., Morabito R., Remigante A., Campolo M., Errami M., La Spada G., Cuzzocrea S., Marino A. **Neuronal-like differentiated SH-SY5Y cells adaptation to a mild and transient H₂O₂-induced oxidative stress.** Cell Biochem. Funct. 2018, 36, 56–64. Aksöz BE & Ertan R. **Chemical and structural properties of chalcones I.** FABAD Journal of Pharmaceutical Science, Ankara, v. 36, p. 223-242, 2011.

Aksöz BE & Ertan R. **Chemical and structural properties of chalcones II.** FABAD Journal of Pharmaceutical Science, Ankara, v. 37, n. 4. p. 223-242, 2012.

Alharthi S, Popat A, Ziora ZM, Moyle PM. **Sortase A Inhibitor Protein Nanoparticle Formulations Demonstrate Antibacterial Synergy When Combined with Antimicrobial Peptides.** Molecules. 2023 Feb 24;28(5):2114. doi: 10.3390/molecules28052114. PMID: 36903360; PMCID: PMC10004702.

Alharthy RD, Rashid F, Ashraf A, Shafiq Z, Ford S, Al-Rashida M, Yaqub M, Iqbal J. **Pyrazole derivatives of pyridine and naphthyridine as proapoptotic agents in cervical and breast cancer cells.** Sci Rep. 2023 Apr 1;13(1):5370. doi: 10.1038/s41598-023-32489-5. PMID: 37005457; PMCID: PMC10067956.

Al-Saraireh YM, Alshammari F., Youssef AMM, Al-Sarayra YM, Al-Saraireh RA, Al-Muhaisen GH, Al-Mahdy YS, Al-Kharabsheh AM, Abufraijeh SM, Alrawashdeh HM. **A expressão do citocromo 4Z1 está correlacionada com Mau Prognóstico em Pacientes com Câncer Cervical.** Atual Oncol. Rep. 2021, 28 :3573–3584. doi: 10.3390/curroncol28050306.

American Cancer Society. Cervical cancer: Prevention and early detection.2023. <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/what-is-cervical-cancer.html>.

Arfin S., Jha NK, Jha SK, Kesari KK, Ruokolainen J, Roychoudhury S, Rathi B, Kumar D. Oxidative **Stress in Cancer Cell Metabolism. Antioxidants (Basel).** 2021. Apr 22,10(5):642. doi: 10.3390/antiox10050642. PMID: 33922139, PMCID: PMC8143540.

Baeriswyl V., Christofori G. **The angiogenic switch in carcinogenesis.** *Seminars in Cancer Biology*, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 329–337, 2009.

Baird L, Yamamoto M. **The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway.** *Mol Cell Biol.* 2020 Jun 15;40(13):e00099-20. doi: 10.1128/MCB.00099-20. PMID: 32284348; PMCID: PMC7296212.

Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur GK. **Molecular Events in Cervical Cancer Development.** *Medicina (Kaunas).* 2019, Jul 17,55(7):384. doi: 10.3390/medicina55070384. PMID: 31319555, PMCID: PMC6681523.

Baseman JG, Koutsky LA. **A Epidemiologia das Infecções por Papilomavírus Humano.** *J. Clin. Virol.* 2005, 32 :16–24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008.

Batovska DI, Todorova, IT. **Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones.** *Curr. Clin. Pharmacol.*, 2010, 5, 1-29.

Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. **Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future.** *Sex Med Rev.* 2020, Jan,8(1):28-37. doi: 10.1016/j.sxmr.2019.09.005. Epub 2019 Nov 30. PMID: 31791846.

Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A. **Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma.** *Clin Chim Acta.* 2007, Jan.375(1-2):119-23. doi: 10.1016/j.cca.2006.06.028. Epub 2006 Jun 29. PMID: 16889762.

Benzie IF. **Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences.** *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1996 May;47(3):233–61. 9.

Berraondo P., Minute L., Ajona D., Corrales L., Melero I., Pio R. **Mediadores imunes inatos no câncer: entre defesa e resistência.** *imunol. Rev.* 2016, 274 :290–306. doi: 10.1111/imr.12464.

Bhardwaj M, e outros. A peroxidação lipídica lisossômica regula a imunidade tumoral. *J Clin Invest.* 2023; 133 (8):e164596. doi: 10.1172/JCI164596.

Bhojwani H., Begwani K., Bhor V., Bedi P., Balasinor N, Raut S., Joshi U. **Synthesis and biological evaluation of benzamide-chalcone hybrids as potential c-Met kinase and COX-2 inhibitors.** *Arch Pharm (Weinheim).* 2023, May,356(5):e2200405. doi: 10.1002/ardp.202200405. Epub 2023 Feb 8. PMID: 36752183.

Binder S., Hosikova B., Mala Z., Zarska L., Kolarova H. **Effect of CIAIPcS(2) photodynamic and sonodynamic therapy on HeLa cells.** *Physiol Res* 2019; 68(Suppl 4):S467-S474. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934374>.

Bordin, D. L.; Lima, M.; Lenz, G.; Saffi, J.; Meira, L. B.; Mésange, P.; Soares, D. G.; Larsen, A. K.; Escargueil, A. E.; Henriques, J. A. **DNA alkylation damage**

and autophagy induction. Mutation Research, Amsterdam, pii: S1383-5742(13)00048-3. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.07.001, 2013.

Borges BES, Brito EB, Fuzii HT, Baltazar CS, Sá AB, Silva CIMD, Santos GFS, Pinheiro MDCN. **Human papillomavirus infection and cervical cancer precursor lesions in women living by Amazon rivers: investigation of relations with markers of oxidative stress.** Einstein (Sao Paulo). 2018,16(3):eAO4190. doi: 10.1590/s1679-45082018ao4190. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30110067, PMCID: PMC6080701.

Bortolotto, LFB., Barbosa, FR, Silva, G., Bitencourt, TA, Belebony, RO, Baek, SJ, Marins, M., Fachin, AL. **Cytotoxicity of trans-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest.** Biomed. 2017.

Bosch FX, Burchell NA, Schiffman M., Giuliano AR, de Sanjose S., Bruni L., Tortolero-Luna G., Kjaer SK, Muñoz N. **Epidemiologia e história natural de infecções por papilomavírus humano e implicações específicas do tipo em Neoplasia Cervical.** Vacina. 2008, 26 :K1–K16. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.064.

Bosch FX, Sanjose S. **Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality.** J Natl Cancer Inst Monogr, n.31, p.3-13. 2003.

Bosch M, Parton RG, Pol A (2020) **Lipid droplets, bioenergetic fluxes, and metabolic flexibility.** Semin Cell Dev Biol. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.02.010>.

Brambs CE, Höhn AK, Klagges S., Gläser A., Taubenheim S., Dornhöfer N., Einenkel J., Hiller GGR, Horn LC. **Clinico-pathologic characteristics and prognostic factors of ovarian carcinoma with different histologic subtypes - A benchmark analysis of 482 cases.** Pathology - Research and Practice, Volume 233, 2022, 153859, ISSN 0344-0338, <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153859>.

Branca, M., Giorgi, C., Ciotti, M., et al., 2006. **Upregulation of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer.** Diagn. Cytopathol. 34 (8), 555–563.

Brankovic I., Verdonk P., Klinge I. **Applying a gender lens on human papillomavirus infection: cervical cancer screening, HPV DNA testing, and HPV vaccination.** Int. J. Equity Health 12, 14, 2013.

Bray F. et al. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

Bukhari SNA, Jasamai M, Jantan I. **Synthesis and Biological Evaluation of Chalcone Derivatives**. Mini Rev Med Chem., Malásia, v.12, n.13, p. 1394-1403, Nov.2012.

Caballero D, Voituriez R, Riveline D. **Protrusion fluctuations direct cell motion**. Biophys J. 2014 Jul 1;107(1):34-42. doi: 10.1016/j.bpj.2014.05.002. PMID: 24988339; PMCID: PMC4119278

Caldas, C. **Vida, morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa**. Cienc. Cult., São Paulo, v. 62, n. 2, p. 17-18, 2010. Available from <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000200008&lng=en&nrm=iso>. Access on 11 Sept. 2023.

Castellsague X., Munoz N. **Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis: role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking**. J Natl Cancer Inst Monogr, n.31, p.20-28. 2003.

Catalá A. **Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions**. Chem. Phys. Lipids. 2009 Jan;157(1):1–11.

Cesarin-Sobrinho, D., Netto-Ferreira, JC, Braz-Filho, R. **Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona**. Química Nova, 24(5), 604–611, 2001. doi:10.1590/S0100-40422001000500006.

Cheng ZJ, Lin CN, Hwang TL, Teng CM. **Brousochalcone A, a potent antioxidant and effective suppressor of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-activated macrophages**. Biochem. Pharmacol., 61, 939–946, 2001.

