



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica**

**Letícia Galdino de Oliveira**

**PROSPECÇÃO DE TERAPIA EPIGENÉTICA COM INIBIDORES  
DE HISTONA DEACETILASE (HDACi) PARA CÂNCER CERVICAL  
ASSOCIADO AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

**Araraquara, SP**

**2023**

**Letícia Galdino de Oliveira**

**PROSPECÇÃO DE TERAPIA EPIGENÉTICA COM INIBIDORES DE  
HISTONA DEACETILASE (HDACi) PARA CÂNCER CERVICAL  
ASSOCIADO AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador(a): Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

**Araraquara, SP**

**2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais que sempre me incentivaram a buscar o melhor para mim, me deram a oportunidade e o apoio necessário para que fosse possível essa conquista.

À República Éter na Mente, que me acolheu desde o primeiro dia em Araraquara e foi meu apoio durante todos os anos de graduação, fazendo deles meus melhores anos.

Ao Pedro, que me ouviu e me incentivou durante todos os anos. Às minhas amigas, Ana Luisa, Beatriz e Daniela, pois sem elas minha graduação não teria sido a mesma.

À Natália Behaker, Kethllen Lisboa e Juliana Brandi, por terem me ensinado e me ajudado em diversos momentos ao longo do processo teórico e prático no laboratório.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos meus professores que me ensinaram tudo que eu sei para me tornar uma profissional;

A Profa.Dra. Christiane Pienna Soares, que me deu a oportunidade de me aprofundar sobre esse tema e acreditou no meu potencial para tal e ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos por ter aceitado o desafio de conduzir a orientação.

## RESUMO

O câncer cervical é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres. Este câncer está majoritariamente associado à infecção persistente por tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano (HPV). A família do HPV apresenta cerca de 200 tipos diferentes de vírus, sendo o HPV 16 e 18 os mais comuns e responsáveis por 70% a 80% do câncer cervical. O HPV é um vírus de DNA, pequeno e circular, envolto em um capsídeo proteico icosaédrico. Apresenta três importantes regiões genômicas que são denominadas: Região reguladora *up-stream* (URR); *Early* (E) e *Late* (L). E2 é um repressor transcricional e tem sua função perdida após a integração do genoma viral, resultando no aumento de expressão dos genes E6 e E7. Esse evento resulta no acúmulo de danos ao DNA, degradando p53 e pRb e, por consequência, interrompendo controles celulares como apoptose e proliferação descontrolada. Dentre as alterações epigenéticas, destaca-se o processo de desacetilação das histonas como alternativa no tratamento de algumas doenças. As HDACs (Histona Deacetilase) removem grupamentos acetil de lisinas presentes na cromatina, causando alteração em seu estado conformacional, retornando ao estado condensado. A disfunção da enzima HDAC de classe I, tipo 8 está sendo proposta como alternativa para o câncer cervical associado ao HPV. A terapia combinada é uma modalidade de tratamento que agrega dois ou mais agentes terapêuticos, que pode ter ação sinérgica aditiva ou antagônica, possibilitando um aumento da eficácia em comparação com a abordagem de monoterapia. Neste trabalho avaliamos o potencial de dois compostos: Quercetina e o composto estilbeno (derivado sintético, JSK6) de atuar como possíveis antivirais com ação de inibidor de HDAC. Os compostos foram avaliados em monoterapia e terapia combinada em linhagem de HaCaT, Caski, SiHa e C33-A, através de ensaios de MTT e análise de resultados utilizando Graph Pad Prism 5.1 e SinergyFinder. A Quercetina apresentou melhor ação nas células infectadas com HPV, apresentando um IC50 de 104,83µM em SiHa e 81,26µM em CasKi. O composto JSK6 apresentou uma curva dose resposta em todas as linhagens. No tratamento combinado, os compostos apresentaram ação, majoritariamente, antagônica nas células de queratinócitos (HaCat) e de com a presença de HPV (SiHa).

