



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO MANOEL DE SOUSA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
IMUNOMODULADORA DA *TRANS*-CHALCONA E
EFEITOS DO TRATAMENTO SOBRE PARÂMETROS DE
CAQUEXIA EM MODELO MURINO DE CÂNCER
CERVICAL**

LONDRINA

2025

JOÃO MANOEL DE SOUSA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
IMUNOMODULADORA DA *TRANS*-CHALCONA E
EFEITOS DO TRATAMENTO SOBRE PARÂMETROS DE
CAQUEXIA EM MODELO MURINO DE CÂNCER
CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Imunologia de Tumores

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli

Londrina
2025

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

S586a Silva, João Manoel de Sousa .
Avaliação da atividade antitumoral e imunomoduladora da trans-chalcona e efeitos do tratamento sobre parâmetros de caquexia em modelo murino de câncer cervical / João Manoel de Sousa Silva. - Londrina, 2025.
85 f.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia de Tumores - Tese. 2. Câncer do Colo do Útero - Tese. 3. HPV - Tese. 4. Patologia - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

JOÃO MANOEL DE SOUSA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E
IMUNOMODULADORA DA *TRANS-CHALCONA* E
EFEITOS DO TRATAMENTO SOBRE PARÂMETROS DE
CAQUEXIA EM MODELO MURINO DE CÂNCER
CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério
Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Carolina Jacob Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2025.

AGRADECIMENTOS

Não tenho muitas certezas na vida, mas uma eu tenho: que o caminho até aqui não foi nem um pouco fácil, sempre foram mais espinhos do que flores. Mas, o caminho de quem luta pelo seu sem bajular ninguém é realmente mais difícil. E durante esse caminho, houveram vários atenuantes para que minha cabeça permanecesse no lugar.

Primeiramente, e inevitavelmente, gostaria de agradecer a Deus e a todos os seres da Natureza por terem me erguido nos momentos tão difíceis de provação que eu passei ao longo desses 2 anos de mestrado. Obrigado por me fazer senti-los nesses momentos, e me auxiliar a continuar firme nessa caminhada tão árdua, que muitas vezes parecia não ter fim. Juntamente a esse primeiro agradecimento, gostaria de agradecer aos meus pais Neuma Pinheiro e Augusto Gomes, e a minha irmã Claudia Augusta, por todo o apoio durante todo esse tempo. Vocês nunca deixaram, ainda que em meio às dificuldades, de me incentivar a conquistar os meus sonhos, como também sempre estiveram ali presentes em todas as fases da minha vida, de forma fundamental, indispensável e imprescindível. Vocês são a base de tudo o que sou. Eu amo vocês!

Em seguida, gostaria de agradecer à todas as minhas tias: Francisca das Chagas (e também madrinha), Neusa Pinheiro, Benedita Lucas e Josinete Firmino por todo o apoio e preocupação durante todo esse tempo de graduação, por todas as vezes que estiveram ali de pronta e nunca hesitaram em me ajudar. Eu amo vocês!

Às minhas primas Thaysa Joane, Francilucia Pinheiro, Ítala Adriene, Francilene Pinheiro e Vanessa Lucas por toda a ajuda, apoio, amizade e carinho durante todo esse tempo, e que ainda de longe, me divertiam e me entretinham por meio das redes sociais, procurando sempre saber como eu estava, e compartilhando notícias da nossa família e também das redondezas. Eu amo vocês!

À família LIDNC – Laboratório de Imunoparasitologia das Doenças Negligenciadas e Câncer, a citar Fabrício Inoue, Mariana Detoni, Carolina Jacob, Ellen Mayara, Natália Concimo, Angélica Nunes, Yasmin Munhoz, Sarah Suzuki, Amanda Carloto e Virgínia Concato. Muito obrigado por toda a recepção no

laboratório e por todo companheirismo e ajuda durante esses dois anos de mestrado. Agradeço ainda aos amigos que fiz em outros laboratórios, Leonardo Berto, Raquel Nakama, Lucas Santos, e Isabella Tihara, por todos os momentos de diálogos e conversas, como também de preocupações compartilhados.

Em um tópico exclusivo, gostaria de fazer um agradecimento especial a dois grandes amigos que fiz em Londrina durante esses dois anos de mestrado, que também considero irmãos, Fabrício Inoue e Leonardo Berto. Obrigado por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos (literalmente). Por todas as madrugadas no laboratório, todas as nossas saídas para fazermos provas de degustação nos diferentes restaurantes de Londrina, em especial, na Maranello, e por todos os outros momentos que compartilhamos juntos.

A todos os professores que contribuíram diretamente para meu conhecimento e crescimento profissional, Prof, Dr. Emerson José Venâncio, Prof^a. Dr^a. Maiara Voltarelli Providello e Prof^a. Dr^a Danielle Lazarin Bidóia. Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim sem hesitar, e por acreditar no meu potencial e capacidade de elaboração e execução de projetos. Aos professores parceiros dessa pesquisa, Prof. Dr. Waldiceu Verri e Prof^a. Dr^a. Danielle Lazarin Bidóia.

Um agradecimento especial aos professores da banca, tanto de qualificação quanto de defesa, Prof. Dr. Emerson José Venâncio, Prof^a. Dr^a, Ana Carolina Jacob Rodrigues e Prof^a. Dr^a. Danielle Lazarin Bidóia, pelo aceite em participar desse momento comigo, e por todas as contribuições feitas.

Aos meus amigos de turma, Leonardo Berto, Fernanda Barbosa, Pamella Rodrigues e Eduarda Santos por todo o companheirismo e parceria durante as disciplinas cursadas.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que participaram da construção do meu caminho, direta ou indiretamente, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. A todos vocês, meu muito obrigado!

SILVA, João Manoel de Sousa. **Avaliação da atividade antitumoral e imunomoduladora da *Trans*-Chalcona e efeitos do tratamento sobre parâmetros de caquexia em modelo murino de câncer cervical**. 2025. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

O câncer do colo do útero ocorre pela infecção genital persistente por tipos oncogênicos do HPV. No Brasil, excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma, o câncer do colo do útero ocupa a 6ª posição dentre todos os tipos de câncer e, entre a população feminina, este ocupa a 3ª posição, tendo sido previstos 17.010 novos casos por ano, para o triênio 2023-2025. Existem, atualmente, alguns quimioterápicos que são utilizados no tratamento do câncer cervical. Entretanto, estes fármacos causam, com frequência, alta toxicidade às pacientes. Dessa forma, faz-se necessária a busca de novos fármacos que apresentem maior seletividade para as células tumorais, e que causem menos efeitos tóxicos. A *Trans*-Chalcona é um composto natural presente em diversas famílias de plantas. Ela é uma precursora da biossíntese de flavonóides, grupo de metabólitos secundários envolvidos em mecanismos de adaptação e defesa de plantas. Possui amplo espectro de ação biológica, tendo sua atividade anticâncer já sido bem discutida na literatura, frente à diferentes tipos de linhagens de células tumorais. Contudo, a atividade antitumoral da *Trans*-Chalcona em modelos *in vivo* é escassa. No presente estudo, investigamos a atividade antitumoral e imunomoduladora da *Trans*-Chalcona, bem como seu efeito sobre a caquexia associada ao câncer, em modelo animal de câncer cervical. Foram utilizados camundongos C57BL/6 isogênicos, fêmeas, com idade de 6 a 8 semanas, obtidas do biotério do Departamento de Ciências Patológicas. Nestas, foram inoculadas, na região dorsolateral, células TC-1 na concentração de 2×10^5 células/100 μ l de meio RPMI. Quando o tumor se tornou palpável, os animais foram divididos, de forma aleatória, entre os diferentes grupos, sendo estes o Grupo Histopatologia e Imunomarcações (GHI), Grupo Homogenato do Tumor (GHT). Cada grupo possui 3 subgrupos, sendo estes o subgrupo Controle Veículo (CV), o qual foi tratado com tween 80 10% + salina (n=8); o subgrupo *Trans*-Chalcona (TCh), o qual foi tratado com a mesma, na dose de 30 mg/kg (n=8), e o subgrupo Controle Positivo (Cis), o qual foi tratado com a Cisplatina, na dose de 2 mg/kg (n=8). Ambos os grupos CV e TCh foram tratados durante 14 dias consecutivos, por via intraperitoneal. O grupo Cis foi tratado uma vez por semana, durante duas semanas. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados, em seguida foi realizada a eutanásia destes por deslocamento cervical, e os tumores, sangue e músculos gastrocnêmio esquerdo e direito destes foram coletados. Foram avaliados os parâmetros de volume tumoral e peso corporal ao longo do período de tratamento. Os tumores dos animais do grupo GHI foram direcionados para cortes histológicos, com os

quais foi realizada coloração com hematoxilina e eosina para avaliação de score patológico. Os tumores dos animais do grupo GHT foram direcionados para dosagem de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 por citometria de fluxo, dosagem de Óxido Nítrico, Ânion Superóxido, Malondialdeído, FRAP e ABTS para avaliar o estresse oxidativo no tumor. O sangue dos animais foi direcionado para dosagem de IL-6 e IFN- γ plasmáticos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina, protocolo CEUA nº 015.2024. Ao fim dos experimentos, foi observado que o tratamento com a *Trans*-Chalcona promoveu inibição do crescimento tumoral de forma semelhante a cisplatina. Em relação à análise histopatológica, observou-se redução na vascularização no tecido tumoral. Quanto ao estresse oxidativo no microambiente tumoral, foi elucidado que o tratamento promoveu aumento dos níveis de ânion superóxido, de metabólitos do óxido nítrico e de malondialdeído, e diminuição do parâmetro de FRAP e uma tendência à diminuição do parâmetro de ABTS. Na avaliação da imunomodulação no microambiente tumoral, elucidou-se que o tratamento tanto com a TCh quanto com a Cis aumentou os níveis das citocinas IFN- γ e IL-17A, e reduziu os níveis das citocinas IL-4 e IL-6. Quanto aos efeitos sobre os parâmetros de caquexia, foi observado que ambos os tratamentos com a *Trans*-Chalcona e com a Cisplatina impediram a perda de peso e da massa muscular, promoveram redução dos níveis plasmáticos de IFN- γ e IL-6, reverteram a perda da força de preensão manual e a *Trans*-Chalcona atenuou a diminuição do consumo alimentar. De acordo com esses resultados, conclui-se que a *Trans*-Chalcona se mostra como um candidato promissor de fármaco antineoplásico para o tratamento de câncer do colo do útero associado ao HPV.

Palavras-chave: Câncer do Colo do Útero. *Trans*-Chalcona. Imunomodulação. Estresse Oxidativo. Caquexia.

SILVA, João Manoel de Sousa. **Evaluation of the antitumor and immunomodulatory activity of Trans-Chalcone and effects of treatment on cachexia parameters in a murine model of cervical cancer.** 2025. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

Cervical cancer is caused by persistent genital infection with oncogenic types of HPV. In Brazil, excluding cases of non-melanoma skin cancer, cervical cancer ranks 6th among all types of cancer and, among the female population, it ranks 3rd, with 17,010 new cases per year predicted for the three-year period 2023-2025. There are currently some chemotherapy drugs that are used to treat cervical cancer. However, these drugs often cause high toxicity to patients. This makes it necessary to look for new drugs that are more selective for tumor cells and cause fewer toxic effects. Trans-chalcone is a natural compound found in several plant families. It is a precursor in the biosynthesis of flavonoids, a group of secondary metabolites involved in plant adaptation and defense mechanisms. It has a broad spectrum of biological action, and its anticancer activity has already been well discussed in the literature, against different types of tumor cell lines. However, the antitumor activity of Trans-Chalcone in in vivo models is scarce. In this study, we investigated the antitumor and immunomodulatory activity of Trans-Chalcone, as well as its effect on cancer-associated cachexia, in an animal model of cervical cancer. We used isogenic female C57BL/6 mice, aged between 6 and 8 weeks, obtained from the vivarium of the Department of Pathological Sciences. TC-1 cells were inoculated in the dorsolateral region at a concentration of 2×10^5 cells/100 μ l of RPMI medium. When the tumor became palpable, the animals were randomly divided into different groups, namely the Histopathology and Immunolabeling Group (GHI) and the Tumor Homogenate Group (GHT). Each group has 3 subgroups: the Control Vehicle (CV) subgroup, which was treated with 10% tween 80 + saline (n=8); the Trans-Chalcone (TCh) subgroup, which was treated with TCh at a dose of 30 mg/kg (n=8), and the Positive Control (Cis) subgroup, which was treated with Cisplatin at a dose of 2 mg/kg (n=8). Both the CV and TCh groups were treated intraperitoneally for 14 consecutive days. The Cis group was treated once a week for two weeks. At the end of the treatment, the animals were anesthetized, then euthanized by cervical dislocation, and the tumors, blood and left and right gastrocnemius muscles were collected. Tumor volume and body weight parameters were assessed throughout the treatment period. The tumors of the animals in the GHI group were sent for histological sections, which were stained with hematoxylin and eosin to evaluate the pathological score. The tumors of the animals in the GHT group were sent for dosage of Th1, Th2 and Th17 cytokines by flow cytometry, dosage of nitric oxide, superoxide anion, malondialdehyde, FRAP and ABTS to assess oxidative stress in the tumor. The animals' blood was used to measure plasma IL-6 and IFN- γ .

This project was approved by the Animal Use Ethics Committee of the State University of Londrina, CEUA protocol no. 015.2024. At the end of the experiments, it was observed that treatment with Trans-Chalcone inhibited tumor growth in a similar way to cisplatin. In relation to the histopathological analysis, a reduction in vascularization was observed in the tumour tissue. With regard to oxidative stress in the tumor microenvironment, it was revealed that the treatment promoted an increase in the levels of superoxide anion, nitric oxide metabolites and malondialdehyde, a decrease in the FRAP parameter and a tendency towards a decrease in the ABTS parameter. The evaluation of immunomodulation in the tumor microenvironment revealed that treatment with both TCh and Cis increased the levels of the cytokines IFN- γ and IL-17A, and reduced the levels of the cytokines IL-4 and IL-6. As for the effects on cachexia parameters, it was observed that both treatments with Trans-Chalcone and Cisplatin prevented weight and muscle mass loss, promoted a reduction in plasma levels of IFN- γ and IL-6, reversed the loss of handgrip strength and Trans-Chalcone attenuated the decrease in food consumption. According to these results, Trans-Chalcone appears to be a promising antineoplastic drug candidate for the treatment of HPV-associated cervical cancer.

Keywords: Cervix Cancer. *Trans-Chalcone*. Immunomodulation. Oxidative stress. Cachexia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os 10 tipos de câncer mais incidentes em mulheres, estimados para o triênio de 2023-2025, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma.	17
Figura 2. O curso natural da infecção pelo Papilomavírus Humano ao desenvolvimento do câncer cervical.....	18
Figura 3. Características microscópicas dos diferentes tipos de Câncer do Colo do Útero.....	19
Figura 4. Diversidade de sítios de infecção pelo HPV no cérvix uterino, e tipos de câncer de acordo com as células infectadas.....	20
Figura 5. Organização do genoma do HPV.	21
Figura 6. Mecanismos moleculares da carcinogênese cervical associada à oncoproteína E5 dos hrHPVs.	23
Figura 7. Mecanismos moleculares da carcinogênese cervical associada à oncoproteína E6 dos hrHPVs.	24
Figura 8. Mecanismos moleculares da carcinogênese cervical associada à oncoproteína E7 dos hrHPVs.	25
Figura 9. Representação estrutural e numérica da trans-Chalcona. Os anéis aromáticos (A e B) estão ligados através do grupo carbonil α , β -insaturado....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar
Akt	Protein kinase B
BAX	Regulador da apoptose BAX
Bcl-2	Proteína do linfoma de células B 2
Cdc25	Ciclo de Divisão Celular 25
CDK2	Ciclina dependente de kinase 2
CSF-1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E5	Oncoproteína E5 dos HPV de Alto Risco
E6	Oncoproteína E6 dos HPV de Alto Risco
E7	Oncoproteína E7 dos HPV de Alto Risco
EGF	<i>Epidermoid Growth Factor</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FOXM1	<i>Forkhead box protein M1</i>
Globocan	<i>Global Cancer Observatory</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HSIL	<i>High-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL-13	Interleucina-13
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDH	Lactato Desidrogenase
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i>
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNA	Micro-RNA

NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
PAHO	<i>Pan-American Health Organization</i>
PARP	Poli-ADP-ribose-polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinase
pRb	Proteína do Retinoblastoma
TAM	<i>Tumor Associate Macrophages</i>
TLR9	<i>Toll-like Receptor 9</i>
TME	<i>Tumor Microenvironment</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Câncer: generalidades	14
1.2. Câncer do Colo do Útero.....	16
1.3. Carcinogênese cervical associada à infecção genital por HPVs de Alto Risco	20
1.4. Imunomodulação no microambiente tumoral pelas células cancerígenas	26
1.5. Caquexia Associada ao Câncer.....	28
1.6. Potencial terapêutico da <i>Trans</i> -Chalcona.....	29
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. REFERÊNCIAS	35
5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	43
5.1. Manuscrito.....	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
ANEXO	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: generalidades

O câncer representa o maior desafio para a saúde pública global, destacando-se como uma das principais razões para o óbito e como uma das principais barreiras para o aumento da expectativa de vida em escala mundial. Em grande parte dos países, figura-se como a primeira ou segunda principal causa de morte prematura, antes dos 70 anos de idade (Inca, 2023). Estimativas do Global Cancer Observatory (Globocan), produzidas pela Internacional Agency for Research on Cancer (IARC, 2020), revelam que houveram 19,3 milhões de casos novos de câncer no mundo em 2020, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma. Para o período de 2023 a 2025, estima-se que o Brasil enfrentará aproximadamente 704 mil novos casos de câncer, sendo esse número reduzido para 483 mil se excluirmos os casos de câncer de pele não melanoma (Inca, 2023).

Também conhecido como tumor ou neoplasia, o câncer é uma terminologia ampla que abrange um diversificado conjunto de doenças, capazes de afetar qualquer região do corpo. Sua característica distintiva reside na rápida formação de células anormais, que crescem descontroladamente, ultrapassando seus limites naturais e, eventualmente, invadindo tecidos próximos e disseminando-se para outros órgãos por meio do processo denominado metástase (Paho, 2020). O câncer é predominantemente, mas não unicamente, uma doença de origem genética. Fenômenos internos e externos, ou a combinação destes, podem culminar no desenvolvimento de neoplasias. Dentre os fatores externos, destacam-se os fatores ambientais como, por exemplo, a exposição a agentes carcinogênicos, mas não menos importantes, pode-se citar também fatores como hábitos alimentares e socioculturais que podem desencadear tais doenças.

Os agentes carcinogênicos são produtos de natureza química, física ou biológica, que podem vir a causar câncer. A atuação destes se dá, principalmente, pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem ação lesiva sobre o DNA. As EROs interagem com as bases

nitrogenadas e desoxirribose, desencadeando reações oxidativas significativas que podem resultar em mutações, carcinogênese, apoptose, necrose e doenças genéticas. Esse processo conduz à fragmentação do DNA, sendo ocasionada pela ruptura dos nucleossomos, o que causa perturbações na compactação e na organização do DNA dentro da cromatina (Juan *et al.*, 2021). Além dos danos ao DNA, as EROs podem promover peroxidação lipídica de ácidos graxos (como, por exemplo, os fosfolipídeos de membrana) e a oxidação de proteínas (a exemplo, enzimas) levando, assim, ao comprometimento do metabolismo funcional nas células (Hawkins; Davies, 2019; Ito; Sono; Ito, 2019).