Clifford G., Franceschi S., Diaz M., Muñoz N., Villa LL. **Capítulo 3: Distribuição dos tipos de HPV em mulheres com e sem doenças neoplásicas cervicais**. Vacina. 2006, 24 :26–34. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.026.

Cohen PA, Jhingran A., Oaknin A, Denny L. **Cervical cancer**. Lancet. 2019 Jan. 12, 393(10167):169-182. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32470-X. PMID: 30638582.

Concato VM., Tomiotto-Pellissier F., Silva TF, Gonçalves MD, Bortoleti BTS, Detoni MB., ...Pavanelli WR. (2020). **3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'diol induces cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells**. Chemico-Biological Interactions, 326, 109133. doi:10.1016/j.cbi.2020.109133.

Costantini E., Porena M., Lazzeri M., Mearini L., Bini V., Zucchi A. **Mudanças na função sexual feminina após reparo de prolapso de órgãos pélvicos: papel da histerectomia**. Int Urogynecol J Assoalho Pélvico Disfunto. 2013.

Custodio JMF, Guimarães-Neto JJA, Awad R., Queiroz JE, Verde GMV, Mottin, M., Neves BJ, Andrade CH, Aquino GLB, Valverde C., Osório FAP, Baseia B.,

Napolitano HB. **Molecular modelling and optical properties of a novel fluorinated chalcone.** Arabian Journal of Chemistry, 2018, S1878535218302326-. doi:10.1016/j.arabjc.2018.11.010 .

Damazio RG, Zanatta AP, Cazarolli LH, Chiaradia LD, Mascarello A., Ricardo Nunes J., Yunes RA, Silva FRMB. **Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones.** 45(4), 1332–1337, 2010. doi:10.1016/j.ejmech.2009.12.017.

De Jaeghere EA, Tuyaerts S, van Nuffel AM, et al. 2022-RA-638-ESGO **Pembrolizumab with multimodal immunomodulation in chemotherapy-pretreated cervical, endometrial, and uterine cancer: the PRIMMO phase II trial.** International Journal of Gynecologic Cancer, 2022, **32**: A187-A188.

de Vos Van Steenwijk PJ, Ramwadhoebe TH, Goedemans R., Doorduijn EM, van Ham JJ, Gorter A., van Hall T., Kuijjer ML, van Poelgeest MIE, van der Burg SH, et al. **Células mielóides CD14-positivas infiltrantes tumorais e células T CD8-positivas prolongam a sobrevida em pacientes com carcinoma cervical.** Int. J. Câncer. 2013, 133 :2884–2894. doi: 10.1002/ijc.28309.

Derbie A, Mekonnen D, Nibret E, Misgan E, Maier M, Woldeamanuel Y, Abebe T. **Cervical cancer in Ethiopia: a review of the literature.** Cancer Causes Control. 2023 Jan;34(1):1-11. doi: 10.1007/s10552-022-01638-y. Epub 2022 Oct 15. PMID: 36242682.

Di Meo S., Venditti P. **Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants.** Med. Oxidativo. Célula. Longev. 2020, 9829176. doi: 10.1155/2020/9829176.

Dimmock JR, Elias DW, Beazely MA, Kandepu NM. **Bioactivities of chalcones.** Curr. Med. Chem., 1999, 6, 1125-1149.

Disis ML, 2010. **Immune regulation of cancer.** J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 28 (29), 4531–4538.

Duenas-Gonzalez A. **Combinational therapies for the treatment of advanced cervical cancer.** Expert Opin Pharmacother. 2023. Jan, 24(1):73-81. doi: 10.1080/14656566.2022.2084689. Epub 2022 Jun 8. PMID: 35653267.

Duru Birgi, S., Gultekin M., Yuce D. & Yildiz F. **Definitive Treatment for Locally Advanced Cervical Cancer: A Retrospective Analysis from A Single Institution.** 2018.

Eddarir S., Cotelle N., Bakkoura Y., Rolando C. **An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction.** Tetrahedron Letters, v.44, p.5359–5363, May. 2003.

El-Hussein A., Manoto SL, Ombinda-Lemboumba S., Alrowaili ZA, Mthunzi-Kufa P. **A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung**

cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem* 2021;21:149-161. <https://doi.org/10.2174/18715206MTA1uNjQp3>.

Fan H, He Y, Xiang J, Zhou J, Wan X, You J, Du K, Li Y, Cui L, Wang Y, Zhang C, Bu Y, Lei Y. **ROS generation attenuates the anti-cancer effect of CPX on cervical cancer cells by inducing autophagy and inhibiting glycolysis.** *Redox Biol.* 2022 Jul;53:102339. doi: 10.1016/j.redox.2022.102339. Epub 2022 May 17. PMID: 35636017; PMCID: PMC9144037.

Fernández LP, Gómez de Cedrón M., Ramírez de Molina A. **Alterações do Metabolismo Lipídico no Câncer: Implicações no Prognóstico e Tratamento.** *Frente. Oncol.* 2020; 10 :577420.

García-Chico C, López-Ortiz S, Peñín-Grandes S, Pinto-Fraga J, Valenzuela PL, Emanuele E, Ceci C, Graziani G, Fiuza-Luces C, Lista S, Lucia A, Santos-Lozano A. **Physical Exercise and the Hallmarks of Breast Cancer: A Narrative Review.** *Cancers (Basel).* 2023 Jan 3;15(1):324. doi: 10.3390/cancers15010324. PMID: 36612320; PMCID: PMC9818971.

Gavinski K, DiNardo D. **Cervical Cancer Screening.** *Med Clin North Am.* 2023 Mar;107(2):259-269. doi: 10.1016/j.mcna.2022.10.006. Epub 2022. Dec 26. PMID: 36759096.

Gey GO, Coffman WD. & Kubicek MT.. **Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.** *Cancer research*, v. 12, p. 264-265, 1952.

Global cancer observatory -cancer fact sheets. **International Agency for Research on Cancer.** Available from: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> (Accessed August 31, 2022).

GLOBOCAN. **Dados Globais sobre câncer.** 2020. Disponível em: <[://www.uicc.org/new-globalcancer-data-globocan-2020](http://www.uicc.org/new-globalcancer-data-globocan-2020)>. Acesso em: 08 de jan. 2019.

GLOBOCAN. **Dados Globais sobre câncer.** 2022. Disponível em: <<https://www.uicc.org/new-globalcancer-data-globocan-2022>>. >. Acesso em: 10 de fev. 2022.

Golmohammadzadeh M, Sexton DL, Parmar S, Tocheva EI. **Advanced imaging techniques: microscopy.** *Adv Appl Microbiol.* 2023;122:1-25. doi: 10.1016/bs.aambs.2023.01.001. Epub 2023 Feb 27. PMID: 37085191.

Gomez VM, Castillo VE. **Current perspectives in cervical cancer.** *Ginecol Obstet Mex*, v.72, n.1, p.29-38, 2004.

Gonzalez Flecha BS, Repetto M., Evelson P., Boveris A. **Inhibition of microsomal lipid peroxidation by α -tocopherol and α -tocopherol acetate.** *Xenobiotica*, v. 21, n. 8, p. 1013-1022, 1991.

Gorvel L., Olive D. **Tumor associated macrophage in HPV⁺ tumors: Between immunosuppression and inflammation.** *Semin Immunol.* 2023. Jan;65:101671. doi: 10.1016/j.smim.2022.101671. Epub 2022 Nov 29. PMID: 36459926.

Gravitt PE. **Os Desconhecidos Conhecidos da História Natural do HPV.** *J. Clin. Investigar.* 2011, 121: 4593–4599. doi: 10.1172/JCI57149.

Gunasekaran V., Yuvakkumar R., Ganesan R., Palapetta SC, Gurusamy H. **Biological evaluation of polycyclic chalcone based acrylamides in human MCF-7 and HeLa cancer cell lines.** *Environ Res.* 2023 Apr 1;222:115395. doi: 10.1016/j.envres.2023.115395. Epub 2023. Jan 31. PMID: 36731601.

Guštin E., Jarc E., Kump A., Petan T. **Lipid Droplet Formation in HeLa Cervical Cancer Cells Depends on Cell Density and the Concentration of Exogenous Unsaturated Fatty Acids.** *Acta Chim Slov.* 2017 Sep;64(3):549-554. doi: 10.17344/acsi.2016.2908. PMID: 28862289.

Hagerling C., Casbon AJ, Werb Z. **Equilibrando o Sistema Imune Inato no Desenvolvimento de Tumores.** *Trends Cell Biol.* 2015, 25: 214–220. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.001.

Halliwell B. & Gutteridge JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Fifth Edition (Oxford University Press), 2015.

Hanahan D. & Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell.* 2011, Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

Hänggi K, Ruffell B. **Cell death, therapeutics, and the immune response in cancer.** *Trends Cancer.* 2023 May;9(5):381-396. doi: 10.1016/j.trecan.2023.02.001. Epub 2023 Feb 24. PMID: 36841748; PMCID: PMC10121860.