**Palavras-chave:** HPV. CÂNCER CERVICAL. TRATAMENTO. EPIGENÉTICO.

## ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common type of cancer in women. This cancer is mostly associated with persistent infection by oncogenic types of Human Papillomavirus (HPV). The HPV family has about 200 different types of viruses, with HPV 16 and 18 being the most common and responsible for 70% to 80% of cervical cancer. HPV is a small, circular DNA virus enclosed in an icosahedral protein capsid. It presents three important genomic regions that are called: Upstream regulatory region (URR); Early (E) and Late (L). E2 is a transcriptional repressor and its function is lost after integration into the viral genome, resulting in increased expression of the E6 and E7 genes. This event results in the accumulation of DNA damage, degrading p53 and pRb and, consequently, disrupting cellular controls such as apoptosis and uncontrolled proliferation. Among the epigenetic alterations, the histone deacetylation process stands out as an alternative in the treatment of some diseases. HDACs (Histone Deacetylase) remove acetyl groups of lysines present in chromatin, causing a change in its conformational state, returning to the condensed state. HDAC enzyme class I, type 8 dysfunction is being proposed as an alternative for HPV-associated cervical cancer. Combined therapy is a treatment modality that combines two or more therapeutic agents, which can have an additive or antagonistic synergistic action, allowing an increase in efficacy compared to the monotherapy approach. In this study, we evaluated the potential of two compounds: Quercetin and the compound stilbene (synthetic derivative, JSK6) to act as possible antivirals with HDAC inhibitor action. The compounds were evaluated in monotherapy and combination therapy in HaCaT, Caski, SiHa and C33-A strains, through MTT assays and analysis of results using Graph Pad Prism 5.1 and SinergyFinder. Quercetin showed better action in cells infected with HPV, with an IC<sub>50</sub> of 104.83 $\mu$ M in SiHa and 81.26 $\mu$ M in CasKi. The JSK6 compound showed a dose-response curve in all strains. In the combined treatment, the compounds showed mostly antagonistic action on keratinocyte cells (HaCat) and cells with the presence of HPV (SiHa).

**Palavras-chave:** HPV. CERVICAL CANCER. TREATMENT. EPIGENETIC.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Número estimado da incidência e mortalidade de casos de câncer no mundo no ano de 2020 segundo a Organização Mundial da Saúde. Imagem retirada do site GLOBOCAN.....	16
<b>Figura 2.</b> Estrutura dos compostos.....	19
<b>Figura 3.</b> Modelo de plaqueamento.....	21
<b>Figura 4.</b> Plaqueamento CheckerBoard.....	23
<b>Figura 5.</b> Relação concentração x viabilidade celular frente ao tratamento com HDACi 8 (JSK6) em HaCaT por 72 horas.....	25
<b>Figura 6.</b> Análise Estatística JSK6 em HaCat.....	26
<b>Figura 7.</b> Relação concentração x viabilidade celular frente ao tratamento com Quercetina em HaCaT por 72 horas .....	27
<b>Figura 8.</b> Análise Estatística do tratamento com Quercetina em HaCat.....	28
<b>Figura 9.</b> Relação concentração x viabilidade celular de JSK6 em SiHa.....	29
<b>Figura 10.</b> Análise Estatística JSK6 em SiHa.....	30
<b>Figura 11.</b> Relação concentração x viabilidade celular de Quercetina em SiHa.....	32
<b>Figura 12.</b> Análise Estatística de Quercetina em SiHa.....	33
<b>Figura 13.</b> Relação concentração x viabilidade celular de JSK6 em CasKi.....	34
<b>Figura 14.</b> Análise Estatística de JSK6 em CasKi.....	35
<b>Figura 15.</b> Relação concentração x viabilidade celular de Quercetin em CasKi.....	36
<b>Figura 16.</b> Análise Estatística de Quercetina em CasKi.....	37
<b>Figura 17.</b> Relação concentração x viabilidade celular de JSK6 em C33-A.....	38
<b>Figura 18.</b> Análise Estatística JSK6 em C33-A.....	39
<b>Figura 19.</b> Relação concentração x viabilidade celular de Quercetina em C33-A.....	40
<b>Figura 20.</b> Análise Estatística Quercetina em C33-A .....	41
<b>Figura 21.</b> Relatório fornecido pelo software Synergyfinder da HaCat.....	44
<b>Figura 22.</b> Relatório fornecido pelo software Synergyfinder da SiHa .....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em HaCaT no período de 72 horas.....	24
<b>Tabela 2.</b> Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em HaCaT no período de 72 horas.....	26
<b>Tabela 3.</b> Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em SiHa no período de 72 horas.....	28
<b>Tabela 4.</b> Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em SiHa no período de 72 horas.....	31
<b>Tabela 5.</b> Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em CasKi no período de 72 horas.....	33
<b>Tabela 6.</b> Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em CasKi no período de 72 horas.....	35
<b>Tabela 7.</b> Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em C33-A no período de 72 horas.....	37
<b>Tabela 8.</b> Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em C33-A no período de 72 horas.....	39
<b>Tabela 9.</b> Resultados terapia combinada em HaCat.....	42
<b>Tabela 10.</b> Resultados terapia combinada em SiHa.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B - BRANCO