As células cancerígenas passam por uma série de mudanças que possibilitam a formação de tumores, os quais podem assumir diferentes comportamentos devido a alterações, principalmente genéticas, subjacentes a essa transformação (Robinson; Schiemann, 2022). (Hanahan; Weinberg (2000) sugeriram, inicialmente, seis alterações identificáveis nas células cancerígenas, as quais denominaram “*Hallmarks*” do câncer, sendo elas a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual. Com o passar dos anos, esses *Hallmarks* do câncer foram revisitados por outros pesquisadores, aos quais foram adicionadas novas características.

A carcinogênese é um processo complexo que ocorre em múltiplas etapas e pode abranger um número significativo de genes, envolvendo mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, onde os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (Baviskar *et al.*, 2021).

O processo de carcinogênese pode ser subdividido em três etapas distintas: iniciação, promoção e progressão (Tewari *et al.*, 2018). Na etapa de iniciação, ocorrem alterações genéticas induzidas por agentes carcinogênicos que, se não reparadas, podem levar a uma subsequente mutação. A etapa de promoção consiste na indução da proliferação celular por agentes promotores, que contribuem para a manutenção de mutações e promovem alterações no controle do crescimento celular. O estágio de progressão tem a característica de

irreversibilidade, onde um fenótipo celular neoplásico é estabelecido através de mutações em genes do controle do ciclo e crescimento celular, e já não dependem mais de estímulos para a proliferação celular, apresentando crescimento desordenado. Deste modo, o câncer desenvolve-se como resultado da acumulação de mutações somáticas, sendo encontradas, também, características epigenéticas anormais (Iranzo; Martincorena; Koonin, 2018; Sun; Zhang; Gao, 2022)

1.2. Câncer do Colo do Útero

O câncer do colo do útero é predominantemente causado por infecções persistentes pelo Papilomavírus Humano (HPV). Dos 200 tipos de HPV identificados, 15 foram designados como carcinogênicos pela Agência Internacional de Investigação do Câncer, sendo o HPV-16 e o HPV-18, juntos, responsáveis por, aproximadamente, 70% dos casos de câncer do colo do útero (Johnson *et al.*, 2019).

Em 2022, estima-se que 660.000 mulheres tenham sido diagnosticadas com câncer do colo do útero em todo o mundo, e que cerca de 350.000 mulheres tenham morrido da doença (Iarc, 2024). Mais de 90% dos casos ocorrem em pacientes de países menos desenvolvidos, onde programas profiláticos primários (vacinação) ou secundários (triagem) não estão amplamente disponíveis ou não existem (Siegel *et al.*, 2022). Em outros números, esses dados nos informam que, em cada 20 mulheres diagnosticadas com câncer do colo do útero, 11 delas evoluíram para óbito em 2022. No Brasil, foram previstos 17.010 novos casos por ano, para o triênio de 2023-2025. Excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o sexto tipo de câncer mais frequente dentre todos os tipos de câncer, e na população feminina, este câncer é o 3º mais frequente (atrás apenas do câncer de mama e colorretal), e a quarta causa de morte de mulheres por câncer (Inca, 2024) (**Figura 1**).

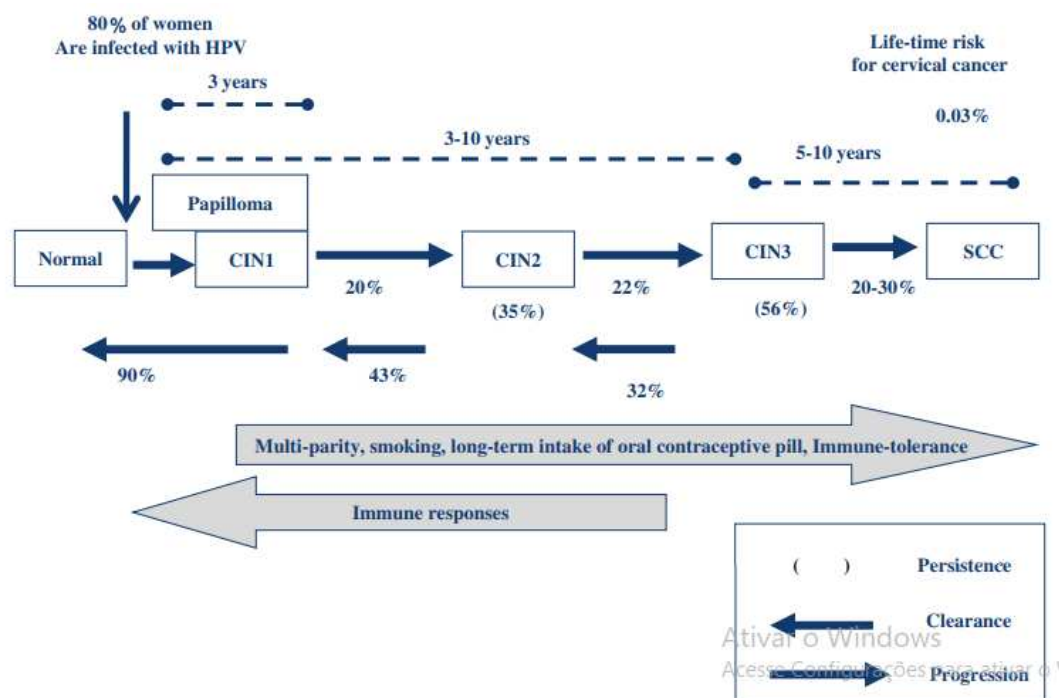
Figura 1. Os 10 tipos de câncer mais incidentes em mulheres, estimados para o triênio de 2023-2025, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma.

	Localização Primária	Casos	%
Mulheres 	Mama feminina	73.610	30,1%
	Côlon e reto	23.660	9,7%
	Colo do útero	17.010	7,0%
	Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
	Glândula tireoide	14.160	5,8%
	Estômago	8.140	3,3%
	Corpo do útero	7.840	3,2%
	Ovário	7.310	3,0%
	Pâncreas	5.690	2,3%
	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: Adaptado de Inca, 2023.

A maior parte dos casos de infecção pelo HPV são resolvidas em um período de até 2 anos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Entretanto, alguns fatores colaboram para a persistência da infecção pelo vírus, o que leva ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e, eventualmente, ao câncer cervical. Cofatores conhecidos associados à progressão da doença incluem a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras condições imunossupressoras, como tabagismo, multiparidade e uso prolongado de contraceptivos orais (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020) (**Figura 2**).

Figura 2. O curso natural da infecção pelo Papilomavírus Humano ao desenvolvimento do câncer cervical.



Fonte: Adaptado de Sasagawa; Takagi; Makinoda, 2012.

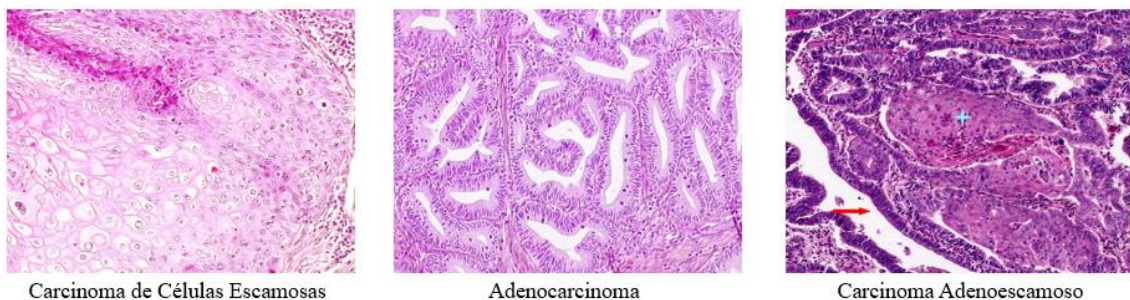
As lesões pré-neoplásicas do colo do útero são denominadas lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL), cada uma com características citológicas distintas: LSIL está tipicamente associada a displasia leve e autolimitada e está frequentemente associada a tipos de papilomavírus humano (HPV) de baixo risco, enquanto a HSIL indica displasia moderada a grave e está predominantemente associada a tipos de HPV de alto risco (De Brot *et al.*, 2017).

As lesões intraepiteliais de baixo grau são caracterizadas por alterações colicíticas e atipia nuclear discreta. Tipicamente apresenta uma menor taxa de positividade para HPV de alto risco em comparação com lesões intraepiteliais de alto grau (cerca de 80,2%) (Barron *et al.*, 2014). Entretanto, as HSIL apresentam atipias nucleares significativas, aumento da relação núcleo/citoplasma e figuras mitóticas anormais. Taxas mais elevadas de positividade para HPV de alto risco (aproximadamente 92,6%) e uma maior probabilidade de detectar lesões NIC 2/3 (70,5%) (Barron *et al.*, 2014; Segura *et al.*, 2019). Enquanto a LSIL é frequentemente autolimitada, a HSIL requer uma monitorização e intervenção rigorosas devido ao seu potencial de progressão para câncer invasivo. No

entanto, alguns estudos sugerem que nem todos os HSIL irão progredir, indicando a necessidade de estratégias individualizadas de gerenciamento de pacientes (Alrajjal *et al.*, 2021).

Os cânceres de colo do útero, por sua vez, não são todos iguais. Existem diferentes tipos de câncer cervical, sendo subdividido em três tipos: o carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o carcinoma adenoescamoso. O Carcinoma de células escamosas é responsável por aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical, seguido do adenocarcinoma, responsável por aproximadamente 20% dos casos e, em menores proporções, o carcinoma adenoescamoso, responsável por aproximadamente 10% dos casos (Liu *et al.*, 2022).

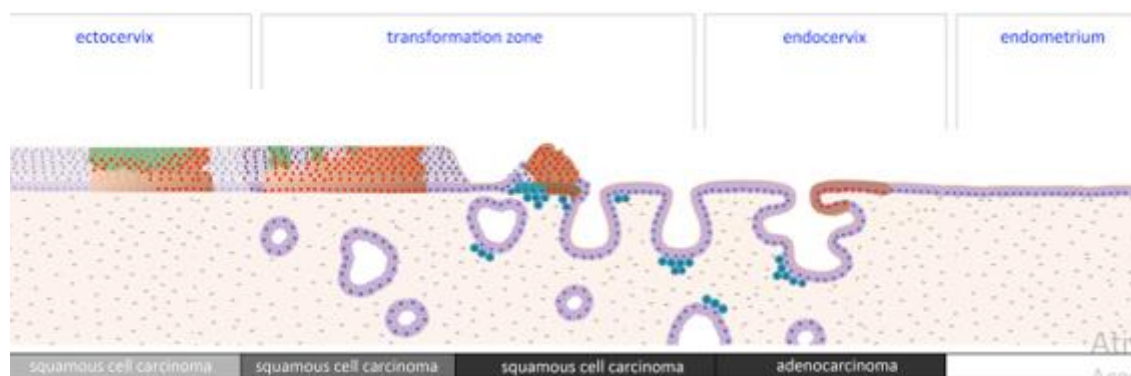
Figura 3. Características microscópicas dos diferentes tipos de Câncer do Colo do Útero.



Fonte: Adaptado de Iarc, 2004.

Os cânceres de colo do útero apresentam três vias de progressão, o desenvolvimento de cada tipo de câncer depende da natureza da célula inicialmente infectada. O carcinoma de células escamosas tem sua origem principalmente das células epiteliais escamosas da ectocérvice e das células epiteliais colunares metaplásicas da junção escamocolunar. O adenocarcinoma do colo do útero é originado, principalmente, das células epiteliais colunares da endocérvice (Doorbar; Griffin, 2019). Quanto a origem do carcinoma adenoescamoso de colo uterino, alguns autores argumentam a favor de uma origem de células-tronco, no caso, células de reserva cervical, outros estudos apoiam a visão de que esses são tumores mistos de origem monoclonal, mas a ideia da origem a partir de células de reserva cervical ainda é a mais aceita (Quddus *et al.*, 2014) (Figura 4).

Figura 4. Diversidade de sítios de infecção pelo HPV no cérvix uterino, e tipos de câncer de acordo com as células infectadas.



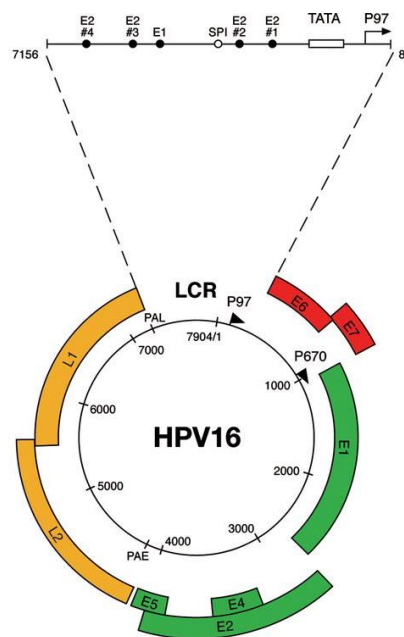
Fonte: Adaptado de Doorbar; Griffin, 2019.

1.3. Carcinogênese cervical associada à infecção genital por HPVs de Alto Risco

Os papilomavírus humanos (HPVs) são vírus de DNA de fita dupla considerados agentes centrais do tecido epitelial, pois causam câncer em vários tecidos epiteliais vulneráveis, incluindo o colo do útero, o ânus e a orofaringe, sendo o câncer cervical o mais significativo em termos de números (Akinyi *et al.*, 2024.]; Kreimer *et al.*, 2013)

O genoma viral do HPV é dividido em três regiões: (1) região inicial (E) - contendo os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão associados à replicação viral; (2) região tardia (L), que codifica as proteínas do capsídeo principal (L1) e secundária (L2) ; e (3) uma região não codificadora (NCR), também conhecida como região de controle longa (LCR), que está localizada entre os quadros de leitura abertos (ORFs) L1 e E6 (Araldi *et al.*, 2018) (**Figura 5**).

Figura 5. Organização do genoma do HPV.



Fonte: Adaptado de Doorbar, 2006.

Já foram relatados mais de 200 tipos de papilomavírus que infectam humanos, podendo todos estes induzirem lesões proliferativas benignas. Entretanto, alguns tipos, classificados como de alto risco oncogênico, são amplamente relacionados com o surgimento de vários tipos de cânceres, sendo estes os HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (Szymonowicz; Chen, 2020; Tommasino, 2014).

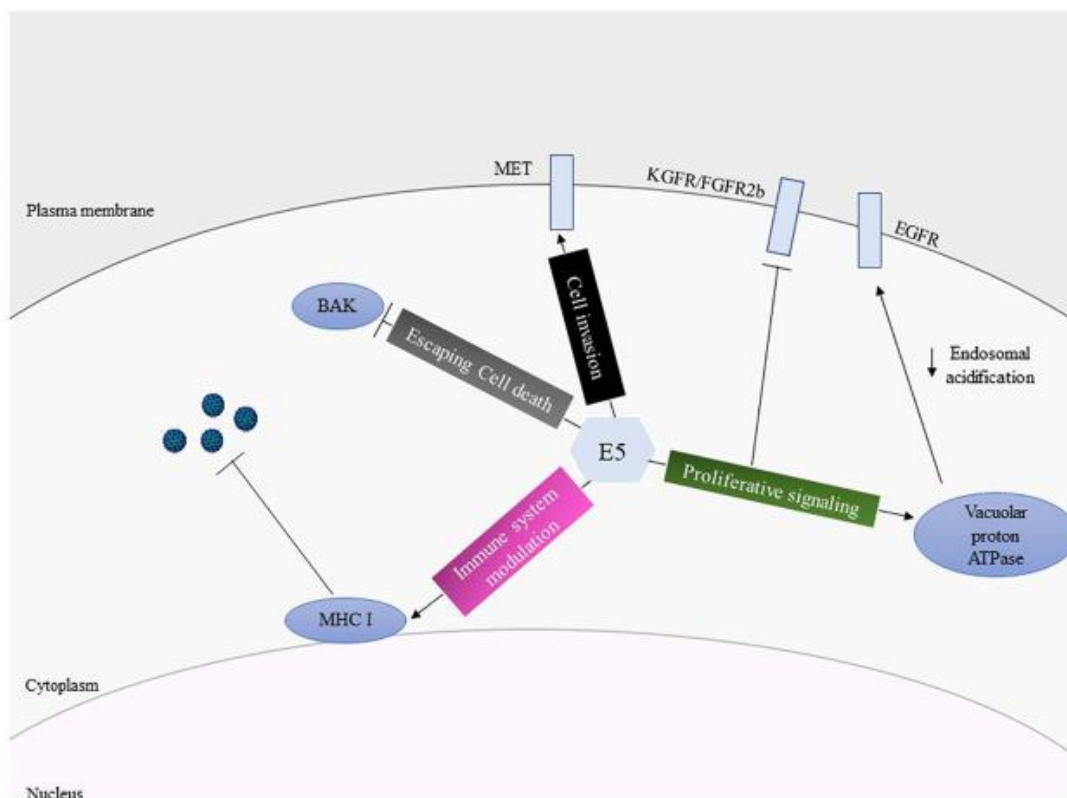
Cerca de 80% das pessoas com vida sexual ativa, tanto homens quanto mulheres, terão uma infecção por HPV em algum momento de suas vidas, podendo ser infectadas com HPV de baixo ou alto risco e geralmente se infectam com HPV logo após o início da atividade sexual. Na maioria massiva das infecções pelo HPV, o sistema imunológico elimina o vírus, mas para alguns, a infecção persiste e pode levar a alterações pré-cancerígenas, devido as células infectadas com HPV de alto risco terem sua taxa de proliferação aumentada e, com o tempo, se essas células não forem eliminadas pelo sistema imunológico, podem formar lesões pré-neoplásicas ou, eventualmente, um câncer (Szymonowicz; Chen, 2020). Dessa forma, entender como o HPV pode alterar o ciclo celular das células infectadas não somente nos faz compreender o processo de carcinogênese a ele associado, como também lança luz sobre

possíveis alvos terapêuticos a serem explorados na prevenção e tratamento do câncer do colo do útero.

A carcinogênese viral do HPV está relacionada à ação de algumas de suas proteínas, a citar as oncoproteínas E5, E6 e E7. A oncoproteína E5 interage com a ATPase vacuolar aumentando o pH endossomal inibindo, assim, a degradação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), o que promove o aumento desses receptores na superfície das células (Disbrow; Hanover; Schlegel, 2005; Staurengo-Ferrari *et al.*, 2018), levando-as a responder de forma positiva ao estímulo de proliferação do EGF. Além disso, a E5 também se transloca para o retículo endoplasmático e para o complexo de Golgi, promovendo a detenção das moléculas de MHC de classe I, mediando, assim, o escape das células infectadas do sistema imune e a persistência da infecção pelo HPV (Ashrafi *et al.*, 2006).

Ademais, a oncoproteína E5 promove a ubiquitinação de Bax, uma proteína pró-apoptótica, o que faz com que as células transformadas evadam da morte celular (Oh *et al.*, 2009). Foi também observado que a E5 se correlaciona com a desfosforilação da conexina 43, uma das principais proteínas que compõem a junção comunicante, o que pode culminar na perda da interação célula-célula, facilitando, assim, o processo de transição epitélio-mesenquimal e, conseqüentemente, a metástase (Oelze *et al.*, 1995) (**Figura 6**).

Figura 6. Mecanismos moleculares da carcinogênese cervical associada à oncoproteína E5 dos hrHPVs.