Hayden MS, West AP, Ghosh S. **NF- κ B and the immune response.** *Oncogene.* 2006;25:6758–80.

Hayes JD & Dinkova-Kostova AT. **The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism.** *Trends Biochem. Sci.* 39, 199–218, 2014.

Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. **Oxidative Stress in Cancer.** *Cancer Cell*, S1535610820302749, 2020. doi:10.1016/j.ccell.2020.06.001.

He M., Wang M., Xu T., Zhang M., Dai H., Wang C., Ding D., Zhong Z. **Reactive oxygen species-powered cancer immunotherapy: Current status and challenges.** *J Control Release.* 2023 Apr;356:623-648. doi: 10.1016/j.jconrel.2023.02.040. Epub 2023 Mar 21. PMID: 36868519.

He L., Wu L., Su G., Wei W., Liang L., Han L., Kebria M., Liu P., Chen C., Yu Y., Zhong M., Wang W. **The efficacy of neoadjuvant chemotherapy in**

different histological types of cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 134(2), 419–425, 2014. doi:10.1016/j.ygyno.2014.06.001.

Hebner CM, Laimins LA. **Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity.** *Rev Med Virol*. 2006 Mar-Apr,16(2):83-97. doi: 10.1002/rmv.488. PMID: 16287204.

Heidari MR, Foroumadi A., Amirabadi A., Samzadeh-Kermani A., Azimzadeh B S, Eskandarizadeh A. **Evaluation of antiinflammatory and analgesic activity of a novel rigid 3,4-dihydroxy chalcone in mice.** *Annals of the New York academy of sciences* 2009, 1171, 399.

Higuchi Y. **Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress.** *Biochemical Pharmacology*, Volume 66, Issue 8, 2003, Pages 1527-1535, ISSN 0006-2952. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00508-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00508-2).

Hoesel B., Schmid JA. **A complexidade da sinalização NF- κ B na inflamação e no câncer.** *Câncer Molecular* . 2013; 12 (1): pág. 86. doi: 10.1186/1476-4598-12-86.

Hojman P., Gehl J., Christensen JF, Pedersen BK **Mecanismos Moleculares que Ligam o Exercício à Prevenção e Tratamento do Câncer.** *Célula Metab.* 2018; 27 :10–21. doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.015.

Horta B., Freitas-Silva J., Silva J., Dias F., Teixeira AL, Medeiros R., Cidade H., Pinto M., Cerqueira F. **Antitumor effect of chalcone derivatives against human prostate (LNCaP and PC-3), cervix HPV-positive (HeLa) and lymphocyte (Jurkat) cell lines and their effect on macrophage functions.** *Molecules*. 2023. Feb 25,28(5):2159. doi: 10.3390/molecules28052159. PMID: 36903405, PMCID: PMC10004497.

Hu D., Zhang Z., Zhang Y., Huang K., Li X. **Identification of immune related molecular subtypes and prognosis model for predicting prognosis, drug resistance in cervical squamous cell carcinoma.** *Front Genet*. 2023. Mar 17,14:1137995. doi: 10.3389/fgene.2023.1137995. PMID: 37007965, PMCID: PMC10063826.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 2023. **Causas e prevenção do câncer.** <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer>>. Acesso em: 02 mai.2023.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Atlas da mortalidade. Rio de Janeiro: INCA, 2021b. 1 base de dados. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade> Acesso em: 18 jan 2021.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Detecção precoce do câncer. Rio de Janeiro : INCA, 2021a.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Estimativa 2020: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//>>. Acesso em: 12 maio 2021.

International Agency for Research on Cancer. **Global cancer observatory - cancer fact sheets**. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> (accessed August 31, 2022).

International Agency for Research on Cancer. **Global cancer observatory - cancer fact sheets**. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> (accessed August 31, 2022).

Islam MR, Rahman MM, Dhar PS, Nowrin FT, Sultana N., Akter M, Rauf A., Khalil AA, Gianoncelli A., Ribaud G. **The Role of Natural and Semi-Synthetic Compounds in Ovarian Cancer: Updates on Mechanisms of Action, Current Trends and Perspectives**. *Molecules*. 2023. Feb 22,28(5):2070. doi: 10.3390/molecules28052070. PMID: 36903316, PMCID: PMC10004182.

Iwata S., Nishino T., Inoue H., Nagata N., Satomi Y., Nishino H., Shibata S. **Antitumorigenic activities of chalcones (II)**. Photo-isomerization of chalcones and the correlation with their biological activities. *Biol Pharm Bull*, Japão, v.20, n.12, p.1266-70, Dec. 1997.

Jain KK. **Personalized Immuno-Oncology**. *Med Princ Pract*. 2021,30(1):1-16. doi: 10.1159/000511107. Epub 2020. Aug 25. PMID: 32841942, PMCID: PMC7923844.

Jain MA, Limaiem F. **Cervical Squamous Cell Carcinoma**. 2023 Jan 1. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 32644501.

James MA, Lee JH, Klingelutz AJ. **Human papillomavirus type 16 E6 activates NF- κ B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner**. *J Virol*. 2006;80:5301–7.

Jarc E., Petan T. **Uma torção de FATE: gotículas lipídicas e mediadores lipídicos inflamatórios**. *Biochimie* 169:69–87, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.016>.

Jayasinghe L., Balasooriya BAIS, Padmini WC, Hara N., Fujimoto Y. **Geranyl chalcone derivatives with antifungal and radical scavenging properties from the leaves of *Artocarpus nobilis***. *Phytochemistry* 2004, 65, 1287.

Jayshree RS, Sreenivas A., Tessa M., Krishna S. **Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis**. *Indian J Med Res*. 2009. Sep,130(3):286-95. PMID: 19901438.

Jiang Y., Chen M., Nie H., Yuan Y. **PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations.** Hum Vaccin Immunother. 2019,15(5):1111-1122. doi: 10.1080/21645515.2019.1571892. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30888929, PMCID: PMC6605868.

Johnson CA, James D., Marzan A., Armaos M. **Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management.** Semin Oncol Nurs. 2019. Apr, 35(2):166-174. doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.003. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30878194.

Jones HWJr, McKusick VA, Harper PS, Wuu KD. **A célula HeLa e uma reavaliação de sua origem.** Obstetrícia e Ginecologia 38 : 945–959, 1971.

Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J., Kohli DV. **Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review.** Curr Med Chem. 2012;19(2):209-25. doi: 10.2174/092986712803414132. PMID: 22320299.

Kalliala I., Athanasiou A., Veroniki AA, Salanti G., Efthimiou O., Raftis N., Bowden S., Paraskevaidi M., Aro K., Arbyn M., Bennett P., Nieminen P., Paraskevaidis E., Kyrgiou M. **Incidência e mortalidade por câncer cervical e outras malignidades após o tratamento da neoplasia intraepitelial cervical: Uma revisão sistemática e meta-análise da literatura.** Ana. Oncol. 31, 213–227, 2020.

Karimi-Sales E., Mohaddes G., Alipour MR. **Chalcones as putative hepatoprotective agents: Preclinical evidence and molecular mechanisms.** Pharmacological Research, v. 129, p. 177–187, 2017.

Karkhaneh L., Yaghmaei P., Parivar K., Sadeghizadeh M., Ebrahim-Habibi A. **Effect of trans-chalcone on atheroma plaque formation, liver fibrosis 4 and adiponectin gene expression in cholesterol-fed NMRI mice.** Pharmacological Reports, Mar. 2016.

Kato D., Yaguchi T., Iwata T., et al. **Perspectivas para imunoterapia de combinação personalizada para tumores sólidos com base em terapias celulares adotivas e terapias de bloqueio de ponto de controle imunológico.** Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi . 2017, 40 :68-77. 10.2177/jsci.40.68.

Khieu M., Butler S. **Lesão intraepitelial escamosa de alto grau.** Definições. Publicação StatPearls, Treasure Island, FL, EUA: 2020.

Kim JH, Kang DM, Cho YJ, Hyun JW, Ahn MJ. **Medicarpin Increases Antioxidant Genes by Inducing NRF2 Transcriptional Level in HeLa Cells.** Antioxidants (Basel). 2022. Feb 18,11(2):421. doi: 10.3390/antiox11020421. PMID: 35204303, PMCID: PMC8869525.

Kitagawa R., Katsumata N., Shibata T., et al. **Paclitaxel Plus Carboplatin Versus Paclitaxel Plus Cisplatin in Metastatic or Recurrent Cervical**

Cancer: The Open-Label Randomized Phase III Trial JCOG0505. J Clin Oncol 2015;33:2129-2135. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732161>.

Kojima S., Kawana K., Tomio K., Yamashita A., Taguchi A., Miura S., Adachi K., Nagamatsu T., Nagasaka K., Matsumoto Y., et al. **A prevalência de células T reguladoras cervicais na neoplasia intraepitelial cervical relacionada ao HPV (NIC) correlaciona-se inversamente com a regressão espontânea da NIC.** Sou. J. Reprod. imunol. 2013, 69 :134–141. doi: 10.1111/aji.12030.