CN - CONTROLE NEGATIVO

CP - CONTROLE POSITIVO

CV - CONTROLE DE VEÍCULO

DMSO - DIMETILSULFÓXIDO

DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

E - CODIFICAÇÃO GENÉTICA INICIAL

HATs - HISTONA ACETILTRANSFERASE

HDACI – INIBIDOR HISTONA DESACETILASE

HDACs - HISTONA DESACETILASE

HPV – HUMAN PAPILOMA VIRUS

HSIL - HIGH-GRADE INTRAEPITHELIAL SQUAMOUS LESIONS

CI<sub>50</sub> – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE 50%

IS – ÍNDICE DE SELETIVIDADE

L - CODIFICAÇÃO GENÉTICA TARDIA

LSIL- LOW-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESION

MTT - BROMETO DE 3-[4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL]-2,5-DIFENILTETRAZÓLIO

NIC – NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

PRB – PROTEÍNA RETINOBLASTOMA

URR- UPSTREAM REGULATORY REGION

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 HPV .....	13
1.2 Câncer cervical associado ao HPV .....	14
1.3 Epidemiologia.....	16
1.4 Terapias epigenéticas: inibidores de histona deacetilase e o câncer.....	17
2. OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Estrutura química de composto HDACi 8 e Quercetina .....	19
3.2 Preparo das soluções .....	19
3.3. Cultura de células .....	19
3.4. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT .....	20
3.5. Desenho do experimento .....	21
3.6. Análise Estatística .....	21
3.7 Método Checkerboard.....	22
3.8 SynergyFinder.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Ensaio em monoterapia: HACAT .....	24
4.2 Ensaio em monoterapia: SiHa.....	28
4.3 Ensaio em monoterapia: CasKi.....	33
4.4 Ensaio em monoterapia: C33-A .....	37
4.5 Ensaio em terapia combinada: JSK6 e Quercetina .....	41
4.6 Análise do ensaio de terapia combinada .....	43
5. CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS.....	47

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 HPV

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus pertencente à família *Papovaviridae*, considerado pequeno contendo cerca de 55nm de diâmetro, não envelopado, com capsídeo icosaédrico de 72 capsômeros formado por duas proteínas de capsídeo, L1 e L2. O material genético é de DNA, pequeno e circular (OKUNADE, 2020). Atualmente, já foram identificados mais de 200 genótipos, sendo divididos em gêneros: Alpha, Nu-/Mu-, Beta- and Gamma-papilomavirus (SANJOSÉ, 2017). Dentre esses genótipos, os vírus são classificados em: alto risco (oncogênicos), os associados com o desenvolvimento de câncer cervical, de orofaringe, ânus, vagina, vulva e pênis, e de baixo risco ou não oncogênico, os relacionados com os tipos virais que causam verrugas genitais e no trato respiratório (ROMAN; ARAGONES, 2021). Os HPV 16 e 18 são os vírus de alto risco mais comuns e responsáveis por 70% a 80% do câncer cervical (GUPTA; MANIA-PRAMANIK, 2019).

O HPV apresenta uma organização genômica dividida em três importantes partes: Região reguladora up-stream (URR); Early (E), [E1, E2, E4, E5, E6 e E7] e Late (L), [L1 e L2] (PAL; KUNDU, 2020). A primeira região (URR) é considerada regulatória e apresenta maior grau de variação no genoma. A região “E” está relacionada com genes envolvidos na replicação viral e na tumorigênese e a região “L” relacionada com a codificação para formação das proteínas L1 e L2, presentes no capsídeo (OKUNADE, 2020). As proteínas E1 e E2 são ativadas para que ocorra ativação da maquinaria de reparo de danos ao DNA do hospedeiro, o que proporciona o acesso do vírus a DNA polimerase e que garante a replicação do genoma viral (BORDIGNON *et al*, 2017). Entretanto, a região E2 é também considerada um repressor transcricional viral e tem sua função perdida após a integração ao DNA do hospedeiro, e isso resulta no aumento de expressão dos genes E6 e E7 (MCBRIDE; WARBURTON, 2017). Esse evento resulta no acúmulo de danos ao DNA, degradando p53 e pRb e, por consequência, interrompendo controles celulares, como apoptose e proliferação descontrolada (HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018). As proteínas E4 e E5 desempenham um papel na regulação das funções virais tardias, liberando vírions e proporcionando um escape das células imunológicas, respectivamente (BORDIGNON *et al*, 2017).