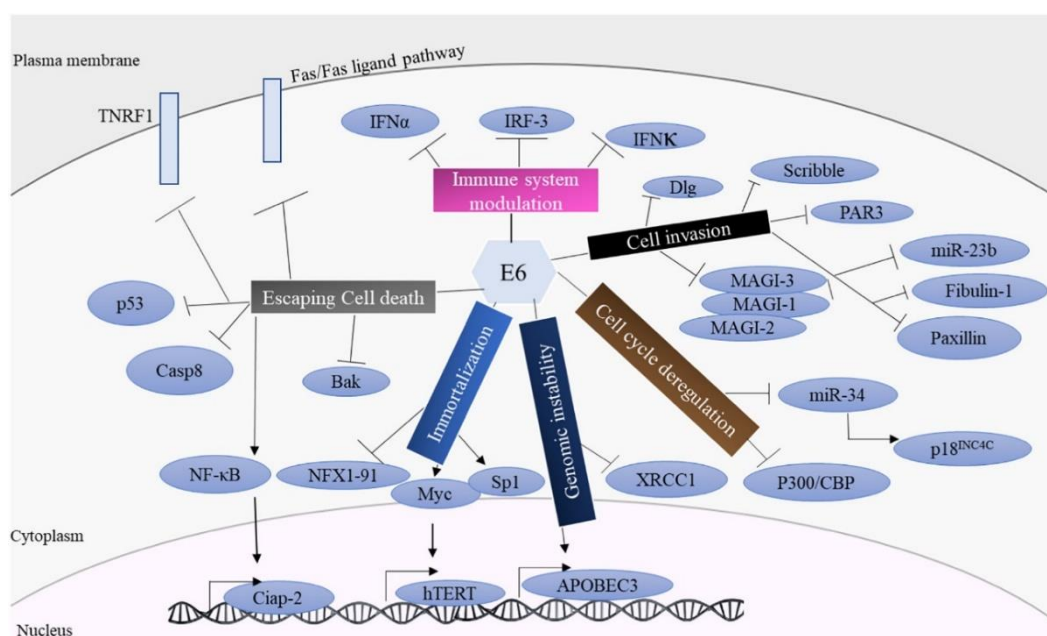
Fonte: Estêvão *et al.*, 2019.

A oncoproteína E6, por sua vez, também dispõe de mecanismos próprios que culminam na carcinogênese. Ela pode induzir a ativação transcricional do gene da telomerase, fazendo com que os telômeros continuem sendo produzidos mesmo após as mitoses, contribuindo assim para a imortalização celular (Tommasino, 2014). Além disso, a E6 também promove a regulação positiva de FOXM1, fator de transcrição que promove aumento da expressão de genes relacionados à proliferação celular, tais como da Ciclina B1, D1 e Cdc25, aumentando, assim, a taxa de proliferação das células infectadas (Chen *et al.*, 2014). Além disso, a regulação positiva de FOXM1 promove, também, a translocação da β -catenina para o núcleo celular, favorecendo o processo de transição epitélio-mesenquimal e, por consequência, metástase (Chen *et al.*, 2017).

Adicionalmente, a E6 pode se complexar com a ubiquitina ligase E6AP e com p53, uma importante proteína supressora de tumor que é regulada positivamente em resposta a danos ao DNA, formando o complexo ternário E6-

E6AP-p53, conduzindo a proteína p53 à degradação proteossomal, reduzindo assim os níveis celulares desta proteína, ficando, dessa forma, as células infectadas sem reparo do DNA, o que pode promover acúmulo de mutações e consequente transformação dessas células (Liu *et al.*, 2022; Zanier *et al.*, 2005). Ademais, a oncoproteína E6 se liga ao fator regulador de interferons 3 (IRF-3), um fator de transcrição que promove a expressão de interferons α e β , o que resulta na regulação negativa de interferon- β , impedindo, assim, a resposta imune antiviral, o que contribui para a permanência do vírus e, por consequência, o desenvolvimento de câncer (Ronco *et al.*, 1998) (Figura 7).

Figura 7. Mecanismos moleculares da carcinogênese cervical associada à oncoproteína E6 dos hrHPVs.



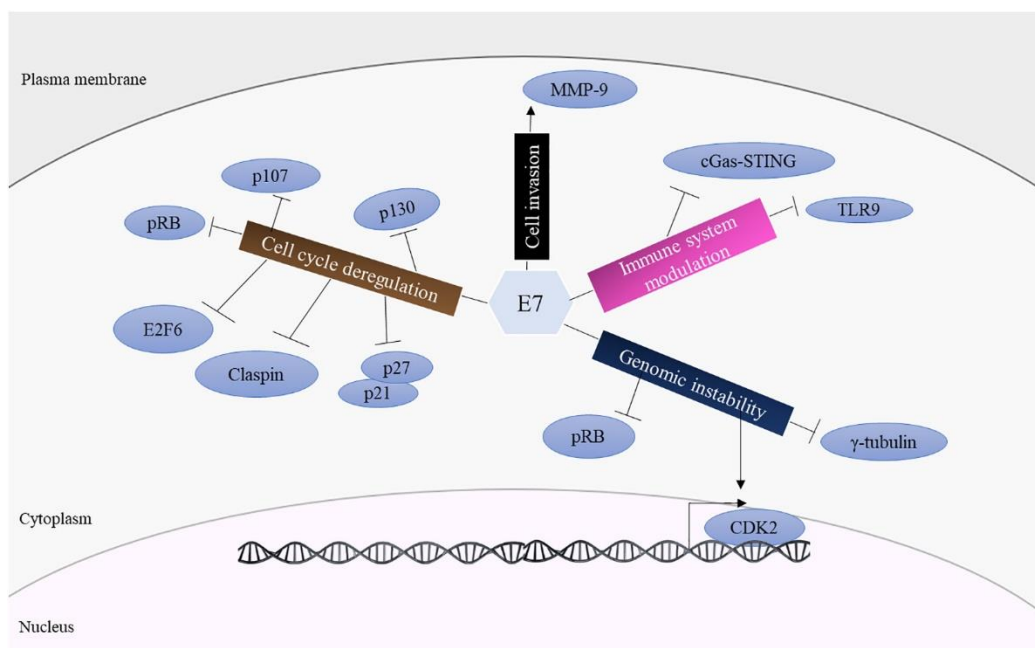
Fonte: Estêvão *et al.*, 2019.

A oncoproteína E7 dos HPVs de alto risco também é uma importante figura na transformação das células infectadas. Seu principal mecanismo carcinogênico se dá pela sua ligação ao motivo conservado LXCXE da proteína supressora de tumor pRb, o que resulta em sua fosforilação e no desligamento desta proteína do fator de transcrição E2F (Helt; Galloway, 2001; Moody; Laimins, 2010). Uma vez desligado da pRb, o E2F se transloca para o núcleo das células, promovendo o aumento da expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, tais como das ciclinas A, E, D1, D2 e D3,

aumentando a taxa proliferativa das células infectadas (Ferraro *et al.*, 2011; Sacco; Siepi; Crescenzi, 2003; Tommasino, 2014).

Em suma, a oncoproteína E7 também tem ação moduladora sobre o sistema imune, pois a mesma é capaz de se ligar e inibir o TLR9, além de ser capaz também de bloquear a via cGas-STING, ambos detectores de DNA citoplasmático (Hasan *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2015). Também foi evidenciado que a E7 promove aumento da expressão da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) durante a progressão do câncer cervical, enzima que tem como função a degradação de matriz extracelular, o que facilita a invasão celular e, conseqüentemente, a metástase (Cardeal *et al.*, 2012). Além disso, a E7 também pode causar instabilidade genômica por meio da degradação da γ -tubulina, uma proteína crucial dos centríolos, como também pelo aumento da atividade da CDK2 (He *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2007) (**Figura 8**).

Figura 8. Mecanismos moleculares da carcinogênese cervical associada à oncoproteína E7 dos hrHPVs.



Fonte: Estêvão *et al.*, 2019.

O conjunto de alterações metabólicas e genéticas promovidas pelas oncoproteínas E5, E6 e E7 dos HPV de alto risco em células infectadas, tais como o aumento da taxa proliferativa das células infectadas, juntamente ao bloqueio dos mecanismos de reparo ao DNA lesado, tornam-nas susceptíveis a

mutações que podem resultar na transformação permanente dessas células. Como consequência de um crescimento descontrolado, não responsivo a sinais de inibição de crescimento, mais mutações são acumuladas, mecanismo pelo qual os cânceres cervicais se desenvolvem.

1.4. Imunomodulação no microambiente tumoral pelas células cancerígenas

O microambiente tumoral (TME) é constituído, além de células tumorais, por diversas células imunitárias circundantes, vasos sanguíneos, matriz extracelular, fibroblastos, linfócitos e células inflamatórias originadas da medula óssea, além de moléculas de sinalização (Del Prete *et al.*, 2017; Spill *et al.*, 2016). As interações entre células malignas e não malignas geram um microambiente tumoral que influencia significativamente o desenvolvimento e a progressão do câncer (Fang *et al.*, 2022).

Os componentes do TME desempenham importantes funções para a manutenção e desenvolvimento dos tumores. As células endoteliais presentes estão envolvidas no processo de angiogênese tumoral ativa, objetivando a sustentação nutricional do tecido tumoral, bem como garantindo um meio de escape de células cancerígenas para a circulação sistêmica, permitindo a instalação de um novo tumor em um local distante (Arneth, 2019; Grivennikov; Greten; Karin, 2010). Outras componentes protagonistas do microambiente tumoral são as células do sistema imune, tais como macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, das quais, os componentes mais numerosos são os macrófagos (Mamtimin *et al.*, 2022).

As células cancerígenas têm a capacidade de utilizar subprodutos metabólicos para influenciar as funções das células imunitárias que se infiltram no tumor em seu próprio benefício, como por exemplo, o lactato produzido por células cancerígenas com atividade glicolítica, que é uma estratégia frequentemente utilizada para favorecer a polarização das células imunitárias em direção a um fenótipo imunossupressor (Angelin *et al.*, 2017; Colegio *et al.*, 2014). Dessa forma, as células cancerígenas se aproveitam desses mecanismos para promover um ambiente imunologicamente suprimido que as ajuda a evadir do sistema imunológico e a favorecer sua sobrevivência e crescimento do tumor.

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) formam uma população celular altamente variável e adaptável no microambiente tumoral, chegando a compor até 50% dos componentes celulares de alguns tumores sólidos. Em grande parte dos casos, os TAMs promovem a progressão da doença e contribuem para a resistência à terapia, fornecendo às células malignas suporte trófico e nutricional essencial (Vitale *et al.*, 2019). Um dos principais modos pelos quais as células cancerígenas condicionam os macrófagos para um fenótipo imunossupressor é através da liberação do fator estimulador de colônias 1 (CSF1), que, através da sua ligação com seu receptor, promove a polarização dos TAMs para um estado semelhante a M2 (Mantovani *et al.*, 2017).

Além disso, as citocinas IL-4 e IL-13, características do perfil Th2 de resposta imune, são abundantemente secretadas no TME favorecendo, assim, o acúmulo e manutenção de TAMs M2. Ademais, a fagocitose de células tumorais mortas por TAMs ocorre via LAP (Fagocitose Associada a LC3), um tipo de fagocitose envolvido na absorção de conteúdo extracelular indesejado, reforçando assim o estado M2, com concomitante supressão da sinalização de interferons do tipo I (Cunha *et al.*, 2018; Galluzzi *et al.*, 2017).

Os macrófagos associados a tumores polarizados em M2 secretam uma diversidade de citocinas e quimiocinas com propriedades anti-inflamatórias. Essas substâncias têm a capacidade de inibir a maturação das células dendríticas, limitando, conseqüentemente, a apresentação de antígenos (Ruffell *et al.*, 2014). Em suma, os TAMs M2 favorecem o recrutamento de células Treg (T reguladoras), bem como induzem a diferenciação de células T indiferenciadas já presentes no tumor para o perfil regulatório, que são conhecidas por exercerem efeitos imunossupressores no microambiente tumoral (Cassetta; Pollard, 2018).

O TME é uma ecologia complexa que consiste em células que evoluem com células cancerígenas e fornecem suporte durante a transformação maligna; além das células malignas, o TME contém células dos linfáticos, vasculatura tumoral e sistema imunológico, bem como adipócitos e fibroblastos, podendo essas células serem recrutadas para o tumor e estarem presentes em todas as fases do desenvolvimento e progressão do tumor (Arneth, 2019).

1.5. Caquexia Associada ao Câncer

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome complexa caracterizada pela perda significativa de peso, massa muscular e gordura corporal, que ocorre em pacientes com câncer. Essa condição não é apenas uma consequência da desnutrição, mas sim um distúrbio metabólico multifatorial que afeta a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes (Zhu et al., 2020). Estima-se que até 80% dos pacientes com câncer avançado apresentem algum grau de caquexia, tornando-a uma preocupação clínica significativa (Rivas et al., 2024).

A caquexia do câncer não só afeta negativamente a qualidade de vida de pacientes com câncer, mas também reduz a eficácia da quimioterapia anticâncer e aumenta sua toxicidade, levando ao aumento da mortalidade relacionada ao câncer e ao gasto de recursos médicos (Ni; Zhang, 2020). A perda de peso e a fraqueza muscular podem levar a complicações adicionais, como infecções, hospitalizações prolongadas e, em última análise, uma redução na sobrevida. Além disso, a caquexia está frequentemente associada a sintomas como fadiga, dor e depressão, que podem agravar ainda mais a qualidade de vida do paciente (Virgens et al., 2020).

A fisiopatologia da caquexia associada ao câncer é complexa e envolve uma interação entre fatores tumorais e do indivíduo. A base da caquexia associada ao câncer reside na presença de um estado inflamatório crônico, mediado por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TGF- β e GDF-15, que ativam várias vias de sinalização que promovem o catabolismo proteico e a disfunção metabólica (Yakovenko; Cameron; Trevino, 2018). Essas substâncias podem induzir a resistência à insulina, aumentar a lipólise (quebra de gordura) e a proteólise (quebra de proteínas), resultando em perda de massa muscular e gordura (Meex; Blaak; Loon, 2019). Além disso, a alteração no apetite e na absorção de nutrientes, frequentemente observada em pacientes com câncer, contribui para o estado de caquexia.

O tratamento da caquexia associada ao câncer é desafiador e requer uma abordagem multidisciplinar. Algumas estratégias emergentes incluem intervenções nutricionais, o emprego de agonistas do apetite, uso de anti-inflamatórios, exercício físico, terapias farmacológicas, como os moduladores do

metabolismo e agentes anabólicos e terapias combinadas, como a combinação de intervenções nutricionais, farmacológicas e de exercícios (Argilés et al., 2017).

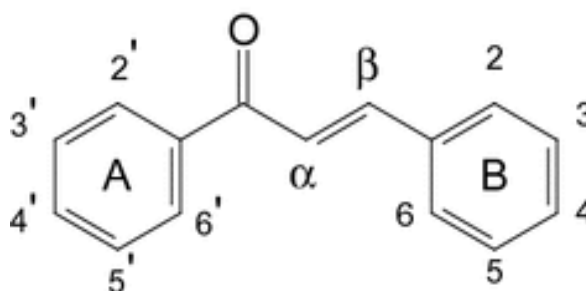
A caquexia associada ao câncer é uma condição debilitante que requer atenção especial no manejo do paciente oncológico. A compreensão de sua fisiopatologia e a implementação de tratamentos emergentes são essenciais para melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes afetados.

1.6. Potencial terapêutico da *Trans*-Chalcona

As chalconas consistem em uma cetona aromática, consideradas precursores biogénéticos de flavonoides e isoflavonoides (Rammohan *et al.*, 2020). Abundantes em plantas, são sintetizadas a partir do aminoácido L-fenilalanina, que passa por diversas modificações estruturais até formar o intermediário p-cumaril-CoA. Esse intermediário reage com três moléculas de malonil-CoA, em um processo catalisado pela enzima chalcona sintase, culminando na formação do esqueleto estrutural das chalconas (Agra *et al.*, 2024; Fonsêca, 2012). As chalconas podem ser transformadas em auronas, originando pigmentos amarelos que conferem coloração às flores ou podem ainda ser convertidas em naringenina, um precursor fundamental na biossíntese de todos os flavonoides. Além disso, desempenham um papel essencial em vias de sinalização e estão envolvidas em processos de simbiose (Díaz-Tielas *et al.*, 2016).

O núcleo das chalconas é composto de dois anéis aromáticos (A e B) que são ligados por um sistema carbonil de três carbonos α , β -insaturado, ou seja, derivado de 1,3-difenil-2-propen-1-ona (Figura 9). Estereoquimicamente, a chalcona pode existir tanto em isômeros *trans* (*E*) quanto *cis* (*Z*), sendo o isômero *trans* o mais estável termodinamicamente e *cis* mais instável devido aos efeitos estéricos do anel A com grupo carbonila. A conjugação contínua dos dois anéis aromáticos e o sistema carbonil eletrofílico contribui para o baixo potencial redox, estabilidade, reações de transferência de elétrons e atividades biológicas promissoras das chalconas (da Silva *et al.*, 2023)

Figura 9. Representação estrutural e numérica da *trans*-Chalcona. Os anéis aromáticos (A e B) estão ligados através do grupo carbonil α , β -insaturado.



Diversos estudos tem revelado a ampla gama de atividades farmacológicas da *trans*-chalcona, tais como antimicrobiana (Bitencourt *et al.*, 2013, 2019), anti-inflamatória (Ale-Ebrahim *et al.*, 2022; Javadi *et al.*, 2023; Karimi-Sales *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2017b, 2017a; Staurengo-Ferrari *et al.*, 2018) neuroprotetora Dhakal *et al.*, (2021), antiparasitária (Batiha *et al.*, 2019; Miranda-Sapla *et al.*, 2019) e anticâncer (Bortolotto *et al.*, 2017; da Silva *et al.*, 2023; Hong *et al.*, 2023; Komoto *et al.*, 2023; Senrunga *et al.*, 2023; Siqueira *et al.*, 2021). Recentemente, em nosso laboratório, foi evidenciado que a *trans*-chalcona apresenta atividade antiproliferativa sobre as linhagens de câncer cervical HeLa e SiHa (dados ainda não publicados).

Quando avaliado no modelo de osteossarcoma *in vitro* em células U-2 OS, a *trans*-chalcona foi capaz de reduzir a viabilidade celular a partir de 10 μ M após 48 h de tratamento, além de induzir condensação de núcleos, indicando apoptose celular, e aumentar a atividade da caspase 3/7 em 50 μ M. O tratamento com *trans*-chalcona também levou a regulação negativa de Sp1 no nível transcricional, e aumentou a expressão de p53 no nível pós-traducional tanto em células U-2 OS, bem como em células A549 (câncer de pulmão), FaDu (câncer oral) e HCT-116 (câncer colorretal). Para fins de comparação, foi demonstrado que a indução de p53 foi observada como consideravelmente maior em células tratadas com *trans*-chalcona quando comparado a 4-hidroxichalcona, sugerindo que a regulação dessas proteínas pode resultar da estrutura do backbone da chalcona, não do grupo hidroxila (Silva *et al.*, 2016). Em complementar, os autores avaliaram que a *trans*-chalcona é capaz de inibir a expressão da exportina 1 (CRM1), receptor de exportação nuclear envolvido no transporte ativo de supressores de tumor, além de aumentar a expressão de HSP40, favorecendo a manutenção celular, culminando em acúmulo de p53 no núcleo

(Silva *et al.*, 2018, p. 53).