Komoto TT, Lee J., Lertpatipanpong P. et al. **Trans-chalcone suppresses tumor growth mediated at least in part by the induction of heme oxygenase-1 in breast cancer.** *Toxicol Res.* 37, 485–493 (2021). <https://doi.org/10.1007/s43188-021-00089-y>.

Kuete V., Mbaveng AT, Zeino M., Fozing CD, Ngameni B., Kapche GDWF, Ngadjui BT. **Efferth, T. Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells.** *Phytomedicine* 2015, 22, 1096.

Kumar A., Girisa S., Alqahtani MS, Abbas M., Hegde M., Sethi G., Kunnumakkara AB. **Targeting Autophagy Using Long Non-Coding RNAs (LncRNAs): New Landscapes in the Arena of Cancer Therapeutics.** *Cells.* 2023 Mar 6;12(5):810. doi: 10.3390/cells12050810. PMID: 36899946; PMCID: PMC10000689.

Kumar A., Jain S., Chauhan S., Aggarwal S., Saini D. **Novel hybrids of quinoline with pyrazolylchalcones as potential antimalarial agents: Synthesis, biological evaluation, molecular docking and ADME prediction.** *Chem Biol Interact.* 2023. Mar 1,373:110379. doi: 10.1016/j.cbi.2023.110379. Epub 2023 Feb 3. PMID: 36738914.

Kwok ST, Chan KKL, Tse KY, Chu MMY, Lau LSK, Ngan HYS, Ngu SF. **Outcome after loop electrosurgical excision procedure for cervical high-grade squamous intraepithelial lesion.** *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2023. Jan,62(1):45-49. doi: 10.1016/j.tjog.2022.10.004. PMID: 36720549.

Kwon T., Bak Y., Ham SY, Yu DY, Yoon DY. **A1E reduces stemness and self-renewal in HPV 16-positive cervical cancer stem cells.** *BMC Complement Altern Med.* 2016. Feb 2,16:42. doi: 10.1186/s12906-016-1013-4. PMID: 26832364, PMCID: PMC4735966.

Kyrgiou M., Athanasiou A., Paraskevaidi M., Mitra A., Kalliala I., Martin-Hirsch P., Paraskevaidis E. **Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis.** *bmj,* 354, 2016.

Łaska G., Sieniawska E., Maciejewska-Turska M., Świątek Ł., Pasco DS, Balachandran P. **Pulsatilla vulgaris Inhibits Cancer Proliferation in**

Signaling Pathways of 12 Reporter Genes. Int J Mol Sci. 2023. Jan 6,24(2):1139. doi: 10.3390/ijms24021139. PMID: 36674653, PMCID: PMC9860614.

Leite KRM, Pimenta R., Canavez J., Canavez F., de Souza FR, Vara L., Estivallet C., Camara-Lopes LH. **HPV Genotype Prevalence and Success of Vaccination to Prevent Cervical Cancer.** Acta Cytol. 2020;64(5):420-424. doi: 10.1159/000506725. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32235115.

Lemaire J., Larrue R., Perrais M., Cauffiez C., Pottier N. **Aspects fondamentaux du développement tumoral [Fundamental aspects of oncogenesis].** Bull Cancer. 2020. Nov,107(11):1148-1160. French. doi: 10.1016/j.bulcan.2020.08.004. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33039132.

Lemos LG, Victorino VJ, Herrera AC, Aranome AM, Cecchini AL, Simão AN, Panis C, Cecchini R. **Trastuzumab-based chemotherapy modulates systemic redox homeostasis in women with HER2-positive breast cancer.** Int Immunopharmacol. 2015. Jul,27(1):8- 14.

Lima DCS, do Vale CR, Véras JH, Bernardes A., Pérez CN, Chen-Chen L. **Absence of genotoxic effects of the chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)- prop-2-en-1-one) and its potential chemoprevention against DNA damage using in vitro and in vivo assays.** Plos one 2017, 12, e0171224.

Lima, ES, Abdalla DSP. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** Rev Bras Ciên Farmac. 37 (3): 293-303, 2001.

Limaiem F., Mahdy H. **Cervical Clear Cell Carcinoma.** 2023 Jan 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Jan–. PMID: 31536198.

Liou GY, Storz P. **Reactive oxygen species in cancer.** Free Radic Res. 2010. May,44(5):479-96. doi: 10.3109/10715761003667554. PMID: 20370557, PMCID: PMC3880197.

Lipinski CA, Lombardo F., Dominy BW, Feeney PJ. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** Adv. Drug Deliv. Rev. 23, 3–25, 1997. doi:10.1016/S0169- 409X(96)00423-1.

Lipinski CA. **Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution.** Drug Discov. Today Technol. 1, 337–341, 2004. doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007.

Liu C., Zhang M., Yan X., Ni Y., Gong Y., Wang C., Zhang X., Wan L., Yang H., Ge C., Li Y., Zou W., Huang R., Li X., Sun B., Liu B., Yue J., Yu J. **Single-cell dissection of cellular and molecular features underlying human cervical squamous cell carcinoma initiation and progression.** Sci Adv. 2023. Jan

27,9(4):eadd8977. doi: 10.1126/sciadv.add8977. Epub 2023 Jan 27. PMID: 36706185, PMCID: PMC9882988.

Liu L, Wang K, Liu J, Wei Y, Liu W, Zhang P, Hu J, Li B. **Starvation effect on the morphology of microvilli in HeLa cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2019 Jul 5;514(4):1238-1243. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.073. Epub 2019 May 17. PMID: 31109644.

Liu X, Xiao M, Zhang L, Li L, Zhu G, Shen E, Lv M, Lu X, Sun Z. **The m6A methyltransferase METTL14 inhibits the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.** J Clin Lab Anal. 2021 Mar;35(3):e23655. doi: 10.1002/jcla.23655. Epub 2020 Dec 12. PMID: 33314339; PMCID: PMC7957981.

Löhmussaar K., Oka R., Espejo Valle-Inclan J., Smits MHH, Wardak H., Korving J., Begthel H., Proost N., van de Ven M., Kranenburg OW, Jonges TGN, Zweemer RP, Veersema S., van Boxtel R., Clevers H. **Patient-derived organoids model cervical tissue dynamics and viral oncogenesis in cervical cancer.** Cell Stem Cell. 2021. Aug 5,28(8):1380-1396.e6. doi: 10.1016/j.stem.2021.03.012. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33852917.

Longworth MS, Laimins LA. **Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia.** Microbiol Mol Biol Rev. 2004. Jun,68(2):362-72. doi: 10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004. PMID: 15187189, PMCID: PMC419925.

Lu Y, Chen Y, Zhang Z, Li M, Chen X, Tu K, Li L. **HPV16 E6 promotes cell proliferation, migration, and invasion of human cervical cancer cells by elevating both EMT and stemness characteristics.** Cell Biol Int. 2022 Apr;46(4):599-610. doi: 10.1002/cbin.11756. Epub 2022 Jan 15. PMID: 34957655.

Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. **Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination.** Arch Pathol Lab Med. 2009. Sep,133(9):1463-7. doi: 10.5858/133.9.1463. PMID: 19722756.

Lv H., Wang C., Fang T., Li T., Lv G., Han Q., Yang W., Wang H. **Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2.** NPJ Precis Oncol 2018; 2:1. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0044-8>.

Ma X., Fang J., Zhang L., Huang Y., Shen H., Ma X., Zhang S., Zhang B. **Efficacy and safety of adjuvant chemotherapy for locally advanced cervical cancer: A systematic review and meta-analysis.** Crit Rev Oncol Hematol. 2023. Apr,184:103953. doi: 10.1016/j.critrevonc.2023.103953. Epub 2023 Mar 6. PMID: 36889613.

Maglennon GA, McIntosh P., Doorbar J. **A persistência do DNA viral na camada basal epitelial sugere um modelo para a latência do papilomavírus após a regressão imune.** Virologia. 2011, 414 :153–163. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.019.

Mahapatra DK, Bharti SK, Asati V. **Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives.** Eur J Med Chem. 2015. Jun 15,98:69-114. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.05.004. Epub 2015 May 14. PMID: 26005917.

Manders DB, Kehoe SM, Miller DS, Lea JS, Richardson DL. **Third-line Salvage Chemotherapy for Recurrent Carcinoma of the Cervix is Associated With Minimal Response Rate and High Toxicity.** Am J Clin Oncol. 2018. Aug,41(8):797-801. doi: 10.1097/COC.0000000000000372. PMID: 28225444.

Manju V., Balasubramanian V., Nalini N. **Oxidative stress and tumor markers in cervical cancer patients.** J Biochem Mol Biol Biophys. 2002. Dec,6(6):387-90. doi: 10.1080/1025814021000036115. PMID: 14972792.