## 1.2 Câncer cervical associado ao HPV

Quando a célula do hospedeiro está em seu estado normal, existem mecanismos que podem ser ativados e são capazes de reparar danos no DNA quando necessário e, nos casos que esse dano não pode ser corrigido, são ativados mecanismos de controle, induzindo proteínas sinalizadoras de apoptose celular. Entretanto, quando a célula está infectada pelo HPV, as oncoproteínas E6 e E7 interrompem a via de controle, inibindo as proteínas de parada celular p53 e pRb. Esse mecanismo ocorre através da ligação da E6 com a p53 que desencadeia a degradação proteossômica mediada por ubiquitina, ou pelo bloqueio de sua ativação. A degradação de pRb ocorre de maneira similar, de forma que E7 inativa a proteína através de ligação, o que promove uma maior liberação do fator de transcrição E2F e inibição da p21. Esse conjunto de ações garante que a apoptose não ocorra e, além disso, que a célula entre na fase S da diferenciação, possibilitando a proliferação celular e a integração do vírus ao DNA do hospedeiro. (BALASUBRAMANIAM, 2019; FISCHER, 2017).

Os vírus infectam o hospedeiro através de microabrasões e se replicam nos epitélios mucosos e cutâneos. Nas células basais do epitélio estratificado, o HPV desenvolve um reservatório e a medida que as células infectadas se diferenciam há amplificação do genoma e síntese das proteínas do capsídeo viral, de modo a ser eliminado na camada superficial do epitélio. Esse processo garante a infecção a longo prazo e uma evasão imunológica, o que desencadeia o aparecimento de verrugas, devido ao espessamento da camada celular, ou o câncer, caso não haja eliminação viral (MCBRIDE, 2022).

O câncer cervical, também conhecido como câncer de colo uterino, acomete a população feminina e é consequência do processo infeccioso persistente causado por tipos oncogênicos do Papilomavirus Humano (HPV) em 99% dos pacientes (KOPS *et al*, 2019). Esse tipo de câncer se desenvolve nas células que revestem o colo do útero, células glandulares e escamosas, sendo mais predominante na zona de transformação ou junção escamo-colunar, local onde as células glandulares do endocérvix encontram as células escamosas do exocérvix. Aproximadamente 70% dos cânceres cervicais são do tipo de células escamosa e quase 25% são de células glandulares (adenocarcinoma) (STUMBAR *et al*, 2019). Entretanto, estudo de Herfs *et*

al revela que a junção escamocolunar do colo de útero pode ser o local precursor do câncer associado ao HPV, devido a proximidade com o tecido de infecção e por sua característica imunológica (HERFS et al, 2012).

O HPV consegue escapar da resposta imunológica através de diversos mecanismos. O fato de todo ciclo de replicação do vírus ocorrer fora da membrana basal das células garante com que fiquem longe das células imunes residentes na camada dérmica, e, devido a produção de L1 e L2 nas células epiteliais superficiais, há redução no reconhecimento nas células onde há infecção e replicação. Além disso, o vírus apresenta um mecanismo capaz de desregular a resposta de Interferons negativamente (IFN). As proteínas E6 e E7 alteraram a expressão de IFN $\alpha$ , que atua como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, devido às propriedades antivirais, anti proliferativas e imunoestimuladoras (BORDIGNON et al, 2017).

A transmissão do vírus do HPV ocorre através do contato com a pele ou mucosa infectada, principalmente devido ao contato sexual desprotegido, podendo ser através do contato oral-genital, genital-genital e manual-genital (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O curso natural da infecção por HPV ocorre através da infecção, persistência na infecção e desenvolvimento do câncer. Entretanto, na maioria dos casos, as infecções são eliminadas nos seus estágios iniciais através do sistema imune do hospedeiro (DELLA FERA et al, 2021).