O efeito da *trans*-chalcona também foi determinado em células 3T3 (fibroblasto murino) e MCF-7 (câncer de mama), no qual foi capaz de induzir aumento de LDH extracelular e dano ao DNA em células MCF-7, mas não em células 3T3. Quando avaliado o ciclo celular, *trans*-chalcona induziu parada em fase G1, bem como morte celular por apoptose de maneira dose dependente. O efeito pró-apoptótico foi confirmado quando avaliado inibição de Bcl-2 e indução de BAX, indicando indução de apoptose mediada pela via intrínseca. Em complementar, os autores avaliaram que o tratamento com *trans*-chalcona levou a degradação acentuada da ciclina D1, clivagem de PARP e indução de CIDEA (Bortolotto *et al.*, 2017).

Komoto et al (2018) também avaliaram que em células de câncer de mama MCF-7 (53,73 μM) e BT-20 (26,42 μM) a *trans*-chalcona reduziu a viabilidade celular, reprimiu genes relacionados resistência a múltiplas drogas (ABCC1 e ABCG2), apoptose e ciclo celular (Bcl-2 e MDM4), fator de crescimento (EGFR) e metástase (AURKA), bem como inibiu a expressão da proteína AURKA em células MCF-7 e reduziu a migração celular Komoto *et al* (2018). Em complementar, Komoto *et al* (2023) também avaliaram que em células MCF-7 a *trans*-chalcona (53,73 μM) alterou a expressão de miRNAs, envolvidos com as vias de sinalização MAPK, Ras e PI3K-Akt. Dentre os miRNAs avaliados, miRNAs oncogênicos (miR-27a-3p e miR-891a-5p) e supressores de tumor (miR-25-5p e miR-449a) demonstraram expressão alterada após tratamento (Komoto *et al.*, 2023). No modelo *in vitro* utilizando células de câncer de mama triplo-negativo humano (BT-20 e MDA-MB-231), a *trans*-chalcona também reduziu o número de células viáveis após o tratamento com 30 μM por 24 h e aumentou a expressão de heme oxigenase-1 (HO-1). Enquanto no modelo *in vivo*, após inoculação de células BT-20 (xenoenxerto) e administração oral de *trans*-chalcona (via gavagem) 3 vezes por semana durante 4 semanas (5 mg/kg e 50 mg/kg), houve redução do peso e volume tumoral, bem como aumento na expressão de HO-1 no tecido tumoral (Komoto *et al.*, 2021).

No modelo *in vitro* de carcicoma hepatocelular (HuH7.5), o tratamento com *trans*-chalcona reduziu a viabilidade celular, sendo determinada uma concentração inibitória (IC₅₀) de 53 μM e 23.66 μM para 24 h e 48 h, respectivamente, sem induzir hemólise em eritrócitos. *Trans*-chalcona também

foi capaz de aumentar os níveis de ERO e induzir despolarização do potencial de membrana mitocondrial. Como consequência, houve inibição da capacidade metastática, parada no ciclo celular na fase G0/G1, aumento dos níveis de p53, redução de β -catenina, culminando em morte celular por autofagia (Siqueira *et al.*, 2021).

Recentemente, em nosso laboratório, foi evidenciado que a *trans*-Chalcona apresenta atividade antiproliferativa frente as linhagens celulares de câncer cervical HeLa e SiHa (dados não publicados). Diante desse fato, e do potencial antineoplásico da *trans*-chalcona, este estudo buscou avaliar sua atividade antitumoral e imunomoduladora e seu efeito sobre parâmetros de caquexia *in vivo* em modelo de tumor murino associado ao HPV-16.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de colo do útero é o terceiro mais diagnosticado entre as mulheres, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, e a segunda principal causa de morte por câncer dentre essa população, tendo estimativa de 704 mil novos casos no Brasil até o ano de 2025.

As estratégias atuais de tratamento do câncer do colo do útero incluem cirurgia, radioterapia, imunoterapia, terapia endócrina e quimioterapia. Apesar da quimioterapia ser eficaz, observa-se cada vez mais frequente resistência ao tratamento entre as pacientes. Isso se dá, principalmente, devido à capacidade adquirida das células cancerígenas de resistirem à ação de fármacos por alguns mecanismos, tais como a degradação enzimática destes, bem como a promoção do efluxo destes das células, neutralizando a ação daqueles medicamentos que possui atividade intracelular.

O microambiente tumoral é uma linha de pesquisa emergente, visto que este ambiente, que apresenta uma vasta variedade de células, contribui para mecanismos de resistência e de invasão de células cancerígenas no tecido no qual o tumor está localizado, bem como no escape dessas células para a corrente sanguínea, fenômeno que possibilita a instalação de novos tumores em locais distante daquele de origem.

A *trans*-chalcona é um composto natural de origem vegetal que tem se demonstrado muito interessante do ponto de vista farmacológico, e apresenta fácil síntese com alto rendimento. Durante os últimos anos, muito se tem pesquisado sobre a atividade biológica deste composto, sendo evidenciadas atividades antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, neuroprotetora e, principalmente, no contexto desta pesquisa, atividade anticâncer.

Deste modo, e com base na ausência de estudos sobre a atividade antitumoral e imunomoduladora da *trans*-chalcona *in vivo*, esta pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade antitumoral, imunomoduladora e efeitos do tratamento sobre parâmetros de caquexia em modelo de tumor cervical de células TC-1 em camundongos C57BL/6.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral e imunomoduladora da *Trans*-Chalcona e efeitos do tratamento sobre parâmetros de caquexia em modelo murino de câncer cervical.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antitumoral da trans-chalcona por meio da mensuração do volume e da densidade do tumor;
- Verificar alterações histopatológicas no tecido tumoral promovidas pelo tratamento com a trans-chalcona, por meio da coloração com hematoxilina/eosina;
- Investigar se o tratamento com a trans-chalcona promove alterações oxidativas no tecido tumoral, por meio da determinação dos níveis de Ânion Superóxido, Óxido Nítrico, Peroxidação Lipídica, FRAP e ABTS;
- Avaliar a atividade imunomoduladora da trans-chalcona sobre o microambiente tumoral, por meio das análises de quantificação de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17;
- Investigar o efeito do tratamento com a *Trans*-Chalcona no surgimento de parâmetros de caquexia associada ao câncer no modelo estudado.

4. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. A. *et al.* Síntese e Caracterização de Derivados Fluorados de Chalcona. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2024.
- AINARA SORIA RIVAS *et al.* SEOM clinical guidelines for cancer anorexia-cachexia syndrome (2023). **Clinical & Translational Oncology**, 1 jun. 2024.
- AKINYI, I. *et al.* HPV infection patterns and viral load distribution: implication on cervical cancer prevention in Western Kenya. **European Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], p. 10.1097/CEJ.0000000000000920,
- ALE-EBRAHIM, M. *et al.* Atheroprotective and hepatoprotective effects of trans-chalcone through modification of eNOS/AMPK/KLF-2 pathway and regulation of COX-2, Ang-II, and PDGF mRNA expression in NMRI mice fed HCD. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 3433–3443, 2022.
- ALRAJJAL, A. *et al.* Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. **Cytojournal**, [s. l.], v. 18, 2021.
- ANGELIN, A. *et al.* Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1282-1293.e7, 2017.
- ARALDI, R. P. *et al.* The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 106, p. 1537–1556, 2018.
- ARGILÉS, J. M. *et al.* Novel targeted therapies for cancer cachexia. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 16, p. 2663–2678, 27 jul. 2017.
- ARNETH, B. Tumor Microenvironment. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 15, 2019.
- ASHRAFI, G. H. *et al.* Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. **Virus Research**, [s. l.], v. 120, n. 1–2, p. 208–211, 2006.
- BARRON, S. *et al.* Low-grade squamous intraepithelial lesion/cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL-H) is a unique category of cytologic abnormality associated with distinctive HPV and histopathologic CIN 2+ detection rates. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 239–246, 2014.
- BATIHA, G. E.-S. *et al.* The effects of trans-chalcone and chalcone 4 hydrate on the growth of Babesia and Theileria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. e0007030, 2019.
- BAVISKAR, T. *et al.* Target Genetic Abnormalities for the Treatment of Colon Cancer and Its Progression to Metastasis. **Current Drug Targets**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 722–733, 2021.

BITENCOURT, T. A. *et al.* Trans-chalcone activity against *Trichophyton rubrum* relies on an interplay between signaling pathways related to cell wall integrity and fatty acid metabolism. **BMC genomics**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 411, 2019.

BITENCOURT, T. A. *et al.* Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 13, p. 229, 2013.

BORTOLOTTO, L. F. B. *et al.* Cytotoxicity of trans-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 85, p. 425–433, 2017.

CARDEAL, L. B. da S. *et al.* HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e33585, 2012.

CASSETTA, L.; POLLARD, J. W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 887–904, 2018.

CHEN, P. M. *et al.* Up-Regulation of FOXM1 by E6 Oncoprotein through the MZF1/NKX2-1 Axis Is Required for Human Papillomavirus–Associated Tumorigenesis. **Neoplasia**, v. 16, n. 11, p. 961–971, 1 nov. 2014.

CHEN, P. *et al.* Gpr132 sensing of lactate mediates tumor-macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 580–585, 2017.

COLEGIO, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, [s. l.], v. 513, n. 7519, p. 559–563, 2014.

CUNHA, L. D. *et al.* LC3-Associated Phagocytosis in Myeloid Cells Promotes Tumor Immune Tolerance. **Cell**, [s. l.], v. 175, n. 2, p. 429–441.e16, 2018.

DA SILVA, L. *et al.* Antibacterial potential of chalcones and its derivatives against *Staphylococcus aureus*. **3 Biotech**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1, 2023.

DE BROT, L. *et al.* Infections with multiple high-risk HPV types are associated with high-grade and persistent low-grade intraepithelial lesions of the cervix. **Cancer Cytopathology**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 138–143, 2017.

DEL PRETE, A. *et al.* Leukocyte trafficking in tumor microenvironment. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 35, p. 40–47, 2017.

DHAKAL, S. *et al.* Trans-Chalcone Plus Baicalein Synergistically Reduce Intracellular Amyloid Beta (A β 42) and Protect from A β 42 Induced Oxidative Damage in Yeast Models of Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 17, p. 9456, 2021.

DÍAZ-TIELAS, C. *et al.* BIOLOGICAL ACTIVITIES AND NOVEL APPLICATIONS OF CHALCONES. **Planta Daninha**, [s. l.], v. 34, p. 607–616, 2016.

DISBROW, G. L.; HANOVER, J. A.; SCHLEGEL, R. Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 79, n. 9, p. 5839–5846, 2005.

DOORBAR, J.; GRIFFIN, H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. **Papillomavirus Research (Amsterdam, Netherlands)**, [s. l.], v. 7, p. 176–179, 2019.

ESTÊVÃO, D. *et al.* Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1862, n. 2, p. 153–162, fev. 2019.

FANG, F. *et al.* The tumor immune-microenvironment in gastric cancer. **Tumori**, [s. l.], v. 108, n. 6, p. 541–551, 2022.

FERRARO, C. T. L. *et al.* Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 47, p. 451–459, 2011.

FONSÊCA, P. da S. Síntese e caracterização de chalconas e dichalconas contendo unidades 1,2,3-triazólicas. [s. l.], 2012.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 36, n. 13, p. 1811–1836, 2017.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, [s. l.], v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HASAN, U. A. *et al.* The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 210, n. 7, p. 1369–1387, 2013.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 51, p. 19683–19708, 2019.

HE, W. *et al.* Direct Activation of Cyclin-Dependent Kinase 2 by Human Papillomavirus E7. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 77, n. 19, p. 10566–10574, 2003.

HELT, A.-M.; GALLOWAY, D. A. Destabilization of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by Human Papillomavirus Type 16 E7 Is Not Sufficient To Overcome Cell Cycle Arrest in Human Keratinocytes. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 75, n. 15, p. 6737–6747, 2001.

HONG, Y. *et al.* Novel thrombospondin-1 transcript exhibits distinctive expression and activity in thyroid tumorigenesis. **Oncogene**, [s. l.], v. 42, n. 22, p. 1832–1842, 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Câncer do colo do útero*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/colo-do-utero>. Acesso em: 25 out. 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Cancer fact sheets: all cancers*. Lyon: World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Cervical cancer*. Lyon: World Health Organization, 2024. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/cervical-cancer/>. Acesso em: 26 out. 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Histopathology of the uterine cervix – digital atlas*. Lyon: World Health Organization, 2004. Disponível em: <https://screening.iarc.fr/atlashisto.php?lang=1>. Acesso em: 24 jul. 2024.

IRANZO, J.; MARTINCORENA, I.; KOONIN, E. V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 115, n. 26, p. E6010–E6019, 2018.

ITO, F.; SONO, Y.; ITO, T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 72, 2019.

JAVADI, F. *et al.* Hepatoprotective and antifibrotic effects of trans-chalcone against bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 1194–1201, 2023.

JOHNSON, L. *et al.* Project-Based Inquiry (PBI) Global in Kindergarten Classroom: Inquiring about the World. **Early Childhood Education Journal**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 607–613, 2019.

JUAN, C. A. *et al.* The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.

KARIMI-SALES, E. *et al.* trans-Chalcone prevents insulin resistance and hepatic inflammation and also promotes hepatic cholesterol efflux in high-fat diet-fed rats:

modulation of miR-34a-, miR-451-, and miR-33a-related pathways. **Food & Function**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 4292–4298, 2018.

KOMOTO, T. T. *et al.* Chalcones Repressed the AURKA and MDR Proteins Involved in Metastasis and Multiple Drug Resistance in Breast Cancer Cell Lines. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 2018, 2018.

KOMOTO, T. T. *et al.* Exploring the Therapeutic Potential of trans-Chalcone: Modulation of MicroRNAs Linked to Breast Cancer Progression in MCF-7 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 13, p. 10785, 2023.

KOMOTO, T. T. *et al.* Trans-chalcone suppresses tumor growth mediated at least in part by the induction of heme oxygenase-1 in breast cancer. **Toxicological Research**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 485–493, 2021.

KREIMER, A. R. *et al.* Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 382, n. 9895, p. 877–887, 2013.

LAU, Y. M. *et al.* Prognostic implication of human papillomavirus types and species in cervical cancer patients undergoing primary treatment. **PloS One**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e0122557, 2015.

LIU, P. *et al.* Comparison of survival outcomes between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma/adenosquamous carcinoma of the cervix after radical radiotherapy and chemotherapy. **BMC cancer**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 326, 2022.

MAMTIMIN, M. *et al.* Extracellular DNA Traps: Origin, Function and Implications for Anti-Cancer Therapies. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, p. 869706, 2022.

MANTOVANI, A. *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 399–416, 2017.

MARTINEZ, R. M. *et al.* trans-Chalcone, a flavonoid precursor, inhibits UV-induced skin inflammation and oxidative stress in mice by targeting NADPH oxidase and cytokine production. **Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 1162–1173, 2017a.

MARTINEZ, R. M. *et al.* Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, [s. l.], v. 171, p. 139–146, 2017b.

MEEH, R. C. R.; BLAAK, E. E.; LOON, L. J. C. Lipotoxicity plays a key role in the development of both insulin resistance and muscle atrophy in patients with type 2 diabetes. **Obesity Reviews**, v. 20, n. 9, p. 1205–1217, 26 jun. 2019.

MIRANDA-SAPLA, M. M. *et al.* trans-Chalcone modulates Leishmania amazonensis infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 853, p. 275–288, 2019.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews. Cancer**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

NI, J.; ZHANG, L. Cancer Cachexia: Definition, Staging, and Emerging Treatments. **Cancer Management and Research**, v. Volume 12, p. 5597–5605, jul. 2020.

NGUYEN, C. L. *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 81, n. 24, p. 13533–13543, 2007.

OELZE, I. *et al.* Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 69, n. 7, p. 4489–4494, 1995.

OH, J.-M. *et al.* Human papillomavirus E5 protein induces expression of the EP4 subtype of prostaglandin E2 receptor in cyclic AMP response element-dependent pathways in cervical cancer cells. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 141–149, 2009.

QUDDUS, M. R. *et al.* Prevalence, distribution, and viral burden of all 15 high-risk human papillomavirus types in adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: a multiplex real-time polymerase chain reaction–based study. **Human Pathology**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 303–309, 2014.

RAMMOHAN, A. *et al.* Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 433–458, 2020.

ROBINSON, N. J.; SCHIEMANN, W. P. Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation. **Cancers**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 808, 2022.

RONCO, L. V. *et al.* Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & Development**, [s. l.], v. 12, n. 13, p. 2061–2072, 1998.

RUFFELL, B. *et al.* Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 623–637, 2014.

SACCO, A.; SIEPI, F.; CRESCENZI, M. HPV E7 expression in skeletal muscle cells distinguishes initiation of the postmitotic state from its maintenance. **Oncogene**, [s. l.], v. 22, n. 26, p. 4027–4034, 2003.

SEGURA, S. E. *et al.* Low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot rule out high-grade lesion: Diagnosis, histological outcomes and human papillomavirus results. **Cytopathology: Official Journal of the British Society for Clinical Cytology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 99–104, 2019.

SENRUNG, A. *et al.* In vivo antiangiogenic effect of nimbolide, trans-chalcone and piperine for use against glioblastoma. **BMC cancer**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1173, 2023.

- SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022.
- SILVA, G. *et al.* Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. **Molecular Carcinogenesis**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 1438–1448, 2016.
- SILVA, G. *et al.* Trans-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e0202263, 2018.
- SIQUEIRA, E. da S. *et al.* Trans -chalcona induz morte por autofagia mediada pela regulação positiva de p53 e regulação negativa de β -catenina na linhagem celular HuH7.5 de carcinoma hepatocelular humano. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 80, p. 153373, 2021.
- SPILL, F. *et al.* Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 40, p. 41–48, 2016.
- STAURENGO-FERRARI, L. *et al.* Trans-Chalcone Attenuates Pain and Inflammation in Experimental Acute Gout Arthritis in Mice. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, p. 1123, 2018.
- SUN, L.; ZHANG, H.; GAO, P. Metabolic reprogramming and epigenetic modifications on the path to cancer. **Protein & Cell**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 877–919, 2022.
- SZYMONOWICZ, K. A.; CHEN, J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer Biology & Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 864–878, 2020.
- TEWARI, A. K. *et al.* Inflammation and Prostate Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s. l.], v. 1095, p. 41–65, 2018.
- TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 26, p. 13–21, 2014.
- VIRGENS, I. P. A. *et al.* Can COVID-19 be a risk for cachexia for patients during intensive care? Narrative review and nutritional recommendations. **British Journal of Nutrition**, p. 1–9, nov. 2020.
- VITALE, I. *et al.* Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 36–50, 2019.
- WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (org.). **World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention**. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer, 2020. (IARC World Cancer Reports). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK606505/>. Acesso em: 2 dez. 2024.
- YAKOVENKO, A.; CAMERON, M.; TREVINO, J. G. Molecular therapeutic strategies targeting pancreatic cancer induced cachexia. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 10, n. 9, p. 95–106, 27 dez. 2018.

ZANIER, K. *et al.* Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 349, n. 2, p. 401–412, 2005.

ZHU, X. *et al.* Melanocortin-4 receptor antagonist TCMCB07 ameliorates cancer- and chronic kidney disease-associated cachexia. *The Journal of clinical investigation*, v. 130, n. 9, p. 4921–4934, jan. 2020.

5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

5.1. Manuscrito: *Trans*-Chalcone inhibits tumor growth, promotes immunomodulation, oxidative stress and reduction of vascularization in tumor microenvironment and attenuates cachexia parameters in a murine model of cervical câncer.

A ser submetido na revista: *Life Sciences*.