Marinho HS, Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F. **Detecção de peróxido de hidrogênio, sinalização e regulação de fatores de transcrição Redox.** Biol., 2, pp. 535 – 562, 2014.

Markandeywar TS, Narang RK, Singh D, Rai VK. Targeted Delivery of Doxorubicin as a Potential Chemotherapeutic Agent. Curr Drug Deliv. 2023;20(7):904-918. doi: 10.2174/1567201819666220714101952. PMID: 35838220.

Martinez I., Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA. **Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells.** Oncogene. 2008. Apr 17,27(18):2575-82. doi: 10.1038/sj.onc.1210919. Epub 2007 Nov 12. PMID: 17998940, PMCID: PMC2447163.

Martínez-Reyes I., Chandel NS. **Cancer metabolism: looking forward.** Nat Rev Cancer. 2021 Oct,21(10):669-680. doi: 10.1038/s41568-021-00378-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34272515.

Martins WK, Santos NF, Rocha CS, Bacellar IOL, Tsubone TM, Viotto AC, Matsukuma AY, Abrantes ABP, Siani P., Dias LG, Baptista MS. **Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death.** Autophagy 15, 259–279, 2019. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1515609>.

Mateeva N., Eyunni SVK, Redda KK, Ononuju U., Hansberry TD, Aikens C., Nag A. **Functional evaluation of synthetic flavonoids and chalcones for potential antiviral and anticancer properties.** Bioorganic Med. Chem. Lett. 27, 2350–2356, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.034>.

McCluggage WG, Singh N., Gilks CB. **Key changes to the World Health Organization (WHO) classification of female genital tumours introduced in the 5th edition (2020).** Histopathology. 2022. Apr,80(5):762-778. doi: 10.1111/his.14609. Epub 2022 Feb 20. PMID: 34996131.

Megías-Vericat JE, Montesinos P, Herrero MJ, Moscardó F, Bosó V, Rojas L, Martínez-Cuadrón D, ET AL. **Impact of NADPH oxidase functional**

polymorphisms in acute myeloid leukemia induction chemotherapy. Pharmacogenomics J 2018; 18:301-307. <https://doi.org/10.1038/tpj.2017.19>.

Meissner JD. **Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines.** J Gen Virol. 1999. Jul;80 (Pt 7):1725-1733. doi: 10.1099/0022-1317-80-7-1725. PMID: 10423141.

Mencalha A., Victorino VJ, Cecchini R., Panis C. **Mapping oxidative changes in breast cancer: understanding the basic to reach the clinics.** Anticancer Res 34: 1127-1140, 2014.

Meng Q., Ding B., Ma P., Lin J. **Interrelation between Programmed Cell Death and Immunogenic Cell Death: Take Antitumor Nanodrug as an Example.** Small Methods. 2023 May;7(5):e2201406. doi: 10.1002/smt.202201406. Epub 2023 Jan 27. PMID: 36707416.

Miranda-Sapla MM, Tomiotto-Pellissier F., Assolini JP, Carloto ACM, Bortoleti BTDS, Gonçalves MD, Tavares ER, Rodrigues JHDS, Simão ANC, Yamauchi LM, Nakamura CV, Verri WA Jr, Costa IN, Conchon-Costa I., Pavanelli WR. **trans-Chalcone modulates Leishmania amazonensis infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability.** Eur J Pharmacol. 2019. Jun 15;853:275-288. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.03.049. Epub 2019 Apr 6. PMID: 30965057.

Moloney JN, Cotter TG. **ROS signalling in the biology of cancer.** Semin Cell Dev Biol. 2018 Aug;80:50-64. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023. Epub 2017 Jun 3. PMID: 28587975.

Momenimovahed Z., Mazidimoradi A., Maroofi P., Allahqoli L., Salehiniya H., Alkatout I. **Global, regional and national burden, incidence, and mortality of cervical cancer.** Cancer Rep (Hoboken). 2023. Mar;6(3):e1756. doi: 10.1002/cnr.2.1756. Epub 2022 Dec 21. PMID: 36545760, PMCID: PMC10026270.

Monnier-Benoit S., Mauny F., Riethmuller D., Guerrini JS, Căpîlna M., Félix S., Seillès E., Mougín C., Prétet JL. **Análise imunohistoquímica de subconjuntos de células T CD4+ e CD8+ em alto risco Lesões pré-malignas e malignas associadas ao papilomavírus humano do colo uterino.** Gynecol. Oncol. 2006, 102 :22–31. doi: 10.1016/j.ygyno.2005.11.039.

Motoki Y., Mizushima S., Taguri M. et al. **Increasing trends in cervical cancer mortality among young Japanese women below the age of 50 years: an analysis using the Kanagawa population-based Cancer Registry, 1975-2012.** Cancer Epidemiol 2015;39:700-6.

Mundt AJ, Mell LK, Roeske JC. **Análise preliminar de toxicidade gastrointestinal crônica em pacientes ginecológicos tratados com terapia de radiação pélvica modulada de intensidade total.** Int. J. Radiat. Oncol. 2003, 56 :1354–1360. doi: 10.1016/S0360-3016(03)00325-0.

Münger K., Howley PM. **Human papillomavirus immortalization and transformation functions.** *Virus Res.* 2002 Nov,89(2):213-28. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00190-9. PMID: 12445661.

Muntinga CLP, de Vos van Steenwijk PJ, Bekkers RLM, van Esch EMG. **Importance of the Immune Microenvironment in the Spontaneous Regression of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions (cSIL) and Implications for Immunotherapy.** *J Clin Med.* 2022 Mar 5,11(5):1432. doi: 10.3390/jcm11051432. PMID: 35268523, PMCID: PMC8910829.

Murta EFC, Souza MAH, Araújo Jr E., Adad SJ. **Incidence of Gardnerella vaginalis, Candida sp and human papilloma virus in cytological smears.** *São Paulo Med J* 2000,118(4):105-8. 16.

Nair A., Venkatraman M., Maliekal TT, Nair B., Karunagaran D. **NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix.** *Oncogene* 22 (1), 50–58, 2003.

National Cancer Institute. **SEER Cancer Stat Facts: Cervical Cancer.** Bethesda, MD. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>. (Accessed September 05, 2022).

National Comprehensive Cancer Network. Cervical Cancer. **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.** 2023. Available from: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1426> cancers (accessed May 29, 2023).

Neill T., Xie C., Iozzo RV. **Decorin evokes reversible mitochondrial depolarization in carcinoma and vascular endothelial cells.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022 Nov 1;323(5):C1355-C1373. doi: 10.1152/ajpcell.00325.2022. Epub 2022 Aug 29. PMID: 36036446; PMCID: PMC9602711.

Nerya R., Musa S., Khatib S., Tamir J., Vaya. **Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers.** *Phytochemistry*, 65 (2004), pp. 1389-1395.

Ni L., Meng CQ, Sikorski JA. **Recent advances in therapeutic chalcones.** *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2004, 14.

Noori AM. **Synthesis, Antimicrobial, Antioxidant Evaluation, and DFT Estimation of some New Cyclohexenone Derivatives Derived from Benzyloxy Chalcones.** *Curr Org Synth.* 2023,20(7):812-820. doi: 10.2174/1570179420666230126103401. PMID: 36703600.

Nordberg J., Arnér ES. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** *Free Radic Biol Med.* 2001 Dec 1,31(11):1287-312. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00724-9. PMID: 11728801.

Nourbakhsh M., Noori S., Aminzade Z., Bayanati M., Alemi M., Zarghi A. **Attenuation of Inflammatory Responses in Breast and Ovarian Cancer Cells by a Novel Chalcone Derivative and Its Increased Potency by Curcumin.** *Mediators Inflamm.* 2023 Jan 12,2023:5156320. doi: 10.1155/2023/5156320. PMID: 36687217, PMCID: PMC9851785.

Nowakowska Z. **A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 125, 2007.

Ogasawara Y., Tsuji T., Fujimoto T. **Vários papéis das gotículas lipídicas na autofagia - alvo, produto e o que mais?** *Semin Cell Dev Biol.* 2020 <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.013>.

Oliveira SP, Montezuma D., Moreira A., Oliveira D., Neto PC, Monteiro A., Monteiro J., Ribeiro L., Gonçalves S., Pinto IM, Cardoso JS. **A CAD system for automatic dysplasia grading on H&E cervical whole-slide images.** *Sci Rep.* 2023 Mar 9,13(1):3970. doi: 10.1038/s41598-023-30497-z. PMID: 36894572, PMCID: PMC9998461.

Omidi-Shahsavandi M., Yaghmaei P., Ahmadian S., Ebrahim-Habibi A. **Effect of silibinin and trans-chalcone in an Alzheimer's disease-like model generated by insulin amyloids.** *Braz J Med Biol Res.* 2023 Feb 27,56:e12443. doi: 10.1590/1414-431X2023e12443. PMID: 36856252, PMCID: PMC9974074.