Quando não eliminado, o vírus tem sua replicação acelerada nas células diferenciadas, causando alterações celulares microscópicas no Papanicolaou denominada por atipia colicitótica, aumento nuclear (cariomegalia), hiper cromasia e ausência de coloração com impressão de um “buraco” no citosol. Tais alterações são conhecidas como neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC 1) ou lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), acometendo o terço inferior do epitélio e apresentando uma menor evidência. Em 90% dos casos, a lesão desaparece dentro de 2 anos e não requerem tratamento, porém, pode se desenvolver para NIC 2, uma alteração moderada, localizada nos dois terços inferiores, e sem seguida em NIC 3, uma alteração displásica que chega até o terço superior do epitélio. A NIC 2 e 3 são conhecidas como lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e também podem se desenvolver independente da NIC 1 (BASU et al., 2018).

### 1.3 Epidemiologia

O câncer de colo de útero foi classificado como o quarto câncer de maior incidência e mortalidade no mundo. Segundo dados do Globocan, em 2020 houve 604.127 novos casos e uma mortalidade de 341.831 pessoas, como pode ser observado na figura 1. Ademais, a incidência de câncer devido ao HPV foi associado com o PIB do país, de modo que países em desenvolvimento apresentam um maior número de casos. Assim, é possível identificar uma taxa de incidência de 9,6 a cada 100.000 mulheres em países desenvolvidos, enquanto em países em desenvolvimento essa incidência cresce para 267 a cada 100.000 mulheres (ARBYN, 2020).

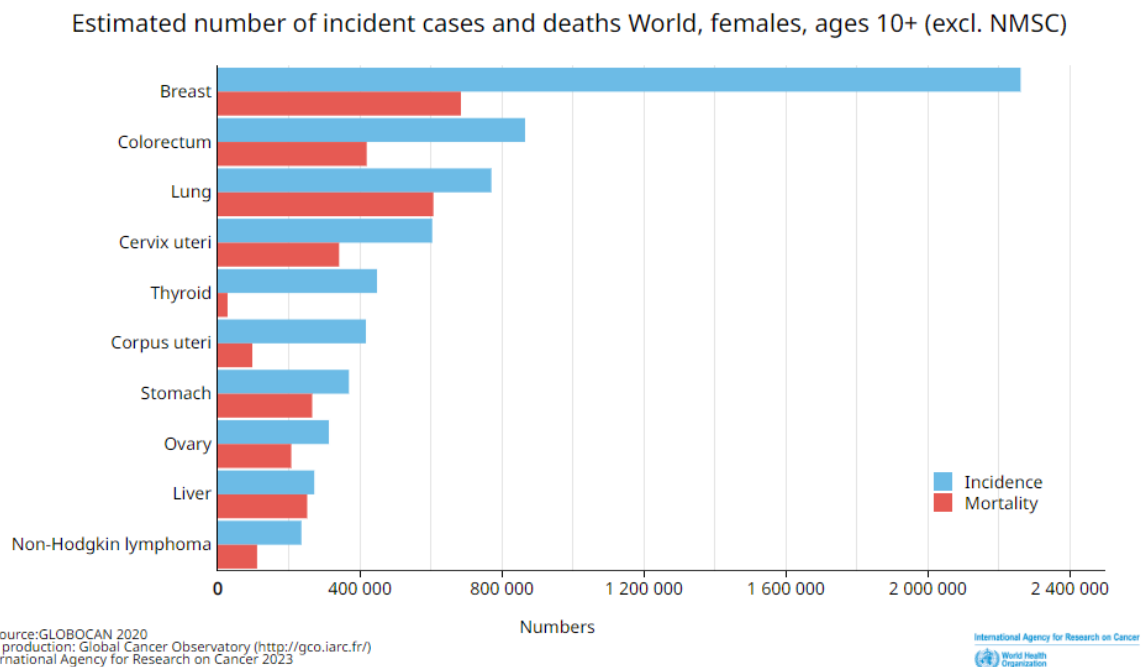


Figura 1. Número estimado da incidência e mortalidade de casos de câncer no mundo no ano de 2020 segundo a Organização Mundial da Saúde. Imagem retirada do site GLOBOCAN /IARC/OMS.