Trans-Chalcone inhibits tumor growth, promotes immunomodulation, oxidative stress and reduction of vascularization in tumor microenvironment and attenuates cachexia parameters in a murine model of cervical cancer.

Authors: João Manoel de Sousa Silva^a, Fabricio Seidy Ribeiro Inoue^a, Mariana Barbosa Detoni^a, Leonardo Berto Pereira^b, Ellen Mayara Souza Cruz^a, Ana Carolina Jacob Rodrigues^a, Rodolfo Bento Balbinot^f, Lívia Marvulo^c, Thaila Kawane Euflazio Maximiano^d, Victor Hugo Brunaldi Marutani^e, Waldiceu Aparecido Verri Junior^d, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense^e, Danielle Lazzarin Bidóia^f, Wander Rogério Pavanelli^a.

Affiliations:

^aLaboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

^bLaboratory of Experimental Immunopathology, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

^cLaboratory of Physiopathology of Muscular Adaptations, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

^dLaboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy and Cancer, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

^eLaboratory of Animal Pathology, Department of Veterinary Medicine, Center of Agricultural Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

^fTechnological Innovation Laboratory for Drug and Cosmetic Development, State University of Maringá, PR, Brazil

Corresponding author: João Manoel de Sousa Silva, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, Laboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, P.O. Box: 86057-970, Londrina, Paraná; Tel: +55 43 3371-4539; E-mail: jhon.manuh@hotmail.com

Role of the funding source: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brazil), Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep, Brazil).

Highlights:

- *Trans*-Chalcone promotes inhibition of tumoral growth in murine model of cervical cancer.
- Treatment with *Trans*-Chalcone increase the production of reactive oxygen and nitrogen species and decreases antioxidant parameters in tumor microenvironment.
- *Trans*-Chalcone promotes immunomodulation in tumor microenvironment by the increasing of cytokines Th1 and polarizing tumor-associated macrophages towards the M1 profile.
- Treatment with *Trans*-Chalcone reduces vascularization in the tumour microenvironment.
- *Trans*-Chalcone attenuates development of cachexia parameters.

Abstract

Aims: This study aimed to investigate the antitumor and immunomodulatory activity of *Trans*-Chalcone (TCh) in a murine model of cervical cancer associated with HPV 16, as well as to evaluate the effects of treatment on the parameters of cancer-associated cachexia in the model studied..

Main methods: The animals were inoculated on day 0 with TC-1 cells at a concentration of 2×10^5 cells/100 μ L, in the dorsolateral region, subcutaneously. They then waited for the tumor to develop, from day 1 to day 11 post-inoculation.

From day 12 to 25 post-inoculation, the respective treatments were carried out with TCh 30 mg/kg, Cisplatin 2 mg/kg or Control Vehicle with saline + tween 80 10%. On the 26th day, the animals were euthanized and the tumors, blood and gastrocnemius muscles were collected for the respective experiments.

Key findings: Treatment with TCh inhibited tumor growth in a similar way to Cisplatin. In addition, TCh promoted oxidative stress as well as immunomodulation for an antitumor profile and reduced vascularization in the tumor microenvironment. In sum, treatment with TCh, as with Cis, annulled or attenuated the parameters of cancer-associated cachexia in the model studied.

Significance: Taken together, the results of our study suggest TCh as a promising candidate for the treatment of high-risk Human Papillomavirus-associated cervical cancer, having demonstrated effects similar to, or even better than, treatment with the reference antineoplastic agent, Cisplatin.

Keywords: Treatment, Redox disruption, HPV, Cervix cancer, Cytokines.

Abbreviations: HPV, Papillomavirus Human; TCh, *Trans*-Chalcone; Cis, Cisplatin; VC, Vehicle Control; NBT, Nitro blue Tetrazolium; DMSO, Dimethyl sulfoxide; KOH, Potassium hydroxide; TBARS, thiobarbituric acid reactive species; TBA, thiobarbituric acid; TCA, trichloroacetic acid; FRAP, Ferric reducing ability of plasma; ABTS, 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; IL-6, Interleucin-6; IL-17A, Interleucin-17A; IL-2, Intereucin-2; IL-4, Interleucin-4; IL-10, Interleucin-10; IFN- γ , Interferon- γ ; TNF- α , Tumor necrosis factor- α ; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2; VEGF, vascular endothelial growth factor; PD-1, programmed cell death protein 1; PD-L1, programmed cell death protein ligand 1; ROS, Reactive oxygen species; DNA, deoxyribonucleic acid; RNA, ribonucleic acid; TMBP, 3,3',5,5'-Tetramethoxybiphenyl-4,4'diol; TBB, Trilobolide-6-O-isobutyrate; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MCH, Major Histocompatibility Complex; LDH, Lactate dehydrogenase; NK, Natural killer; NF-

κ B, Phospho nuclear factor *kappa*; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; Akt, Protein kinase B; GDF-15, growth/differentiation factor 15; TGF- β , transforming growth factor- β ; JAK, Janus kinase; STAT, Signal transducer and activator of transcription; Muscle RING-finger protein-1; ω -3, ω -3.

1. INTRODUCTION

Cancer represents the greatest challenge to global public health, standing out as one of the main reasons for death and, consequently, as one of the main barriers to increasing life expectancy worldwide. In most countries, it is the first or second leading cause of premature death before the age of 70 (1). Data from the Global Cancer Observatory (Globocan), produced by the International Agency for Research on Cancer (IARC), reveals that there were 19.3 million new cases of cancer worldwide in 2020, including cases of non-melanoma skin cancer. For the period 2023 to 2025, it is estimated that Brazil will face approximately 704,000 new cases of cancer, this number being reduced to 483,000 if we exclude cases of non-melanoma skin cancer (1).

In 2022, around 660,000 women were diagnosed with cervical cancer worldwide and around 350,000 women died from the disease (2). In Brazil, cervical cancer is the third most common type of cancer in women, excluding non-melanoma skin cancers, behind breast and colorectal cancers (3). For each year of the 2023-2025 triennium, 17,010 new cases were estimated, which represents a gross incidence rate of 15.38 cases per 100,000 women (1)

Cervical cancer is predominantly caused by persistent human papillomavirus (HPV) infections. Of the 200 types of HPV identified, 12 have been designated as carcinogenic by the International Agency for Research on Cancer, with HPV-16 accounting for 50% and HPV-18 accounting for 10% of cervical cancer cases, respectively (4).

The therapies available for the treatment of cervical cancer include chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy and surgery, combined or isolated, depending on the degree of malignancy of the case. However, cervical cancer is the second leading cause of cancer death in women between the ages of 20 and 39 (5). The poor prognosis of cases has been attributed to frequent chemoresistance and cases of metastasis, which make it difficult to eliminate the tumor and increase the likelihood of recurrence, respectively (6).

Trans-chalcone is a natural product of plant origin that has proven to be of great value from a pharmacological point of view. Studies have revealed its wide

range of pharmacological activities, such as antimicrobial (7,8), anti-inflammatory (9–14), neuroprotective (15), anti-parasitic (16) and anti-cancer (17–23).

The murine model of cervical cancer in C57BL/6 mice with TC-1 cell inoculation is already widely used and well-established in research into new vaccines against HPV and cervical cancer (24–28), as well as in the search for new compounds to be applied in immunotherapy and immunomodulation of cervical cancer (29–33).

Thus, this research demonstrated the antitumor activity, immunomodulation in the tumor microenvironment and the effects on the development of cachexia parameters of *Trans*-Chalcone in the cervical tumor model of TC-1 cells in C57BL/6 mice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animal experimentation and ethics committee

This study used isogenic female mice of the C57BL/6 strain, aged between 60 and 80 days, weighing between 20 and 25 grams, obtained from the vivarium of the Department of Immunology, Parasitology and General Pathology at the State University of Londrina. They were kept at room temperature (25°C), with a 12-hour light/dark cycle (with the light cycle starting at 07h00), fed a balanced diet and given drinking water ad libitum. The TC-1 cells used for implantation were kindly provided by Prof. Dr. TC Wu, Johns Hopkins Hospital (Baltimore), and are epithelial cells transformed with the E6 and E7 oncogenes of HPV16 and E_j-ras. They were cultured in 10% fetal bovine serum in RPMI 1640 (Thermo Scientific, Waltham, MS) plus 100 U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin, buffered with sodium bicarbonate and in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. C57BL/6 mice were inoculated with 2x10⁵ viable TC-1 tumor cells on the dorsum, as previously described (30). The study included 3 groups: the vehicle control group (VC), which received vehicle (10% tween 80 + isotonic saline solution); the experimental treatment group (TCh 30 mg/kg), which received *Trans*-Chalcone at a dose of 30 mg/kg (12); and the positive control group (Cis 2 mg/kg), which received Cisplatin at a dose of 2 mg/kg (Chu et al., 2016). The animals in the VC and TCh 30 mg/kg groups received daily treatment for 14 consecutive days, and the animals in the Cis 2 mg/kg group received weekly treatment for two weeks, on day 1 and day 8 of the total treatment time. The dose of *Trans*-Chalcone used was maintained as it was safe in relation to renal and hepatic toxicity (12). Each group consisted of 16 animals, totaling 48 animals used, and their tumors were directed to homogenate dosages or histopathological analysis. At the end of the experimental procedure, the animals were euthanized by cervical dislocation after anesthesia with ketamine hydrochloride 180 mg/kg and xylazine 30 mg/kg. This research was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the State University of Londrina (approval protocol n°. 015.2024).

2.2. Tumor volume

The final tumor volume was measured after excision of the tumors, using a manual caliper. The following equation was used to determine tumor volume in mm^3 : $V = 0,5 \times \text{Length} \times \text{Width}^2$ (34).

2.3. Test compounds

The compounds used in this study were isotonic saline solution (sodium chloride 0,9g/100 mL of water; Synth, Diadema, Brazil), Tween 80 (Synth, Diadema, Brazil), *Trans*-Chalcone (Sigma-Aldrich, purity 97%, Cajamar, Brazil) and cisplatin 1mg/ml (Bergamo, Taboão da Serra, Brazil).

2.4. Measurement of nitric oxide metabolite levels in tumor samples

Nitrite concentrations in the tumour tissue of animals from both groups were determined using the Griess method, preceded by deproteinization of the samples and a short period of reduction of nitrate to nitrite using cadmium, as previously carried out (35).

2.5. Measurement of superoxide anion levels in tumor samples

The levels of the superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) was determined by reducing the redox dye nitrobluetetrazolium (1 mg/mL; NBT, Sigma-Aldrich). 50 μL of the homogenate from the tumors of the animals in both groups was placed in the wells of 96-well plates in contact with 100 μL of nitro blue tetrazolium at the concentration previously reported. After an incubation period of 1 hour, the supernatant was removed from the wells and discarded, and the precipitate formed was solubilized with 120 μL of 2M KOH and 120 μL of DMSO. The optical density was then measured by spectrophotometry at 600 nm on a plate reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific and Vantaa, Finland).

2.6. Lipid peroxidation

Tissue lipid peroxidation was assessed by the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). For this assay, 10% TCA was added to the homogenate and the mixture was centrifuged (3 min, $1000\times g$, 4 °C) to precipitate

proteins. The protein-free supernatant was then separated and mixed with TBA (0.67%). The mixture was kept in a water bath (15 min, 100 °C), as previously carried out by (36). Malondialdehyde (MDA), an intermediate product of lipid peroxidation, was determined by the difference between the absorbance at 535 and 572 nm using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific and Vantaa, Finland). TBARS were corrected according to the amount of tissue in the well and the results were presented as Lipid Peroxidation ($\Delta OD A535 - A572/mg$ tissue).

2.7. Measurement of antioxidant capacity with iron reduction potential (FRAP) and free radical scavenging capacity (ABTS) assays

Tumor samples from both groups were homogenized in 1,15% KCl and then the supernatants were used for the ferric reducing ability (FRAP) and free radical scavenging ability (ABTS) assays, as previously described (37,38).

2.8. Tumor histopathology

Tumor samples were collected, fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. After this period, the samples were washed 3 times with 1x PBS and then stored in 70% alcohol until processing. The samples were then submitted to histological processing for dehydration with graded alcohol baths (70%, 80%, 93% and 100%) (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brazil), diaphanization with xylene baths (Synth, Diadema, Brazil) and paraffin impregnation (Synth, Diadema, Brazil). The slides with the sections were dewaxed with a xylol bath, followed by rehydration with decreasing alcohol baths (100%, 93%, 80% and 70%) and then stained with hematoxylin (Merck) and Eosin (Laborclin, Pinhais, Brazil). By staining with hematoxylin and eosin, it was possible to observe the tumor tissue and carry out a pathological score analysis, where the parameters of stroma, vascularization and immune cell infiltration were observed and measured in a scale of 0 to 3, where 0 is very little or non-existent, 1 is little, 2 is a lot and 3 is accentuated. For lymphocytes, the scale/density was from 0 to 6. The analyses were carried out by two experienced veterinary pathologist.

2.9. Cytokines

The quantification of cytokines in the supernatant of the tumor homogenate was performed using the CBA kit (BD Life Sciences, San Jose, CA, USA) for the quantification of Th1, Th2 and Th17 cytokines in a single sample. The kit contains seven populations of beads with different fluorescence intensities conjugated to specific antibodies for the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A and IL-10. The sphere-antibody-cytokine complexes were analyzed in the FL3 channel of the BD FACSCalibur™ flow cytometer.

2.10. Animal body weight

The animals were weighed daily, at the time of treatment, during all treatment days until the day of euthanasia, on a semi-analytical scale (GEHAKA BG 1000) previously weighed with the weight of the weighing chamber.

2.11. Weighing the gastrocnemius muscles

The gastrocnemius muscles of the animals were weighed on the day of euthanasia, after surgical excision, on a semi-analytical balance (BEL ENGINEERING S203H) previously weighed with the weight of the weighing paper.

2.12. Determination of plasma levels of IL-6 and IFN- γ by ELISA

To measure plasma IL-6 and IFN- γ cytokines by ELISA, the plates were first sensitized one day before the experiments with the respective capture antibodies (eBioscience). The animals' plasma samples were thawed in an ice bath at room temperature, while the plates were washed, blocked and the standard samples of the respective curves were added. Subsequently, 100 μ L of plasma was added to the previously sensitized wells and the plates were stored at 4°C overnight for greater detection. On the 3rd day, the plates were washed, the detection antibodies were added and then the plates were read by spectrophotometry using a microplate reader at 450 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific and Vantaa, Finland). The results are expressed in picograms of cytokines per milliliter of plasma.

2.13. Grip strength test

Grip strength was measured by holding the mice by the tail and lowering them onto a metal grid connected to the shaft of a Shimpo Fgv 0.5X force transducer (Metrotec Group, Lezo, Spain). When the animals had a firm grip on the grid, a discreet tug was exerted on their tails (Paolini et al., 2015). The test was repeated three times to confirm the result, with a 30-second interval between tests to avoid fatigue. Grip strength measurements were taken one day before the start of treatment and one day after the end of treatment, in order to assess whether the treatment promoted the maintenance or slowed down the loss of muscle strength.

2.14. Food consumption

The animals' food consumption was assessed by measuring their daily feed intake. For this purpose, 300 grams of feed was added the day before the first day of treatment and, every day, at the time of treatment, the feed was weighed again to assess daily consumption per box, and this was done until the day of euthanasia (one day after the end of treatment). The feed was replenished when necessary, and then weighed again to continue measuring daily food consumption. When analyzing the data, the individual daily consumption was averaged by dividing the total consumption, per box and per day, by the number of animals per box (3 animals per box), in order to obtain the average daily consumption of the animals.

2.15. Statistical Analysis

The data was initially subjected to an exploratory statistical analysis, with normality assessed using the Shapiro-Wilk test. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between two groups were made using the Student's test. Significance was determined by two-way analysis of variance (two-way ANOVA), followed by Tukey or Kruskal-Wallis multiple comparison tests. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. RESULTS

3.1. *Trans*-chalcone treatment inhibits tumor growth in a murine model of cervical cancer

Firstly, we evaluated whether treatment with *Trans*-Chalcone promoted tumor growth inhibition. After the treatment period, we found that *Trans*-Chalcone promoted significant tumor growth inhibition when compared to the vehicle control ($p < 0.0001$) in an incredibly similar way to cisplatin ($p < 0.0001$), but there was no difference when comparing the two treated groups ($p = 0.9419$). (Fig. 2A/B).

3.2. Treatment with *Trans*-Chalcone promotes reduction of vascularization in the tumor tissue

After observing that treatment with *Trans*-Chalcone inhibited tumor growth, we tried to investigate whether the treatment promoted histomorphological changes in the tumor microenvironment. Using a score from 0 to 3, where 0 would be equivalent to absent and 3 would be equivalent to very much present, it was observed that both the tumors from the animals in the TCh group and the tumors from the Cis group had a lower amount of vascularization per area analyzed compared to the VC group ($p = 0.0217$ and $p = 0.0217$, respectively), and that the two did not differ from each other ($p > 0.9999$). As for the other parameters evaluated, none of them showed any difference between any of the groups in this study (Fig. 3A/B).

3.3. *Trans*-Chalcone promotes increase in reactive oxygen species, nitric oxide metabolites, lipid peroxidation and a decrease in antioxidant protection in the tumor microenvironment.

Since treatment with *Trans*-Chalcone promoted tumor growth inhibition, we sought to assess whether oxidative stress was involved in this activity. To this end, we evaluated the levels of superoxide anion, nitric oxide metabolites, lipid peroxidation and the capacity for ferric reduction and ABTS radical reduction in tumor tissue.

It was observed that the administration of *Trans*-Chalcone promoted an increase in superoxide anion levels compared to the vehicle control group ($p = 0.0003$), and that treatment with cisplatin showed no statistical difference between the two groups, TCh ($p = 0.6480$) and VC ($p = 0.1247$) (**Fig. 4A**).

When assessing the levels of nitric oxide metabolites using the cadmium/Griess technique, there was an increase in the TCh group in relation to the vehicle control group ($p = 0.0065$), with no statistical difference in relation to the animals treated with cisplatin ($p = 0.4778$) which, in turn, did not differ from the control group, despite showing a tendency towards a statistical difference ($p = 0.0829$) (**Fig. 4B**).

When we evaluated the levels of lipid peroxidation, using the method for determining the levels of thiobarbituric acid reactive species, we found that treatment with TCh was able to increase lipid peroxidation compared to the VC group ($p = 0.0287$), but showed no difference compared to the Cis group ($p = 0.5106$), which showed no difference in lipid peroxidation levels compared to VC ($p = 0.6683$) (**Fig. 4C**).

Observing that treatment with *Trans*-Chalcone promoted an increase in reactive oxygen and nitrogen species, as well as an increase in lipid peroxidation, we evaluated whether the treatment also promoted changes in the antioxidant protection of tumor tissue. To this end, we tried to assess the capacity for ferric reduction, using the ferric reduction antioxidant power technique, and found that

treatment with TCh was able to significantly reduce this antioxidant parameter compared to the VC group ($p = 0.0201$), but that treatment with cisplatin showed no difference when compared to the TCh group ($p = 0.1247$), nor when compared to the VC group ($p = 0.6480$) (**Fig. 4D**).

We also tried to evaluate the total antioxidant activity in the tumor tissue, where it was observed that treatment with cisplatin showed a statistical difference compared to the VC group ($p = 0.0347$), but the TCh group, despite showing visually lower levels, did not differ significantly from the VC group ($p = 0.1184$), nor in relation to the Cis group ($p = 0.6480$) (**Fig. 4E**).