OMS. **Organização Mundial de Saúde.** Câncer Cervical. 2020. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Cervical%20cancer%20is%20the%20fourth,%2Dincome%20countries%20\(1\)>](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Cervical%20cancer%20is%20the%20fourth,%2Dincome%20countries%20(1)>)>. Acesso em: 30 de mar. 2023.

OMS. **Organização Mundial de Saúde.** Câncer. 2018. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 20 de jan. 2023.

Osmaniye D., Sağlık BN, Khalilova N., Levent S., Bayazıt G., Gül ÜD, Özkay Y., Kaplancıklı ZA. **Design, Synthesis, and Biological Evaluation Studies of Novel Naphthalene-Chalcone Hybrids As Antimicrobial, Anticandidal, Anticancer, and VEGFR-2 Inhibitors.** *ACS Omega.* 2023 Feb 13,8(7):6669-6678. doi: 10.1021/acsomega.2c07256. PMID: 36844559, PMCID: PMC9947975.

Oyouni AAA. **Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines.** *J Infect Public Health.* 2023 Apr,16(4):626-631. doi: 10.1016/j.jiph.2023.02.014. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36868166.

Padauleng N., Mustofa M., Wahyuningsih TD, Purnomosari D. **Chalcone-3 Inhibits the Proliferation of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 2023 Feb 1,24(2):683-691. doi: 10.31557/APJCP.2023.24.2.683. PMID: 36853320, PMCID: PMC10162601.

Panchuk RR, Skorokhyd NR, Kozak YS, Lehka LV, Moiseenok AG, Stoika RS. **Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential.** Croat Med J 2017; 58:171-184. <https://doi.org/10.3325/cmj.2017.58.171>.

Pandey V., Tripathi A., Rani A., Dubey PK. **Deoxyelephantopin, a novel naturally occurring phytochemical impairs growth, induces G2/M arrest, ROS-mediated apoptosis and modulates lncRNA expression against uterine leiomyoma.** Biomed Pharmacother. 2020 Nov; 131:110751. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110751. Epub 2020 Sep 20. PMID: 33152917.

Panis, C. **Unraveling Oxidation-Induced Modifications in Proteins by Proteomics.** Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 19–38, 2014. doi:10.1016/b978-0-12-800168-4.00002-0.

Park KJ. **Cervical adenocarcinoma: integration of HPV status, pattern of invasion, morphology and molecular markers into classification.** Histopathology. 2020 Jan;76(1):112-127. doi: 10.1111/his.13995. PMID: 31846527.

Patel TD, Vanteddu VG, Sweta B. **Current Trends in Immuno-Oncology.** Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2023;21(2):96-107. doi: 10.2174/1871525720666220829142225. PMID: 36043741.

Peng H., Zhang X., Yang P., Zhao J., Zhang W., Feng N., Yang W., Tang J. **Defect self-assembly of metal-organic framework triggers ferroptosis to overcome resistance.** Bioact Mater. 2021 Dec 30;19:1-11. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.12.018. PMID: 35415315; PMCID: PMC8980498.

Petan T. **Lipid Droplets in Cancer.** Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2023;185:53-86. doi: 10.1007/112_2020_51. PMID: 33074407.

Petry K.U. **Management options for cervical intraepithelial neoplasia.** Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, Volume 25, Issue 5, 2011, Pages 641-651, ISSN 1521-6934, <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.04.007>.

Pfaffenzeller MS, Franciosi MLM, Cardoso AM. **Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical Cancer.** Purinergic Signal. 2020 Mar;16(1):123-135. doi: 10.1007/s11302-020-09693-3. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32170538, PMCID: PMC7166227.

Pinto P., Machado CM, Moreira J., Almeida JD, Silva PM, Henriques AC, Soares JX, Salvador JA, Afonso C., Pinto M., et al. **Derivados de chalcona visando a mitose: Síntese, avaliação da atividade antitumoral e lipofilicidade.** EUR. J. Med. Chem. 2019, 184 :111752. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111752.

Pisani P., Bray F., Parkin DM. **Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population.** Int J Cancer, v.97, p.72-81, 2002.

Qiu J., Qu X., Wang Y., Guo C., Lv B., Jiang Q., Su W., Wang L., Hua K. **Single-Cell Landscape Highlights Heterogenous Microenvironment, Novel Immune Reaction Patterns, Potential Biomarkers and Unique Therapeutic Strategies of Cervical Squamous Carcinoma, Human Papillomavirus-Associated (HPVA) and Non-HPVA Adenocarcinoma.** Adv Sci (Weinh). 2023 Apr,10(10):e2204951. doi: 10.1002/advs.202204951. Epub 2023 Feb 1. PMID: 36725337, PMCID: PMC10074047.

Rajcani J. **Reativação de vírus de DNA latentes durante imunossupressão: contemplação básica.** Acta Virol. 2007, 51 (2):77–100.

Randall TC, Ghebre R. **Challenges in Prevention and Care Delivery for Women with Cervical Cancer in Sub-Saharan Africa.** Front Oncol. 2016 Jun 28;6:160. doi: 10.3389/fonc.2016.00160. PMID: 27446806, PMCID: PMC4923066.

Razlog R., Kruger CA, Abrahamse H. **Cytotoxic Effects of Combinative ZnPcS4 Photosensitizer Photodynamic Therapy (PDT) and Cannabidiol (CBD) on a Cervical Cancer Cell Line.** Int J Mol Sci. 2023 Mar 24;24(7):6151. doi: 10.3390/ijms24076151. PMID: 37047123, PMCID: PMC10094677.

Rede Nacional de Câncer Abrangente. **Câncer do colo do útero. Diretrizes de prática clínica da NCCN em oncologia. 2023.** Disponível em: <: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1426cancers>>. Acesso em 29 de mai. 2023.

Reinstein E., Scheffner M., Oren M., Ciechanover A., Schwartz A. **Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue.** Oncogene. 2000 Nov 30;19(51):5944-50. doi: 10.1038/sj.onc.1203989. PMID: 11127826.

Remigante A., Spinelli S., Marino A., Pusch M., Morabito R., Dossena S. **Oxidative Stress and Immune Response in Melanoma: Ion Channels as Targets of Therapy.** Int J Mol Sci. 2023 Jan 3;24(1):887. doi: 10.3390/ijms24010887. PMID: 36614330, PMCID: PMC9821408.

Repetto M., Reides C., Carretero MLG, Costa M., Griemberg G., Llesuy S. **Oxidative stress in blood of HIV infected patients.** Clinica Chimica Acta, 255, 107- 1996.

Reuter S., Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. **Estresse oxidativo, inflamação e câncer: como eles estão ligados?** Radic Livre. Biol. Med. 2010, 49 :1603–1616. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

Ribas D. Filho, Suen VM, organizadores, compiladores. **In: Tratado de nutrologia.** São Paulo: Manole, 2013.

Rincheval V., Bergeaud M., Mathieu L. et al. **Efeitos diferenciais de Bcl-2 e caspases na permeabilização mitocondrial durante a morte celular induzida por espécies reativas de oxigênio endógeno ou exógeno.** Cell Biol Toxicol 28 , 239–253 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10565-012-9219-9>.

Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp E. **Biologia molecular do câncer cervical.** Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, 6(4), 447–451, 2006. doi:10.1590/S1519-38292006000400012.

Rizvi H., Sanchez-Vega F., La K., Chatila W., Jonsson P., Halpenny D., et al. **Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing.** J Clin Oncol. 2018,36(7):633–41.

Robbins & Cotran. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

Ruiz-Lafuente N, Minguela A, Muro M, Parrado A. The roles of Cdc42 and Rac1 in the formation of plasma membrane protrusions in cancer epithelial HeLa cells. Mol Biol Rep. 2021 May;48(5):4285-4294. doi: 10.1007/s11033-021-06443-5. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34110575.

Sai CM, Li BJ, Zhang Z., Wang HN, Gong H., Lun XY, Tian MJ, Yang MY, Hua HM. **Cytotoxic alkaloids from the fruit pods of Macleaya microcarpa.** Fitoterapia. 2023 Jan,164:105378. doi: 10.1016/j.fitote.2022.105378. Epub 2022 Nov 26. PMID: 36511342.

Santana CSS, Lima N., Alves N., Desoti, VC, Bidóia DL, de Souza B M, Ratti P., Alirão B., Nakamura TU, Nakamura CV, Consolaro MELX, Farias V., de Oliveira SS. **Vitamin K3 induces antiproliferative effect in cervical epithelial cells transformed by HPV 16 (SiHa cells) through the increase in reactive oxygen species production.** Archives of Gynecology and Obstetrics, 294(4), 797–804, 2016. doi:10.1007/s00404-016-4097-7.