No Brasil, em 2020, ocorreram 6.627 óbitos devido ao câncer de colo de útero, indicando uma taxa de mortalidade de 4,60 a cada 100 mil mulheres, ocupando a terceira posição de incidência e a quarta de mortalidade por câncer em mulheres no país (INCA, 2022). Em 2023, são estimados cerca de 17.010 novos casos, representando uma taxa de incidência de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres. Entretanto, há uma diferença na incidência quando se compara os diferentes estados do país. Em uma análise regional, é possível identificar que a região Norte apresenta

a maior taxa de incidência (20,48/100 mil mulheres), seguido pela região Nordeste (17,59/100mil), Centro-oeste (16,66/100mil), Sul (14,55/100mil) e Sudeste (12,93/100mil) (INCA, 2023).

#### **1.4 Terapias epigenéticas: inibidores de histona deacetilase e o câncer**

Os mecanismos celulares de metilação, fosforilação e acetilação, quando desregulados, podem ser considerados como alterações epigenéticas promotoras da carcinogênese. Em um estado celular normal, o processo de acetilação e desacetilação das histonas permite à RNA polimerase promover a transcrição de genes ou devolvê-los a um estado reprimido (não transcricional), regulação normal de uma célula (SOTO; SONG; MCLAUGHLIN-DRUBIN, 2017). O processo de acetilação ocorre através das enzimas HATs (Histona acetiltransferase), que adicionam grupamentos acetil em resíduos de lisina nas histonas, provocando o afrouxamento da cromatina, enquanto a desacetilação utiliza das enzimas HDACs (Histona Deacetilaseq), que removem estes grupamentos acetil e a cromatina retorna ao estado condensado (FASS et al, 2012). Em humanos, existem 18 isoformas de HDAC, divididas em quatro classes diferentes, classe tipo I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9), IIB (HDAC6 e HDAC10) e IV (HDAC11) (HO; CHAN; GANESAN, 2020).

Nos últimos anos, a procura por tratamentos epigenéticos para o câncer vem crescendo, sendo a inibição da disfunção da enzima HDAC de classe I, tipo 8, uma importante proposta para o tratamento do câncer cervical associado ao HPV, visto que essa enzima tem um aumento de expressão em alguns tumores (FREITAS et al, 2021). Embora seja considerada da classe I das enzimas, análises filogenéticas indicam que as características são semelhantes às de classe I e II. A HDAC 8 pode ser expressada em diversos tecidos, sendo encontrada no núcleo celular (FASS, 2012). A HDAC 8 tem ação de deacetilação em todas as histonas, porém estudos mostram que o principal alvo são as proteínas H3 e H4 das histonas tetraméricas. Além disso, há o indício de que proteínas também foram identificadas como substratos para deacetilação, como por exemplo a p53 (HO; CHAN; GANESAN, 2020).

Considerando essas características, muitos fármacos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de ser utilizado com um tratamento específico de câncer, visto que a ação das HDAC podem ser interrompidas com a utilização de inibidores de histona deacetilases (HDACi), moléculas que têm a capacidade de se ligar ao sítio ativo destas enzimas (GANAI; SHEIKH; BABA, 2020). Além disso, há procura de moléculas naturais que apresentem essas mesmas características, uma vez que produtos naturais são uma das fontes mais eficientes e produtivas para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos relatam o potencial da quercetina (composto da classe das isoflavonas) como inibidor de HDACi 8, com ação em linhagens celulares para diferentes tipos de câncer, incluindo de câncer cervical associado ao HPV (XU et al., 2021).

A terapia combinada é uma modalidade de tratamento, que agrega dois ou mais agentes terapêuticos, podendo aumentar a eficácia em comparação com a abordagem de monoterapia (MOKHTARI et al., 2017). Desta maneira, a terapia combinada de inibidores HDACs podem ter ação sinérgica, aditiva ou antagônica, atuando em mecanismos moleculares que favorecem o tratamento do câncer (XU et al., 2021).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a eficácia antitumoral *in vitro*, em monoterapia de um composto sintético inibidor de HDACi 8 (JSK6) e do flavonoide Quercetina, um composto natural também já descrito como inibidor de HDAC 8; e avaliar o sinergismo ou antagonismo desses compostos no tratamento. Ambos os testes, utilizando o ensaio de efeito citotóxico em diferentes concentrações, a fim de verificar a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT.