3.4. *Trans*-Chalcone treatment promotes immunomodulation in tumor microenvironment

To assess whether treatment with *Trans*-Chalcone promoted immunomodulation in the tumor microenvironment, we determined the levels of cytokines in the tumor microenvironment using the supernatant of the tumor homogenate, where different beads containing antibodies to the different cytokines, with different fluorescence intensities, were placed in contact with the samples and then these were read on the flow cytometer. We evaluated cytokines from the Th1, Th2 and Th17 profiles.

After the test, it was observed that both treatment with *Trans*-Chalcone and treatment with Cisplatin promoted a significant increase in the levels of the cytokine IFN- γ in the tumor microenvironment compared to the vehicle control group ($p = 0.0237$; $p = 0.0099$), with no difference between them ($p > 0.9999$) (**Fig. 5A**). In addition, it was also shown that both treatments, with *Trans*-Chalcone and Cisplatin, promoted an increase in the cytokine IL-17A in the tumor microenvironment when compared to the vehicle control group ($p = 0.0002$; $p = 0.0411$), also with no difference between them ($p = 0.0593$) (**Fig. 5B**).

In addition, we observed that both treatments with TCh and Cis promoted a significant reduction in the cytokine IL-4 in the tumor microenvironment compared to the VC group ($p < 0.0001$; $p = 0.0003$), with no statistical difference between

them ($p = 0.1778$) (**Fig. 5C**). Not dissimilarly, the treatments with TCh and Cis also reduced the levels of the cytokine IL-6 in the tumor microenvironment when compared to the animals in the vehicle control group ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$), maintaining statistical equality between them ($p = 0.9058$) (**Fig. 5D**).

When we assessed the levels of the cytokine IL-2 in the tumor microenvironment, we found that there was no statistical difference between any of the 3 groups, *Trans*-Chalcone, Cisplatin and Vehicle Control (VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0.8588$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0.0694$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0.1896$) (**Fig. 5E**). Similarly, we found that any of the 3 treatments was also unable to alter levels in the tumor microenvironment of the cytokine TNF- α (VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0.9274$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0.2463$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0.4125$) (**Fig. 5F**). In line with this, the cytokine IL-10 also showed no significant difference between any of the 3 groups studied (VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0.2440$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0.1103$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0.9343$) (**Fig. 5G**).

3.5. Effects of treatment with *Trans*-Chalcone in the appearance of cancer-related cachexia parameters

The animal cachexia score (ACASCO) establishes some parameters to assess and/or characterize the onset of cachexia in animals. The parameters for characterizing animal cachexia involve alterations that are closely related to the onset of this clinical condition, such as loss of body weight and gastrocnemius muscles; inflammatory parameters, such as plasma IL-6 and Serum Amyloid A; metabolic disorders, assessed by serum albumin, glucose, triglycerides and hematocrit; physical activity parameters, such as total physical activity and handgrip strength; anorexia parameter, assessed by decreased food consumption, and quality of life tests, such as discomfort symptoms, resident-intruder paradigm and forced swim test (39). In this way, we sought to assess whether treatment with *Trans*-Chalcone had a mitigating effect on the appearance of cachexia-related parameters.

When evaluating the weight of the animals in both groups during the treatment period, it was possible to see that treatment with *Trans*-Chalcone promoted

weight maintenance in the animals, which was not the case with the animals in the VC group ($p < 0.0001$), and that treatment with Cisplatin also had this effect when compared to VC ($p < 0.0001$), but both the TCh and Cis groups did not differ in terms of weight maintenance ($p > 0.9999$) (**Fig. 6A-1**).

When we evaluated the weight of the animals' gastrocnemius, we found that the animals in the TCh group had significantly higher weights of gastrocnemius when compared to the weights of the gastrocnemius of the animals in the VC group (right gastrocnemius, $p < 0.0001$; left gastrocnemius, $p < 0.0001$), and the same phenomenon was found when comparing the weights of the gastrocnemius of the animals in the Cis group with the animals in the VC group (right gastrocnemius, $p < 0.0001$; left gastrocnemius, $p < 0.0001$), but there was no statistical difference between the weights of the gastrocnemius of the animals in the TCh group and the animals in the Cis group (right gastrocnemius, $p = 0.3168$; left gastrocnemius, $p = 0.9014$) (**Fig. 6A-2**).

Next, we tried to assess whether treatment with *Trans*-Chalcone reduced the inflammatory parameters characteristic of cachexia by measuring IL-6 (**Fig. 6B-1**) and IFN- γ (**Fig. 6B-2**) by ELISA. The animals in the TCh group had lower plasma levels of IL-6 ($p = 0.0184$) and IFN- γ ($p = 0.0362$) than the animals in the VC group. Treatment with Cisplatin was also able to reduce plasma levels of IL-6 ($p = 0.0116$) and IFN- γ ($p = 0.0008$) compared to treatment with vehicle control. When plasma levels of IL-6 and IFN- γ were compared between the TCh and Cis groups, no statistical difference was observed (IL-6, $p = 0.9771$; IFN- γ , $p = 0.7737$).

Subsequently, we assessed whether the administration of *Trans*-Chalcone would reverse the loss of muscle strength by testing handgrip strength using a dynamometer attached to a grid where the animal was positioned and then gently pulled by the tail. Thus, we found that, at the end of treatment, the animals in the TCh group had significantly greater handgrip strength than the animals in the VC group ($p < 0.0001$), a fact also observed when comparing the animals in the Cis group to those in the VC group ($p = 0.0131$), but we observed no statistical difference when comparing the TCh and Cis groups ($p = 0.4939$) (**Fig. 6C**).

Therefore, we investigated whether treatment with *Trans*-Chalcone had an effect on the parameter of cachexia-related anorexia, as assessed by the animals' food consumption. We found that the animals in the TCh group had higher food consumption than the animals in the VC group ($p = 0.0231$), which was not the case for the animals in the Cis group compared to the animals in the VC group ($p = 0.3783$). However, the consumption of the animals in the Cis group also did not differ from that of the animals in the TCh group ($p = 0.3424$) (**Fig. 6D**).

4. DISCUSSION

The present study showed that treatment for 14 days with *Trans*-Chalcone, at a dose of 30 mg/kg body weight, was able to inhibit tumor growth, with results of a reduction in tumor volume similar to treatment with Cisplatin, the reference antineoplastic drug, in the same model. The treatment also promoted an increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species in the tumor microenvironment. In addition, therapeutic intervention with *Trans*-Chalcone reduced vascularization in the tumour. In addition, the treatment also promoted immunomodulation of the immune cells in the tumor microenvironment for an antitumor profile. Furthermore, the administration of *Trans*-Chalcone was able to reverse the development of cancer-associated cachexia in the model studied. Thus, according to our data, *Trans*-Chalcone appears to be a promising candidate for an antineoplastic drug.

For a long time, the tumor cell was the central component in the investigation of biological mechanisms, as well as in the search for treatments that could eliminate these cells. Today, it is known that studying the components of the environment in which tumor cells are inserted is just as important as studying the tumor cell itself. One of the characteristics of cancer that enables tumor support and progression is that tumors can become sufficiently vascularized, either by activating angiogenesis or by capturing vessels from adjacent normal tissues, a mark that is now more broadly defined as the ability to induce or access, mainly through invasion and metastasis, the vasculature that supports tumor growth (40).

Several studies have shown that inhibiting angiogenesis is an effective strategy for treating cancer. A clinical trial using apatinib, a tyrosine kinase inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2, as a treatment for advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach refractory to chemotherapy, resulted in an increase in median overall survival and an increase in progression-free survival compared to patients in the placebo group (41). Another study associating apatinib with the immune checkpoint blocker camrelizumab and the antineoplastic agent oxaliplatin in patients with locally advanced gastric cancer revealed that the association promoted an improvement

in overall survival and progression-free survival parameters, as well as good pathological response rates, which was associated with a microsatellite instability status and decreased PD-L1 expression, in addition to promoting changes in tumor subclones and the immune microenvironment (42).

Similarly, the combination of atixinib, a VEGF inhibitor, and pembrolizumab, a PD-1 inhibitor, was shown to promote anti-tumor activity and improved progression-free survival in a clinical study of patients with advanced renal cell cancer (43). In this way, and based on our results of the histopathology of the tumours from the experimental groups in this research, the reduction in vascularization promoted by treatment with *trans*-chalcone may be involved in its anti-tumor activity.

Oxidation-reduction (redox) reactions in living cells are used in fundamental redox regulation processes, collectively referred to as 'redox signaling' or 'redox control' (44). In this context, many discussions have arisen about oxidative stress. Oxidative stress is currently defined as a harmful condition that occurs in all living systems and stems from the imbalance between oxidizing species and antioxidant defense (45).

This redox imbalance plays a dual role in cancer. On the one hand, oxidative stress processes and the failure to block them can result in genetic and epigenetic alterations that drive the onset of carcinogenesis, by affecting various signaling pathways associated with cell proliferation, such as epidermal growth factor, nuclear factor erythroid 2-related factor, RAS/RAF, the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK, as well as the expression of the tumor suppressor gene p53, which is a key factor in apoptosis (46). On the other hand, excessive ROS can damage cellular components such as DNA, proteins and lipids, resulting in oxidative stress, which is an important inducer of autophagy and apoptosis. Acting as second messengers, low and moderate levels of ROS also play important roles in regulating autophagy and apoptosis, thus controlling cell death and survival (47).

In line with this, several studies have shown the generation of oxidative stress as part of the mechanisms involved in the antitumor activity of different

compounds on different cell lines. It was observed in an in vitro model of hepatocellular carcinoma that *trans*-chalcone promoted anti-tumor activity, one of the mechanisms being an increase in the production of reactive oxygen species (20). Similarly, other studies, in an in vitro model of lung carcinoma, showed that treatment with the compounds TMBP and TBB promoted an increase in oxidative stress parameters, mechanisms which were also involved in the compounds' antitumor activity, since the inhibition of reactive species reversed the cytotoxicity of the treatments (48–50). In line with these studies, our research shows that oxidative stress contributes to the antitumor activity of *trans*-chalcone in the model studied, evidenced by increased levels of pro-oxidant substances, such as superoxide anion, nitric oxide and malondialdehyde, and reduced antioxidant parameters, such as FRAP and ABTS.

The immune response process against tumors is complex and involves several mechanisms. Initially, cancer cells can be identified as altered due to the accumulation of genetic mutations and increased expression of tumor antigens or proteins that, in a normal context, are expressed at low levels (51). These tumor antigens or products of abnormal expression are then recognized by immune cells, mainly cytotoxic T lymphocytes, which then release substances that culminate in the death of tumor cells (52). In addition, antigen-presenting cells play a fundamental role in this context, as they process and present antigens related to tumor cells, promoting the activation of T lymphocytes (53).

However, although the immune system is naturally capable of eliminating cancer cells, these cells, in turn, develop strategies to evade the immune system. The activation of different metabolic pathways and the release of metabolites into the tumor microenvironment create an immunosuppressive environment that results in the limitation of T cell activity against tumor cells (54). Signaling pathways such as β -catenin, which is often associated with the desert tumor immunotype (55), the Ras/MAPK pathway, which results in reduced MHC class I expression, thus causing tumor cells to escape the cytotoxic action of CD8⁺ T cells (56), the loss of type II interferon signaling, which limits T lymphocyte-mediated cytotoxicity (57), among several other pathways, are involved in the

establishment of an immunosuppressed tumor microenvironment, consequently more permissive to tumor progression.

Numerous studies have demonstrated that treatment with polyphenolic substances, in the same animal model used in our research, promotes the inhibition of tumor growth by mechanisms involving immunomodulation in the tumor microenvironment, as evidenced by the repolarization of tumor-associated macrophages from an M2 profile to an M1 profile (58), reduction in VEGF levels (59) and increase in LDH, IFN- γ and NO levels followed by decrease in IL-4 and TGF- β levels (60). Our study presents results similar to the studies above, since the treatment we used, in the same model, promoted an increase in the production of the cytokines IFN- γ and IL-17A and a decrease in the cytokines IL-4 and IL-6 in the tumor microenvironment. IFN- γ plays a crucial role in the immune response against tumors through the activation of cytotoxic T cells, NK cells and macrophages, inhibition of regulatory T cells, induction of MHC class I expression, inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis in tumor cells (61–63). IL-17, in turn, can promote the recruitment and activation of cytotoxic T cells (64), in addition to increasing NK cell activity (65), promoting increased expression of MHC class I and II (66) and can convert to Th1 upon specific stimuli, a T cell profile known to be antitumor (67).

On the other hand, IL-4 is known to promote tumor progression through several mechanisms, such as immunosuppression by stimulating the production of IL-10 and TGF- β (68), the polarization of macrophages to an M2 profile, which promotes angiogenesis through the production of VEGF (69), as well as promotion of immunosuppressive myelopoiesis in cancer, by stimulating the development and recruitment of suppressor cells derived from the myeloid lineage (70). IL-6 is known for its promiscuous action, sometimes promoting an antitumor response, sometimes promoting tumor progression. Several studies have shown that IL-6 contributes to tumor progression, especially in HPV-positive cervical cancers, through several mechanisms associated with the IL-6/STAT3 pathway, such as increased expression of the pro-tumor long non-coding RNAs MALAT1 (71) and UICC (72), inhibition of tumor-associated fibroblast senescence (73), downregulation of SOCS2 (74), increased survival signals

through NF- κ B activation (75), and upregulation of Mcl-1 through the PI3K/Akt pathway (76). Therefore, immunomodulation promoted by treatment with *trans*-chalcone appears to be another possible mechanism involved in its antitumor activity.

As cancer progresses, the affected individual often develops organic changes resulting from metabolic disorders caused by the disease. Among these changes, one that stands out due to the level of impairment of the sick individual is cachexia. Cancer-related anorexia-cachexia syndrome (CACS) is a debilitating condition that afflicts up to 80% of patients with advanced cancer, characterized by progressive weight loss, muscle wasting, and metabolic abnormalities, which significantly compromises patients' quality of life and treatment outcomes (77). Approximately 8.2 million annual deaths are attributed to cancer, with cancer-associated cachexia playing a significant role in most cases (78). The basis of cancer cachexia lies in the presence of a chronic inflammatory state, mediated by pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TGF- β , and GDF-15, which activate several signaling pathways that promote protein catabolism and metabolic dysfunction (79).

IL-6 is a key cytokine in cancer cachexia, and its action is mainly mediated by the activation of the JAK/STAT pathway, which leads to the expression of pro-inflammatory and catabolic genes, including increased synthesis of acute phase proteins (such as C-reactive protein) and activation of the ubiquitin-proteasome system, which promotes the degradation of muscle proteins (80). IFN- γ , another key cytokine in cancer-associated cachexia, activates NF- κ B and STAT-1 α signaling, which culminates in increased expression of Atrogin-1 and MuRF1, two E3 ubiquitin ligases that lead to muscle degradation, particularly under conditions of inflammation or stress (81).

Although there are still no well-established therapies for cachexia, some strategies, such as appetite stimulation with megestrol acetate, ghrelin agonists and serotonin agonists, as well as interference in metabolic and inflammatory disorders with pro-cachectic cytokine antagonists, such as cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibitors, β 2 agonists, angiotensin-converting enzyme inhibitors, selective androgen receptor modulators, myostatin antagonists and ω -3 fatty

acids have shown promise in attenuating metabolic alterations related to cancer cachexia (82). Similarly, the proposed treatment with Trans-Chalcone is promising in the clinical context of cancer-associated cachexia, as it reversed the loss of body weight and muscle mass, promoted a decrease in plasma levels of the cytokines IL-6 and IFN- γ and attenuated the parameters of loss of handgrip strength and decreased food consumption of the animals in the model studied.

5. CONCLUSIONS

In conclusion, our results suggest that *Trans*-Chalcone is an interesting candidate for the treatment of cervical cancer, as it promotes the inhibition of tumor growth, immunomodulation in the tumor microenvironment for an antitumor profile, reduction of vascularization in the tumor, increase in the production of pro-oxidant species followed by a decrease in antioxidant protection, and can also be applied in the adjuvant treatment of cancer-associated cachexia, since it promoted the reversal of the emergence of cancer-associated cachexia parameters in the model studied.

6. REFERENCES

1. Instituto Nacional de Câncer - INCA [Internet]. [citado 2 de dezembro de 2024]. Controle do Câncer do Colo do Útero. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/controle-do-cancer-do-colo-do-utero>
2. IARC hosts meeting of Expert Working Group on cervical cancer to review scientific evidence on screening programmes [Internet]. [citado 2 de dezembro de 2024]. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/cervical-cancer>
3. Instituto Nacional de Câncer - INCA [Internet]. [citado 2 de dezembro de 2024]. Câncer do colo do útero. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/colo-do-utero>
4. Johnson L, McHugh S, Eagle JL, Spires HA. Project-Based Inquiry (PBI) Global in Kindergarten Classroom: Inquiring about the World. *Early Childhood Education Journal*. setembro de 2019;47(5):607–13.
5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. maio de 2021;71(3):209–49.
6. He Y, Xiao M, Fu H, Chen L, Qi L, Liu D, et al. cPLA2 α reversibly regulates different subsets of cancer stem cells transformation in cervical cancer. *Stem Cells*. abril de 2020;38(4):487–503.
7. Bitencourt TA, Komoto TT, Massaroto BG, Miranda CES, Belebony RO, Marins M, et al. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Complement Altern Med*. 17 de setembro de 2013;13:229.
8. Bitencourt TA, Macedo C, Franco ME, Rocha MC, Moreli IS, Cantelli BAM, et al. Trans-chalcone activity against *Trichophyton rubrum* relies on an interplay between signaling pathways related to cell wall integrity and fatty acid metabolism. *BMC Genomics*. 22 de maio de 2019;20(1):411.
9. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione CV, Fattori V, Bussmann AJC, et al. trans-Chalcone, a flavonoid precursor, inhibits UV-induced skin inflammation and oxidative stress in mice by targeting NADPH oxidase and cytokine production. *Photochem Photobiol Sci*. 1º de julho de 2017;16(7):1162–73.
10. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Vale DL, Steffen VS, Vicentini FTMC, Vignoli JA, et al. Trans-chalcone added in topical formulation inhibits skin inflammation and oxidative stress in a model of ultraviolet B radiation skin damage in hairless mice. *J Photochem Photobiol B*. junho de 2017;171:139–46.