Schäfer JA, Bozkurt S, Michaelis JB, Klann K, Münch C. **Global mitochondrial protein import proteomics reveal distinct regulation by translation and translocation machinery.** Mol Cell. 2022 Jan 20;82(2):435-446.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2021.11.004. Epub 2021 Nov 29. PMID: 34847359; PMCID: PMC8791276.

Schiffman M., Castle PE, Jeronimo J., Rodriguez AC, Wacholder S. **Human papillomavirus and cervical cancer.** Lancet. 2007 Sep 8,370(9590):890-907. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0. PMID: 1782617.

Seshadri VD. Brucine promotes apoptosis in cervical cancer cells via suppression of inflammation and cell proliferation by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Environmental Toxicology, 2021. doi:10.1002/tox.23304.

Settembre C., Di Malta C., Polito VA, Garcia Arencibia M., Vetrini F, Erdin S., Erdin SU, Huynh T., Medina D., Colella P., Sardiello M., Rubinsztein DC, Ballabio A. **TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis.** *Science*. 2011 Jun 17;332(6036):1429-33. doi: 10.1126/science.1204592. Epub 2011 May 26. PMID: 21617040; PMCID: PMC3638014.

Shafabakhsh R., Reiter RJ, Aschner M., Mirzaei H., Asemi Z. **Resveratrol and Cervical Cancer: A New Therapeutic Option.** *Mini Rev Med Chem*. 2023;23(2):159-169. doi: 10.2174/1389557522666220128155525. PMID: 35088669.

Shaw PG, Chaerkady R., Wang T., Vasilatos S., Huang Y., van Houten B., Pandey A., Davidson NE. **Integrated proteomic and metabolic analysis of breast cancer progression.** *PLoS ONE* 8(9): e76220, 2013.

Shen KH, Chang JK, Hsu YL, Kuo PL. **Chalcone arrests cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor kappa B signalling in human bladder cancer cells.** *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101, 254–261, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00120.x>.

Shiri AP, Hemmat N., Baradaran B., Bannazadeh BH. **siRNA-E6 sensitizes HPV-16-related cervical cancer through Oxaliplatin: an in vitro study on anti-cancer combination therapy.** *Eur J Med Res*. 2023 Jan 21;28(1):42. doi: 10.1186/s40001-023-01014-9. PMID: 36681850, PMCID: PMC9862546.

Shpilt Z, Melamed-Book N, Tshuva EY. **An anticancer Ti(IV) complex increases mitochondrial reactive oxygen species levels in relation with hypoxia and endoplasmic-reticulum stress: A distinct non DNA-related mechanism.** *J Inorg Biochem.* 2023 Jun;243:112197. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2023.112197. Epub 2023 Mar 20. PMID: 36963201.

Shu S., Li Z., Liu L., Ying X., Zhang Y., Wang T., Zhou X., Jiang P., Lv W. **HPV16 E6-Activated OCT4 Promotes Cervical Cancer Progression by Suppressing p53 Expression via Co-Repressor NCOR1.** *Front Oncol*. 2022 Jul 7;12:900856. doi: 10.3389/fonc.2022.900856. PMID: 35875100, PMCID: PMC9302044.

Siddig EE, Ahmed A., Ahmed ES, Mohammed MA, Kunna E., El-Sadig SM, Ali Y., Hassan RA, Ali ET, Mohamed NS. **Knowledge and attitudes towards cervical cancer prevention among women in Khartoum state, Sudan. Womens Health (Lond).** 2023 Jan-Dec;19:17455057231166286. doi: 10.1177/17455057231166286. PMID: 37070544; PMCID: PMC10126610.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. **Cancer statistics, 2020.** *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31912902.

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. **Cancer statistics, 2023.** *CA Cancer J Clin*. 2023 Jan;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763. PMID: 36633525.

Sikander M., Malik S., Yadav D., Biswas S., Katare DP, Jain SK. **Cytoprotective activity of a trans-chalcone against hydrogen peroxide induced toxicity in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells.** Asian Pac J Cancer Prev. 2011,12(10):2513-6. PMID: 22320949.

Silva G., Marins M., Chaichanasak N., Yoon Y., Fachin AL, Pinhanelli VC, Regasini LO, dos Santos MB, Ayusso GM, Marques BC, Wu WW, Phue JN, Shen RF, Baek SJ. **Trans-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition.** PLoS One 13, e0202263, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202263>.

Silva, G., Marins, M., Fachin, A.L., Lee, S.H., Baek, S.J., 2016. **Anti-cancer activity of transchalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53.** Mol. Carcinog. 55, 1438–1448. <https://doi.org/10.1002/mc.22386>.

Simirgiotis MJ, Adachi, S., To S., Yang H., Reynertson KA, Basile MJ, Gil RR, Weinstein IB, Kennelly EJ. **Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of Syzygium samarangense (Wax Jambu).** Food Chem., 2008, 107, 813–819.

Singh D., Vignat J., Lorenzoni V., Eslahi M., Ginsburg O., Lauby-Secretan B., Arbyn M., Basu P., Bray F., Vaccarella S. **Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative.** Lancet Glob Health. 2023 Feb,11(2):e197-e206. doi: 10.1016/S2214-109X(22)00501-0. Epub 2022 Dec 14. PMID: 36528031, PMCID: PMC9848409.

Siqueira, ES, Concato VM, Tomiotto-Pellissier F., Silva TF, Bortoleti BTS, Gonçalves MD, Costa IN, Verri Junior WA, Pavanelli WR, Panis C., Mantovani MS, Miranda-Sapla MM, Conchon-Costa I. **trans-chalcone induces death by autophagy mediated by p-53 up-regulation and β -catenin down-regulation on human hepatocellular carcinoma huh7.5 cell line.** Phytomedicine (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153373>.

Skloot, R. **A vida imortal de Henrietta Lacks.** São Paulo: Companhia das Letras, 2011. 456p. LIVROS & REDES. Hist. cienc. saude-Manguinhos 20 (Suppl 1). <https://doi.org/10.1590/S0104-59702013000400019>.

Smith JS, Lindsay L., Hoots B., Keys J., Franceschi S., Winer R., Clifford GM. **Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update.** Int J Cancer. 2007 Aug 1,121(3):621-32. doi: 10.1002/ijc.22527. PMID: 17405118.

Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. **Guias de Conduta - SBOC.** 2022. Disponível em: <https://sboc.org.br/diretrizes-publicas/2022>.

Stewart D., Kazemi S., Li S., Massimi P., Banks L., Koromilas AE, Matlashewski G. **Ubiquitination and proteasome degradation of the E6 proteins of human papillomavirus types 11 and 18.** J Gen Virol. 2004 Jun,85(Pt 6):1419-1426. doi: 10.1099/vir.0.19679-0. PMID: 15166424.

Stolnicu S., Hoang L., Soslow RA. **Recent advances in invasive adenocarcinoma of the cervix.** Virchows Arch. 2019 Nov,475(5):537-549. doi: 10.1007/s00428-019-02601-0. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31209635, PMCID: PMC6864265.

Storz P. Espécies reativas de oxigênio na progressão tumoral. Front Biosci. 2005, 10:1881–96.

Taniguchi K., Karin M. **NF- κ B, inflamação, imunidade e câncer: amadurecimento.** Nature Reviews Immunologia . 2018; 18 (5):309–324. doi: 10.1038/nri.2017.142.

Teniente SL, Flores-Gallegos AC, Esparza-González SC, Campos-Múzquiz LG, Nery-Flores SD, Rodríguez-Herrera R. **Anticancer Effect of Pomegranate Peel Polyphenols against Cervical Cancer.** Antioxidants (Basel). 2023 Jan 5,12(1):127. doi: 10.3390/antiox12010127. PMID: 36670990, PMCID: PMC9854619.

Thebti A., Meddeb A., Ben Salem I., Bakary C., Ayari S., Rezgui F., Essafi-Benkhadir K., Boudabous A., Ouzari Hl. **Antimicrobial Activities and Mode of Flavonoid Actions.** Antibiotics (Basel). 2023 Jan 20,12(2):225. doi: 10.3390/antibiotics12020225. PMID: 36830135, PMCID: PMC9952116.

Tilborghs S., Corthouts J., Verhoeven Y., Arias D., Rolfo C., Trinh XB, van Dam PA. **The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer.** Crit Rev Oncol Hematol. 2017 Dec;120:141-150. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.001. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29198328.

Tingting Y.,Rongbiao L., Yizhen Z., Ya Z., Chenyang Z, Rongchun L, Zhongqiu L. **Cervical cancer stem cells.** Cell Proliferation, 48(6), 611–625, 2015. doi:10.1111/cpr.12216.

Tossetta G., Marzioni D. **Targeting the NRF2/KEAP1 pathway in cervical and endometrial cancers.** Eur J Pharmacol. 2023 Feb 15,941:175503. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175503. Epub 2023 Jan 12. PMID: 36641100.