11. Karimi-Sales E, Jeddi S, Ebrahimi-Kalan A, Alipour MR. trans-Chalcone prevents insulin resistance and hepatic inflammation and also promotes hepatic cholesterol efflux in high-fat diet-fed rats: modulation of miR-34a-, miR-451-, and miR-33a-related pathways. *Food Funct.* 15 de agosto de 2018;9(8):4292–8.
12. Staurengo-Ferrari L, Ruiz-Miyazawa KW, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Zaninelli TH, Badaro-Garcia S, et al. Trans-Chalcone Attenuates Pain and Inflammation in Experimental Acute Gout Arthritis in Mice. *Front Pharmacol.* 2018;9:1123.
13. Ale-Ebrahim M, Rahmani R, Faryabi K, Mohammadifar N, Mortazavi P, Karkhaneh L. Atheroprotective and hepatoprotective effects of trans-chalcone through modification of eNOS/AMPK/KLF-2 pathway and regulation of COX-2, Ang-II, and PDGF mRNA expression in NMRI mice fed HCD. *Mol Biol Rep.* maio de 2022;49(5):3433–43.
14. Javadi F, Ale-Ebrahim M, Mohseni-Moghaddam P, Mortazavi P, Mousavi Z, Asghari A. Hepatoprotective and antifibrotic effects of trans-chalcone against bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2023;26(10):1194–201.
15. Dhakal S, Ramsland PA, Adhikari B, Macreadie I. Trans-Chalcone Plus Baicalein Synergistically Reduce Intracellular Amyloid Beta (A β 42) and Protect from A β 42 Induced Oxidative Damage in Yeast Models of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 31 de agosto de 2021;22(17):9456.
16. Batiha GES, Beshbishy AM, Tayebwa DS, Adeyemi OS, Shaheen H, Yokoyama N, et al. The effects of trans-chalcone and chalcone 4 hydrate on the growth of *Babesia* and *Theileria*. *PLoS Negl Trop Dis.* 24 de maio de 2019;13(5):e0007030.
17. Silva G, Marins M, Fachin AL, Lee SH, Baek SJ. Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. *Mol Carcinog.* outubro de 2016;55(10):1438–48.
18. Silva G, Marins M, Chaichanasak N, Yoon Y, Fachin AL, Pinhanelli VC, et al. Trans-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition. *PLOS ONE.* 17 de agosto de 2018;13(8):e0202263.
19. Bortolotto LFB, Barbosa FR, Silva G, Bitencourt TA, Belebony RO, Baek SJ, et al. Cytotoxicity of trans-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. *Biomed Pharmacother.* janeiro de 2017;85:425–33.
20. Siqueira E da S, Concato VM, Tomiotto-Pellissier F, Silva TF, Bortoleti BT da S, Gonçalves MD, et al. *Trans*-chalcona induz morte por autofagia mediada pela regulação positiva de p53 e regulação negativa de β -catenina na linhagem celular HuH7.5 de carcinoma hepatocelular humano. *Phytomedicine.* 1º de janeiro de 2021;80:153373.

21. Senrunga A, Tripathi T, Yadav J, Janjua D, Chaudhary A, Chhokar A, et al. In vivo antiangiogenic effect of nimbolide, trans-chalcone and piperine for use against glioblastoma. *BMC Cancer*. 30 de novembro de 2023;23(1):1173.
22. Hong Y, Kim I, Moon H, Lee J, Lertpatipanpong P, Ryu CH, et al. Novel thrombospondin-1 transcript exhibits distinctive expression and activity in thyroid tumorigenesis. *Oncogene*. junho de 2023;42(22):1832–42.
23. Komoto TT, Nishimura FG, Evangelista AF, de Freitas AJA, da Silva G, Silva WA, et al. Exploring the Therapeutic Potential of trans-Chalcone: Modulation of MicroRNAs Linked to Breast Cancer Progression in MCF-7 Cells. *Int J Mol Sci*. 28 de junho de 2023;24(13):10785.
24. Li YL, Ma ZL, Zhao Y, Zhang J. Immunization with mutant HPV16 E7 protein inhibits the growth of TC-1 cells in tumor-bearing mice. *Oncol Lett*. abril de 2015;9(4):1851–6.
25. de Oliveira LMF, Morale MG, Chaves AAM, Cavalher AM, Lopes AS, Diniz M de O, et al. Design, Immune Responses and Anti-Tumor Potential of an HPV16 E6E7 Multi-Epitope Vaccine. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138686.
26. Luo M, Wang H, Wang Z, Cai H, Lu Z, Li Y, et al. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy. *Nat Nanotechnol*. julho de 2017;12(7):648–54.
27. Sun L, Hao Y, Wang Z, Zeng Y. Constructing TC-1-GLUC-LMP2 Model Tumor Cells to Evaluate the Anti-Tumor Effects of LMP2-Related Vaccines. *Viruses*. 23 de março de 2018;10(4):145.
28. Che Y, Yang Y, Suo J, Chen C, Wang X. Intratumoral Injection of a Human Papillomavirus Therapeutic Vaccine-Induced Strong Anti-TC-1-Grafted Tumor Activity in Mice. *Cancer Manag Res*. 2021;13:7339–54.
29. Li S, Zhang Q, Bai H, Huang W, Shu C, Ye C, et al. Self-Assembled Nanofibers Elicit Potent HPV16 E7-Specific Cellular Immunity And Abolish Established TC-1 Graft Tumor. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:8209–19.
30. Silveira CRF, Cipelli M, Manzine C, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC, Rodríguez Rodríguez G, et al. Swainsonine, an alpha-mannosidase inhibitor, may worsen cervical cancer progression through the increase in myeloid derived suppressor cells population. *PLoS One*. 2019;14(3):e0213184.
31. Bergamaschi C, Pandit H, Nagy BA, Stellas D, Jensen SM, Bear J, et al. Heterodimeric IL-15 delays tumor growth and promotes intratumoral CTL and dendritic cell accumulation by a cytokine network involving XCL1, IFN- γ , CXCL9 and CXCL10. *J Immunother Cancer*. 26 de maio de 2020;8(1):e000599.
32. Ni G, Yang X, Li J, Wu X, Liu Y, Li H, et al. Intratumoral injection of caerin 1.1 and 1.9 peptides increases the efficacy of vaccinated TC-1 tumor-bearing mice with PD-1 blockade by modulating macrophage heterogeneity and the

- activation of CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment. *Clin Transl Immunology*. 2021;10(8):e1335.
33. Minnar CM, Chariou PL, Horn LA, Hicks KC, Palena C, Schlom J, et al. Tumor-targeted interleukin-12 synergizes with entinostat to overcome PD-1/PD-L1 blockade-resistant tumors harboring MHC-I and APM deficiencies. *J Immunother Cancer*. junho de 2022;10(6):e004561.
 34. Miller JP, Egbulefu C, Prior JL, Zhou M, Achilefu S. Gradient-Based Algorithm for Determining Tumor Volumes in Small Animals Using Planar Fluorescence Imaging Platform. *Tomography*. março de 2016;2(1):17–25.
 35. Panis C, Mazzuco TL, Costa CZF, Victorino VJ, Tatakihara VLH, Yamauchi LM, et al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol*. janeiro de 2011;127(1):58–65.
 36. Artero NA, Manchope MF, Carvalho TT, Saraiva-Santos T, Bertozzi MM, Carneiro JA, et al. Hesperidin Methyl Chalcone Reduces the Arthritis Caused by TiO₂ in Mice: Targeting Inflammation, Oxidative Stress, Cytokine Production, and Nociceptor Sensory Neuron Activation. *Molecules*. 15 de janeiro de 2023;28(2):872.
 37. Pinho-Ribeiro FA, Hohmann MSN, Borghi SM, Zarpelon AC, Guazelli CFS, Manchope MF, et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. *Chemico-Biological Interactions*. 25 de fevereiro de 2015;228:88–99.
 38. Bortoleti BT da S, Detoni MB, Gonçalves MD, Tomiotto-Pellissier F, Silva TF, Concato VM, et al. Solidagenone in vivo leishmanicidal activity acting in tissue repair response, and immunomodulatory capacity in *Leishmania amazonensis*. *Chem Biol Interact*. 1º de julho de 2022;361:109969.
 39. Betancourt A, Busquets S, Ponce M, Toledo M, Guàrdia-Olmos J, Peró-Cebollero M, et al. The animal cachexia score (ACASCO). *Animal Model Exp Med*. 16 de setembro de 2019;2(3):201–9.
 40. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. janeiro de 2022;12(1):31–46.
 41. Li J, Qin S, Xu J, Xiong J, Wu C, Bai Y, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Apatinib in Patients With Chemotherapy-Refractory Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction. *JCO*. maio de 2016;34(13):1448–54.
 42. Li S, Yu W, Xie F, Luo H, Liu Z, Lv W, et al. Neoadjuvant therapy with immune checkpoint blockade, antiangiogenesis, and chemotherapy for locally advanced gastric cancer. *Nat Commun*. 3 de janeiro de 2023;14(1):8.

43. Atkins MB, Plimack ER, Puzanov I, Fishman MN, McDermott DF, Cho DC, et al. Axitinib in combination with pembrolizumab in patients with advanced renal cell cancer: a non-randomised, open-label, dose-finding, and dose-expansion phase 1b trial. *Lancet Oncol.* março de 2018;19(3):405–15.
44. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180–3.
45. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* março de 2015;22(3):377–88.
46. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021;17(1):22–8.
47. Zhang L, Wang K, Lei Y, Li Q, Nice EC, Huang C. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic Biol Med.* dezembro de 2015;89:452–65.
48. Concato VM, Tomiotto-Pellissier F, Silva TF, Gonçalves MD, Bortoleti BT da S, Detoni MB, et al. 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. *Chem Biol Interact.* 1º de agosto de 2020;326:109133.
49. Concato-Lopes VM, Gonçalves-Lens MD, Tomiotto-Pellissier F, Detoni MB, Cruz EMS, Bortoleti BT da S, et al. Trilobolide-6-O-isobutyrate from *Sphagneticola trilobata* acts by inducing oxidative stress, metabolic changes and apoptosis-like processes by caspase 3/7 activation of human lung cancer cell lines. *Phytomedicine.* 1º de junho de 2024;128:155536.
50. Concato-Lopes VM, Silva TF, Detoni MB, Cruz EMS, Gonçalves MD, da Silva Bortoleti BT, et al. 3,3',5,5'-Tetramethoxybiphenyl-4,4'diol triggers oxidative stress, metabolic changes, and apoptosis-like process by reducing the PI3K/AKT/NF-κB pathway in the NCI-H460 lung cancer cell line. *Biomed Pharmacother.* janeiro de 2024;170:115979.
51. Andersen MH. Tumor microenvironment antigens. *Semin Immunopathol.* março de 2023;45(2):253–64.
52. Esposito A, Criscitiello C, Curigliano G. Immune checkpoint inhibitors with radiotherapy and locoregional treatment: synergism and potential clinical implications. *Curr Opin Oncol.* novembro de 2015;27(6):445–51.
53. Figueroa C, Gálvez-Cancino F, Oyarce C, Contreras F, Prado C, Valeria C, et al. Inhibition of dopamine receptor D3 signaling in dendritic cells increases antigen cross-presentation to CD8+ T-cells favoring anti-tumor immunity. *J Neuroimmunol.* 15 de fevereiro de 2017;303:99–107.
54. Kim SW, Kim CW, Moon YA, Kim HS. Reprogramming of tumor-associated macrophages by metabolites generated from tumor microenvironment. *Anim Cells Syst (Seoul).* 2024;28(1):123–36.

55. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*. 9 de julho de 2015;523(7559):231–5.
56. Ebert PJR, Cheung J, Yang Y, McNamara E, Hong R, Moskalenko M, et al. MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity*. 15 de março de 2016;44(3):609–21.
57. Paschen A, Melero I, Ribas A. Central Role of the Antigen-Presentation and Interferon- γ Pathways in Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Annual Review of Cancer Biology*. 11 de abril de 2022;6(1):1–18.
58. Mukherjee S, Hussaini R, White R, Atwi D, Fried A, Sampat S, et al. TriCurin, a synergistic formulation of curcumin, resveratrol, and epicatechin gallate, repolarizes tumor-associated macrophages and triggers an immune response to cause suppression of HPV+ tumors. *Cancer Immunol Immunother*. maio de 2018;67(5):761–74.
59. Chatterjee K, Mukherjee S, Vanmanen J, Banerjee P, Fata JE. Dietary Polyphenols, Resveratrol and Pterostilbene Exhibit Antitumor Activity on an HPV E6-Positive Cervical Cancer Model: An in vitro and in vivo Analysis. *Front Oncol*. 9 de maio de 2019;9:352.
60. Haghghi D, Yazdani S, Farzanehpour M, Esmaeili Gouvarchinghaleh H. Combined extract of heated TC1, a heat-killed preparation of *Lactobacillus casei* and alpha-galactosyl ceramide in a mouse model of cervical cancer. *Infect Agent Cancer*. 20 de setembro de 2022;17(1):51.
61. Lapenta C, Donati S, Spadaro F, Castaldo P, Belardelli F, Cox MC, et al. NK Cell Activation in the Antitumor Response Induced by IFN- α Dendritic Cells Loaded with Apoptotic Cells from Follicular Lymphoma Patients. *J Immunol*. 1º de agosto de 2016;197(3):795–806.
62. Aiken TJ, Erbe AK, Zebertavage L, Komjathy D, Feils AS, Rodriguez M, et al. Mechanism of effective combination radio-immunotherapy against 9464D-GD2, an immunologically cold murine neuroblastoma. *J Immunother Cancer*. maio de 2022;10(5):e004834.
63. Boulch M, Cazaux M, Cuffel A, Guerin MV, Garcia Z, Alonso R, et al. Tumor-intrinsic sensitivity to the pro-apoptotic effects of IFN- γ is a major determinant of CD4+ CAR T-cell antitumor activity. *Nat Cancer*. julho de 2023;4(7):968–83.
64. Satoh T, Tajima M, Wakita D, Kitamura H, Nishimura T. The development of IL-17/IFN- γ -double producing CTLs from Tc17 cells is driven by epigenetic suppression of *Socs3* gene promoter. *Eur J Immunol*. setembro de 2012;42(9):2329–42.
65. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Takamura M, Iguchi C, Dong M, et al. Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. *Anticancer Res*. 2000;20(5A):3137–42.

66. Carolan E, Tobin LM, Mangan BA, Corrigan M, Gaoatswe G, Byrne G, et al. Altered Distribution and Increased IL-17 Production by Mucosal-Associated Invariant T Cells in Adult and Childhood Obesity. *The Journal of Immunology*. 15 de junho de 2015;194(12):5775–80.
67. Guéry L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int*. 2015;2015:314620.
68. Sawa-Wejksza K, Kandefer-Szerszeń M. Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66(2):97–111.
69. Wang S, Liu G, Li Y, Pan Y. Metabolic Reprogramming Induces Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2022;13:840029.
70. LaMarche NM, Hegde S, Park MD, Maier BB, Troncoso L, Le Berichel J, et al. An IL-4 signalling axis in bone marrow drives pro-tumorigenic myelopoiesis. *Nature*. janeiro de 2024;625(7993):166–74.
71. Hao Y, Yan Z, Zhang A, Hu S, Wang N, Luo XG, et al. IL-6/STAT3 mediates the HPV18 E6/E7 stimulated upregulation of *MALAT1* gene in cervical cancer HeLa cells. *Virus Research*. 1º de maio de 2020;281:197907.
72. Su K, Zhao Q, Bian A, Wang C, Cai Y, Zhang Y. A novel positive feedback regulation between long noncoding RNA UICC and IL-6/STAT3 signaling promotes cervical cancer progression. *Am J Cancer Res*. 2018;8(7):1176–89.
73. Ren C, Cheng X, Lu B, Yang G. Activation of interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 by human papillomavirus early proteins 6 induces fibroblast senescence to promote cervical tumourigenesis through autocrine and paracrine pathways in tumour microenvironment. *Eur J Cancer*. dezembro de 2013;49(18):3889–99.
74. Li D, Huang Y, Wei M, Chen B, Lu Y. Overexpression of SOCS2 Inhibits EMT and M2 Macrophage Polarization in Cervical Cancer via IL-6/JAK2/STAT3 Pathway. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2024;27(7):984–95.
75. Morgan EL, Macdonald A. Autocrine STAT3 activation in HPV positive cervical cancer through a virus-driven Rac1-NFκB-IL-6 signalling axis. *PLoS Pathog*. junho de 2019;15(6):e1007835.
76. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 13 de março de 2003;22(10):1517–27.
77. Soria Rivas A, Escobar Álvarez Y, Blasco Cordellat A, Majem Tarruella M, Molina Mata K, Motilla de la Cámara M, et al. SEOM clinical guidelines for cancer anorexia-cachexia syndrome (2023). *Clin Transl Oncol*. novembro de 2024;26(11):2866–76.

78. Zhang L, Bonomi PD. Immune System Disorder and Cancer-Associated Cachexia. *Cancers (Basel)*. 27 de abril de 2024;16(9):1709.
79. Yakovenko A, Cameron M, Trevino JG. Molecular therapeutic strategies targeting pancreatic cancer induced cachexia. *World J Gastrointest Surg*. 27 de dezembro de 2018;10(9):95–106.
80. Silva G, Marins M, Fachin AL, Lee SH, Baek SJ. Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. *Mol Carcinog*. outubro de 2016;55(10):1438–48.
81. Pijet B, Pijet M, Litwiniuk A, Gajewska M, Pająk B, Orzechowski A. TNF- α and IFN- γ -dependent muscle decay is linked to NF- κ B- and STAT-1 α -stimulated Atrogin1 and MuRF1 genes in C2C12 myotubes. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:171437.
82. Argilés JM, López-Soriano FJ, Stemmler B, Busquets S. Novel targeted therapies for cancer cachexia. *Biochem J*. 27 de julho de 2017;474(16):2663–78.

FIGURES

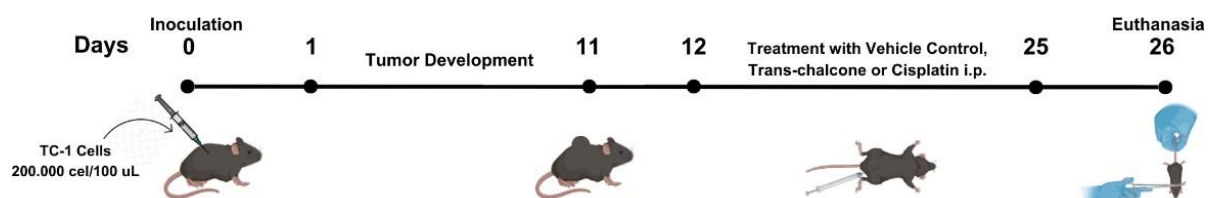
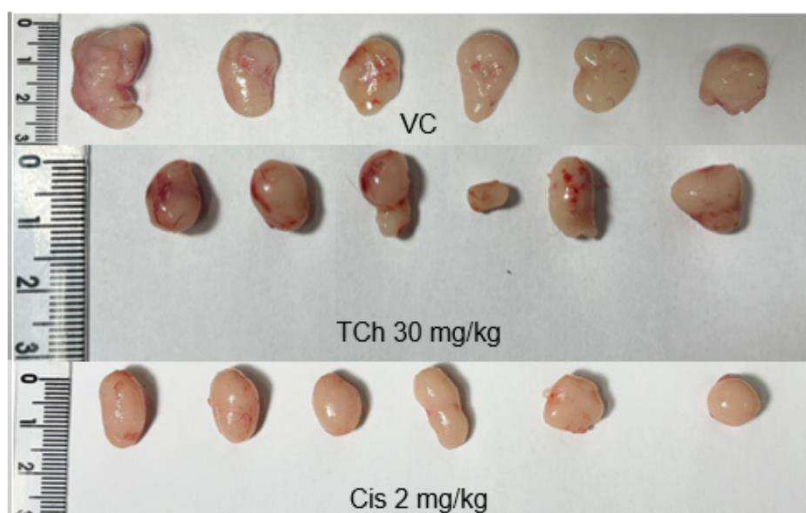


Figure 1. Experimental design. The animals were inoculated on day 0 with TC-1 cells at a concentration of 2×10^5 cells/100 μ L, in the dorsolateral region, subcutaneously. They then waited for the tumor to develop, from day 1 to day 11 post-inoculation. From day 12 to 25 post-inoculation, the respective treatments were carried out with Trans-Chalcone 30 mg/kg, Cisplatin 2 mg/kg or Control Vehicle with saline + tween 80 10%. On the 26th day, the animals were euthanized and the tumors, blood and gastrocnemius muscles were collected for the respective experiments.