Tul, HS, Kau, J., Vashisht, K. et al. **Mecanismos moleculares por trás da regulação de ROS no câncer: um ato de equilíbrio entre tumorigênese aumentada e apoptose celular.** Arch Toxicol 97, 103–120 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03421-z>.

Vaidžiulytė K., Macé AS, Battistella A., Beng W., Schauer K., Coppey M. **Persistent cell migration emerges from a coupling between protrusion dynamics and polarized trafficking.** Elife. 2022 Mar 18;11:e69229. doi: 10.7554/eLife.69229. PMID: 35302488; PMCID: PMC8963884.

Vale C., Nightingale A., Spera N., Whelan A., Hanley B., Tierney JF. **Late complications from chemoradiotherapy for cervical cancer: reflections from cervical cancer survivors 10 years after the national cancer institute**

alert. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2010 Sep;22(7):588-9. doi: 10.1016/j.clon.2010.05.017. Epub 2010 Jun 15. PMID: 20554439.

van der Burg SH, Palefsky JM. **Vírus da Imunodeficiência Humana e Vírus do Papiloma Humano — Por que as lesões induzidas pelo HPV não desaparecem espontaneamente e por que a vacinação terapêutica pode ser bem-sucedida.** J. Trad. Med. 2009, 7 :108. doi: 10.1186/1479-5876-7-108.

van der Reest J., Lilla S., Zheng L., Zanivan S., Gottlieb E. **Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress.** Nat. Commun. 9, 1581, 2018.

Vanangamudi G., Subramanian M., Thirunarayanan G. **Synthesis. Spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3- thienyl chalcones.** Arabian Journal of Chemistry 2017, 10, S1254.

Vandermark ER, Deluca KA, Gardner CR, Marker DF, Schreiner CN, Strickland DA, et al. **Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF-kB in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF-kB promotes cell growth and immortalization.** Virology. 2012;425:53–60.

Vani VVS, Nishitha RSH, Hegde AB, Alagumuthu M. **In silico analysis of natural inhibitors against HPV E6 protein.** Curr Comput Aided Drug Des. 2023 Mar 10. doi: 10.2174/1573409919666230310144550. Epub ahead of print. PMID: 36896907.

Venter C., Niesler CU. **Rapid quantification of cellular proliferation and migration using ImageJ. Biotechniques.** 2019 Feb;66(2):99-102. doi: 10.2144/btn-2018-0132. PMID: 30744408.

Victorino VJ, Campos FC, Herrera AC, Colado Simão AN, Cecchini AL, Panis C., Cecchini R. **Overexpression of HER2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer.** Tumour Biol. 2014 Apr;35(4):3025-34.

Victorino VJ, Aranome AMF, Campos FC, Herrera ACSA, Cecchini R., Panis C. **Crosstalk between Oxidative Stress Signaling and HER2 Pathway in Breast Cancer.** American Journal of Immunology , v. 10, p. 177-183, 2015.

Vijayarathna S., Oon CE, Chen Y., Kanwar JR, Sasidharan S. **Polyalthia longifolia Methanolic Leaf Extracts (PLME) induce apoptosis, cell cycle arrest and mitochondrial potential depolarization by possibly modulating the redox status in hela cells.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 89, 499–514, 2017. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.075 Vizza et al., 2019.

Vizza D., Lupinacci S., Toteda G., Puoci F., Ortensia IP, De Bartolo A., Lofaro D., Scrivano L., Bonofiglio R., La Russa A., Bonofiglio M., Perri A. **An Olive Leaf Extract Rich in Polyphenols Promotes Apoptosis in Cervical Cancer Cells by Upregulating p21Cip/WAF1 Gene Expression.** Nutr Cancer.

2019,71(2):320-333. doi: 10.1080/01635581.2018.1559934. Epub 2019 Jan 19. PMID: 30661406.

Vogel S., Ohmayer S., Brunner G., Heilmann J. **Natural and nonnatural prenylated chalcones: Synthesis, cytotoxicity and antioxidative activity.** Bioorg. Med. Chem., 2008, 16, 4286-4293.

Volkova LV, Pashov AL, Omelchuk NN. **Cervical Carcinoma: Oncobiology and Biomarkers.** Int J Mol Sci. 2021 Nov 22;22(22):12571. doi: 10.3390/ijms222212571. PMID: 34830452, PMCID: PMC8624663.

WalyEldeen AA, Sabet S., El-Shorbagy HM, Abdelhamid IA, Ibrahim SA. **Chalcones: Promising therapeutic agents targeting key players and signaling pathways regulating the hallmarks of cancer.** Chemico-Biological Interactions, Volume 369, 2023, 110297, ISSN 0009-2797, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110297>.

Wang Y., He M., Zhang G., Cao K., Yang M., Zhang H., Liu H. **The immune landscape during the tumorigenesis of cervical cancer.** Cancer Med. 2021 Apr;10(7):2380-2395. doi: 10.1002/cam4.3833. Epub 2021 Mar 10. PMID: 33694292; PMCID: PMC7982625.

Wang Y., He M., Zhang G., Cao K., Yang M., Zhang H., Liu H. **The immune landscape during the tumorigenesis of cervical cancer.** Cancer Med. 2021 Apr;10(7):2380-2395. doi: 10.1002/cam4.3833. Epub 2021 Mar 10. PMID: 33694292, PMCID: PMC7982625.

Wang Y., Lo TT, Wang L., Hsu ST, Hwang SF, Lu CH, Sun L. **Long-Term Efficacy and Toxicity of Intensity-Modulated Radiotherapy in Bulky Cervical Cancer.** Int J Environ Res Public Health. 2023 Jan 9;20(2):1161. doi: 10.3390/ijerph20021161. PMID: 36673916, PMCID: PMC9858714.

Waters MD, Stack HF. **The short-term test activity profile for procarbazine hydrochloride.** Mutagenesis. 1988;3:89-94. <https://doi.org/10.1093/mutage/3.2.89>
Wong D., Teixeira A., Oikonomopoulos S., et al. **Extensive characterization of NF-kappaB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits.** Genome Biol. 12 (7), R70, 2011.

Woo YL, Sterling J., Damay I., Coleman N., Crawford R., van der Burg SH, Stanley M. **Characterizando as respostas imunes locais na neoplasia intraepitelial cervical: uma análise transversal e longitudinal.** BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol. 2008; 115 :1616–1622. doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.01936.x.

Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. **The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues.** 7(1), 11–22, 2007. doi:10.1038/nrc2050 .

World Health Organization. **Cervical Cancer.** 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical->

Youssef AMM, Maaty DAM, Al-Saraireh YM. **Phytochemical Analysis and Profiling of Antitumor Compounds of Leaves and Stems of Calystegia silvatica (Kit.) Griseb.** *Molecules*. 2023 Jan 7;28(2):630. doi: 10.3390/molecules28020630. PMID: 36677687, PMCID: PMC9863965.

Yue Y., Shu Y., Ye K., Sun J., Liu C., Dai S., Jin L., Ding C., Lu R. **Molecular Twisting Affects the Solid-State Photochemical Reactions of Unsaturated Ketones and the Photomechanical Effects of Molecular Crystals.** *Chemistry*. 2023 Feb 1;29(7):e202203178. doi: 10.1002/chem.202203178. Epub 2022 Dec 13. PMID: 36344439.

Zhao N., Wang W., Jiang H., Qiao Z., Sun S., Wei Y., Xie X., Li H., Bi X., Yang Z. **Natural Products and Gastric Cancer: Cellular Mechanisms and Effects to Change Cancer Progression.** *Anticancer Agents Med Chem*. 2023 Apr 7. doi: 10.2174/1871520623666230407082955. Epub ahead of print. PMID: 37026490.

Zhao W, Zhuang P, Chen Y, Wu Y, Zhong M, Lun Y. **"Double-edged sword" effect of reactive oxygen species (ROS) in tumor development and carcinogenesis.** *Physiol Res*. 2023 Jul 14;72(3):301-307. doi: 10.33549/physiolres.935007. PMID: 37449744.

Zheng PP, van der Weiden M, Kros JM. **Hela I-CaD is implicated in the migration of endothelial cells/endothelial progenitor cells in human neoplasms.** *Cell Adh Migr*. 2007 Apr-Jun;1(2):84-91. doi: 10.4161/cam.1.2.4332. Epub 2007 Apr 24. PMID: 19329885; PMCID: PMC2633982.

Zhou J., Wu SG, Sun JY, Li FY, Lin HX, Chen QH, He ZY. **Comparison of clinical outcomes of squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix after definitive radiotherapy: a population-based analysis.** *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017 Jan;143(1):115-122. doi: 10.1007/s00432-016-2246-9. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27646608.

Zhuang C., Zhang W., Sheng C., Zhang W., Xing C., Miao Z. **Chalcone: Uma estrutura privilegiada em química medicinal.** *Chem. Rev*. 2017, 117 :7762–7810. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00020.

zur Hausen H. **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342-50. doi: 10.1038/nrc798. PMID: 12044010.