A



B

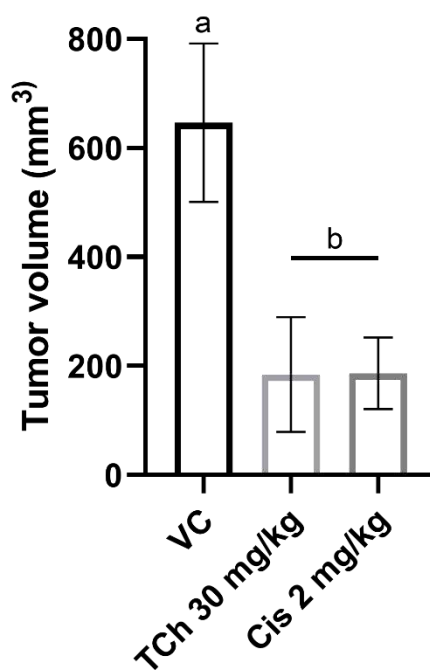


Figure 2. Treatment with *Trans*-Chalcone promotes inhibition of tumor growth in murine model of cervical cancer. (A) Image showing the size of tumors of the animals from the different treatment groups. **(B)** Final tumor volume of the animals of the different groups of treatment. Values was expressed as mean \pm SEM. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p < 0,0001$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p < 0,0001$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,9991$. VC: vehicle control. TCh: *Trans*-Chalcone. Cis: Cisplatin. (n=8).

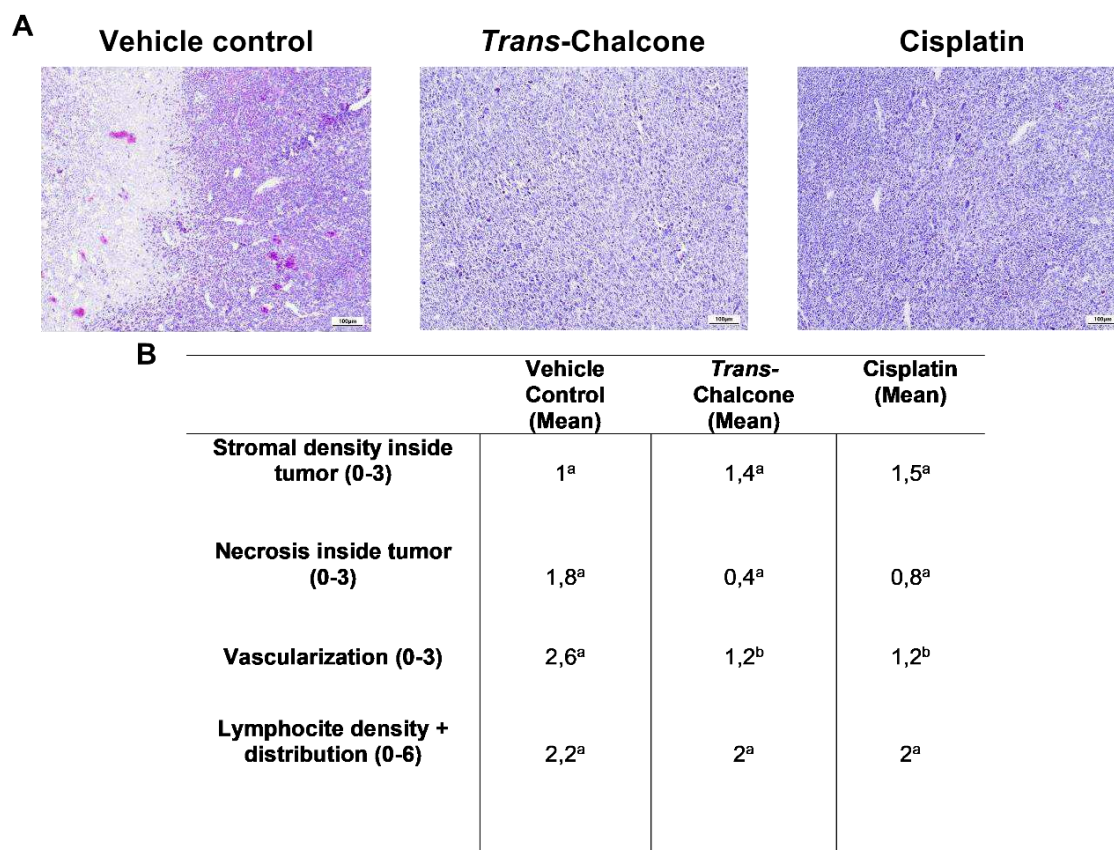


Figure 3. *Trans*-Chalcone promotes reduction of vascularization in the tumor. (A) Photomicrographs of tumors from animals in both groups, showing the reduction in vascularization promoted by the treatment (100 μ m). (B) Table showing the means and quantitative comparisons of histopathological parameters between the different groups. Stromal density inside tumor – Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,4687$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$. Necrosis inside tumor - Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,1213$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,2630$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$. Vascularization - Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0217$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0217$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$. Lymphocyte density + distribution - Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p > 0,9999$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$. All values was expressed as mean \pm SEM. VC: vehicle control. TCh: *Trans*-Chalcone. Cis: Cisplatin. (n=8).

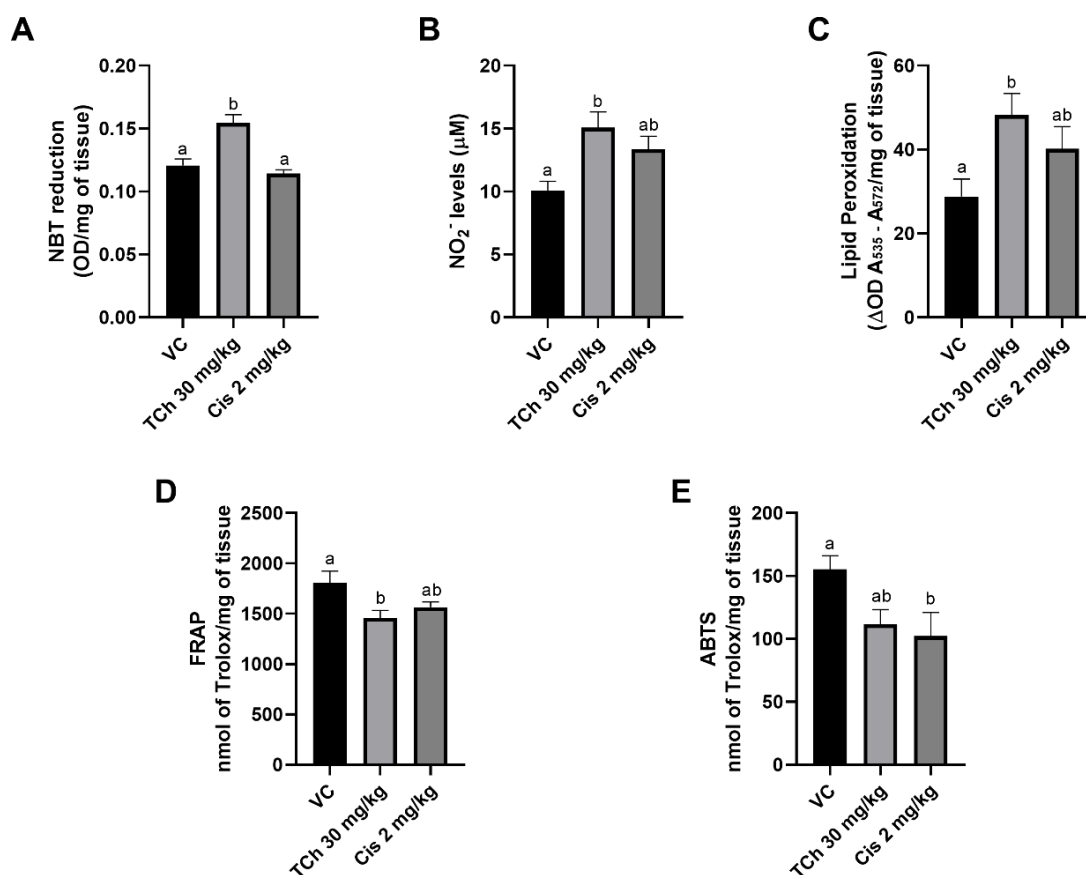


Figure 4. *Trans*-Chalcone induces oxidative stress in the tumor microenvironment. (A) Superoxide anion was determined using NBT. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0003$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,6409$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p < 0,0001$. (B) Nitric oxide metabolites was determined by adapted Griess method. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0065$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0829$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,4778$. (C) Lipid peroxidation was determined by TBARS method. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0287$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,5106$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,6683$. (D) Ferric reduction ability, determined by using Trolox as antioxidant. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0201$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,1247$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,6480$. (E) Total antioxidant activity, through the capture of the ABTS radical. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,1184$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0347$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,8971$. All values was expressed as mean \pm SEM. VC: vehicle control. TCh: *Trans*-Chalcone. Cis: Cisplatin. (n=8).

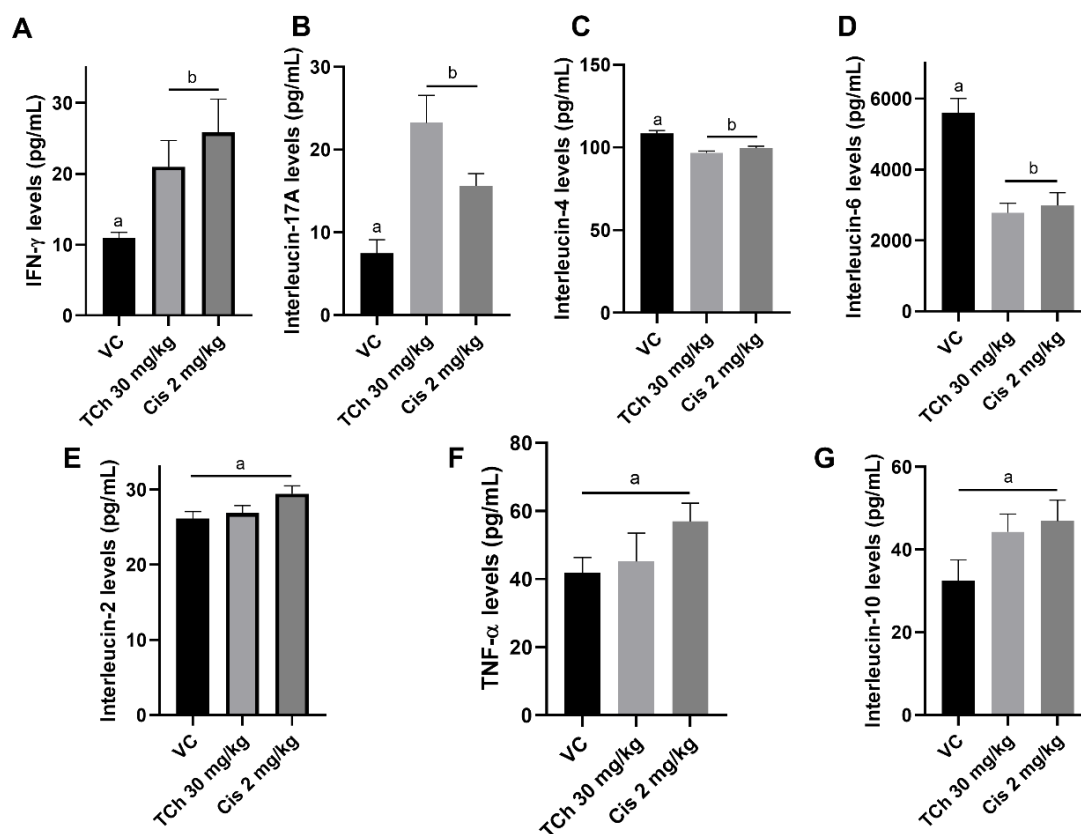


Figure 5. *Trans*-Chalcone treatment promotes immunomodulation in tumor microenvironment. Cytokines were measured by flow cytometry using the CBA Th1, Th2 and Th17 kit. **(A)** Interferon-gamma levels in the tumor microenvironment. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0237$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0009$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$. **(B)** Interleucin-17A levels in the tumor microenvironment. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0002$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0411$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0593$. **(C)** Interleucin-4 levels in the tumor microenvironment. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p < 0,0001$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0003$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,1778$. **(D)** Interleucin-6 levels in the tumor microenvironment. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p < 0,0001$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p < 0,0001$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p < 0,9058$. **(E)** Interleucin-2 levels in the tumor microenvironment. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,8588$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0694$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,1896$. **(F)** Tumor necrosis factor-alpha levels in the tumor microenvironment. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p =$

0,9274; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,2463$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,4125$. **(G)** Interleucin-10 levels in the tumor microenvironment. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,2440$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,1103$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,9343$. VC: vehicle control. TCh: *Trans*-Chalcone. Cis: Cisplatin. (n=8).

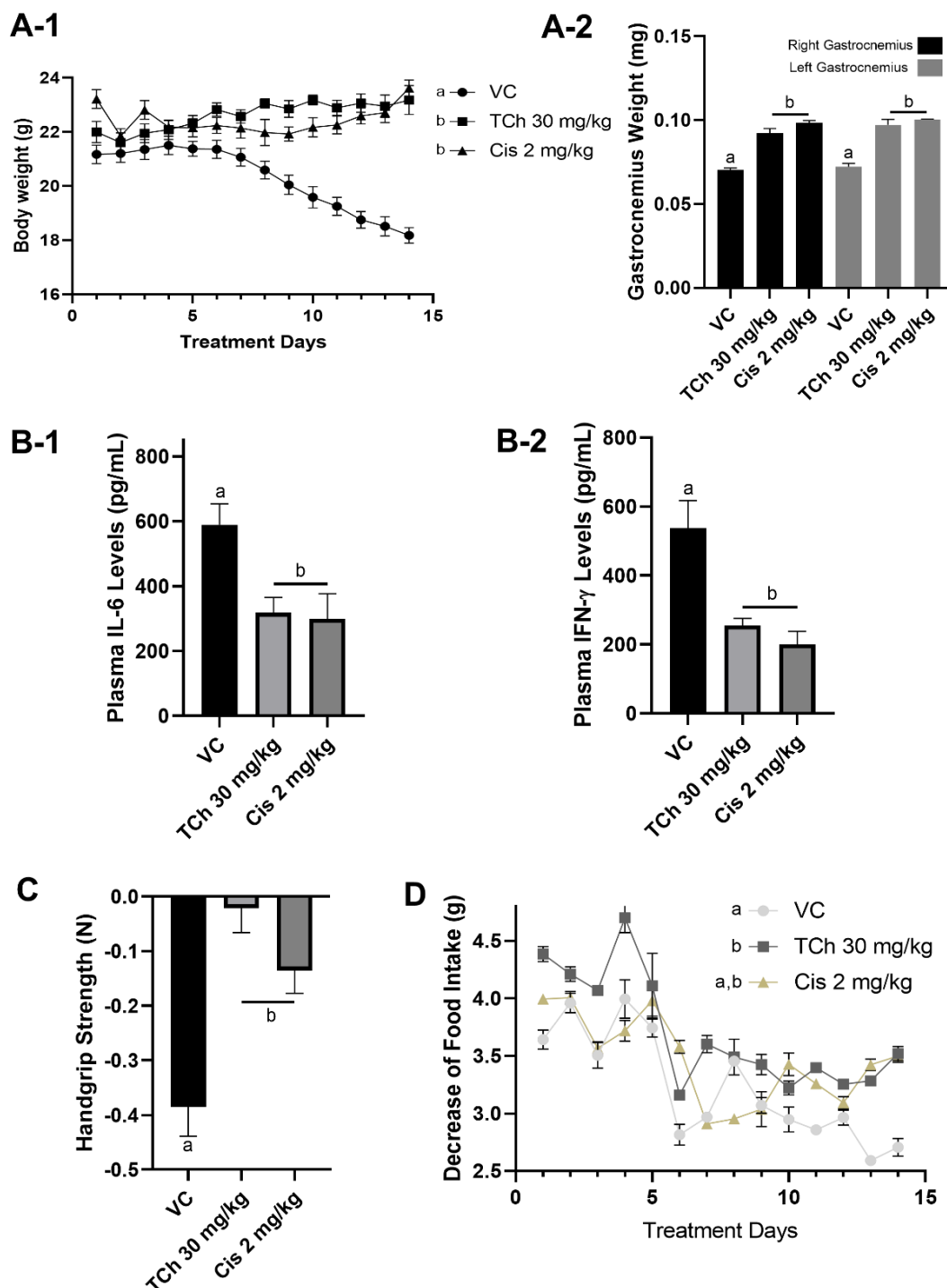


Figure 6. *Trans*-Chalcone treatment prevents the appearance of cancer-related cachexia parameters. **(A)** Weight parameters. **(A-1)** Body weight

parameter. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p < 0,0001$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p < 0,0001$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p > 0,9999$. **(A-2)** Gastrocnemius weight parameter. Multiple comparisons of Right Gastrocnemius: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p < 0,0002$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p < 0,0001$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,3168$. Multiple comparisons of Left Gastrocnemius: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p < 0,0001$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p < 0,0001$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,9014$. **(B)** Inflammatory parameters. **(B-1)** Plasmatic levels of IL-6. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0184$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0116$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,9771$. **(B-2)** Plasmatic levels of IFN- γ . Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0362$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0008$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,7737$. **(C)** Physical activity parameter. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p < 0,0001$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,0131$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,4939$. **(D)** Anorexia parameter. Multiple comparisons: VC vs. TCh 30 mg/kg, $p = 0,0231$; VC vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,3783$; TCh 30 mg/kg vs. Cis 2 mg/kg, $p = 0,3424$. All values was expressed as mean \pm SEM. VC: vehicle control. TCh: *Trans-Chalcone*. Cis: Cisplatin. (n=8).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que o tratamento por 14 dias com *Trans*-Chalcona, na dose de 30 mg/kg de peso corporal, foi capaz de inibir o crescimento tumoral, com resultados de redução do volume tumoral semelhantes ao tratamento com a Cisplatina, droga antineoplásica de referência, no mesmo modelo. O tratamento promoveu ainda estresse oxidativo no microambiente tumoral, evidenciado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e peroxidação lipídica, seguido de redução da proteção antioxidante. Além disso, a intervenção terapêutica com *Trans*-Chalcona reduziu a vascularização no tumor. Ademais, o tratamento também promoveu a imunomodulação no microambiente tumoral para um perfil antitumoral. Adicionalmente, a administração de *Trans*-Chalcona foi capaz de reverter o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer no modelo estudado. Assim, de acordo com os nossos dados, a *Trans*-Chalcona se mostra um candidato promissor para um fármaco antineoplásico direcionado ao câncer cervical associado a HPVs de Alto Risco, principalmente o HPV-16.

ANEXO



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 035/2024

Londrina, 17 de abril de 2024.

Prezado (a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: "Avaliação da atividade antitumoral, imunomoduladora e efeitos na sobrevida da *trans*-chalcona em modelo de tumor cervical de camundongos C57BL/6", protocolo CEUA nº 015.2024, sob a responsabilidade de Wander Rogério Pavanelli, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em reunião realizada em **17/04/2024**.

Este projeto tem por objetivo avaliar a atividade antitumoral, imunomoduladora e efeitos na sobrevida da *trans*-chalcona em modelo de tumor cervical de células TC-1 em camundongos C57BL/6. **Grau de invasividade: G13.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	25/05/2024 a 25/11/2025
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	64
Peso/ Idade	20 a 30 g / 6 a 8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Tumor

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Profª Drª Patricia Chimin Perandini
Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo.(a) Sr.(a) Prof. (a) Dr. (a) Wander Rogério Pavanelli
Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Patológicas /CCB
C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas /CCB
C/C para a Direção do Biotério Central/CCB