### **2.2 Objetivos específicos**

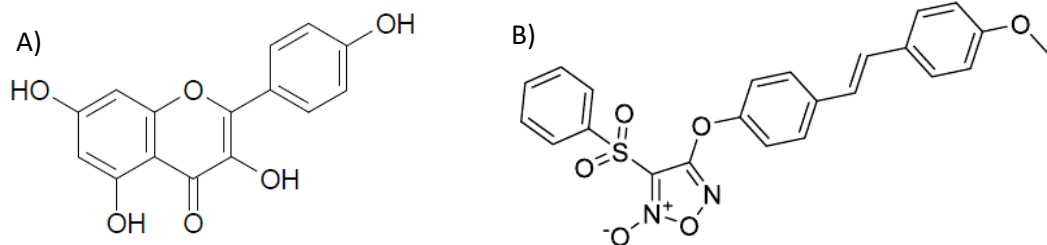
- Realizar curva dose resposta no tempo de 72 horas do JSK6 e quercetina em monoterapia, nas linhagens celulares de câncer cervical HPV 16 positiva (SiHa e CasKi), câncer cervical HPV-negativo (C33-A) e queratinócito imortalizado de pele não tumoral (HaCaT), nas concentrações 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu$ M.

- Estabelecer o Índice de 50% de Inibição (IC50) dos compostos em monoterapia em todas as linhagens celulares e o índice de seletividade (IS)
- Verificação do efeito da combinação dos compostos utilizando o software SynergyFinder.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Estrutura química de composto HDACi 8 e Quercetina

**Figura 2.** Estrutura dos compostos: A) Quercetina obtida em colaboração com o Prof Dr André Gonzaga\*; B) Composto sintetizado HDACi 8 (JSK6), colaboração do Prof. Dr. Jean Leandro do Santos\*, \*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).



#### 3.2 Preparo das soluções

Após o recebimento dos compostos puros, foram preparadas alíquotas de soluções de estoque, utilizando 100% de DMSO para solubilização. Segundo protocolo, a solução para uso no tratamento das células deve conter apenas 0,5 a 1% de DMSO, dessa forma, foi preparado uma solução mãe contendo 10% de DMSO e a solução para uso, com meio de cultura e apenas 0,5% de DMSO. Cada solução foi armazenada congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sob abrigo de luz.

#### 3.3. Cultura de células

As linhagens celulares foram cultivadas em ambiente esterilizado nos frascos de cultura de célula utilizando meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) suplementado com soro fetal bovino 10% (Life Technologies) e solução de antibiótico/antimicótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100  $\mu\text{g/mL}$  e anfotericina B 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera com  $\text{CO}_2$  5%. As células foram mantidas em condições de cultivo até se obter subconfluência de 80% para os ensaios e colhidas com solução tripsina 0,5% (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) em solução salina de Hank (HBSS) (v/v).

As linhagens celulares utilizadas foram as linhagens de câncer cervical transformadas com HPV16 positiva SiHa (1 a 2 cópias virais), HPV16 positiva CasKi (400 a 600 cópias virais), linhagem não tumoral de pele espontaneamente imortalizada (HaCaT) e linhagem de câncer cervical HPV-negativo (C33-A).

### 3.4. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

A avaliação de viabilidade celular foi realizada através do ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), que é metabolizado, reduzido, e convertido em formazan por células viáveis, pela ação da enzima desidrogenase existente na mitocôndria, sendo que a quantidade de formazan obtido está diretamente relacionado com a porcentagem de células vivas (BURANAAMNUAY, 2021). Dessa forma, para determinação da citotoxicidade e seletividade do composto sobre as linhagens, as células foram plaqueadas em microplacas de cultura de células de 96 poços, na quantidade de  $1,0 \times 10^4$  células/poço ( $1,0 \times 10^5$  células/mL) e cultivadas em estufa a 37°C com atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas e, posteriormente, mantidas em tratamento com o composto por 72 horas. As linhagens celulares foram tratadas em cinco diferentes concentrações, sendo elas: 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM e 6,25µM, de HDACi 8 e Quercetina. Após o período de tratamento com os compostos, foi adicionado 10 µL de MTT, a 5 mg/mL em PBS, em cada poço. A placa foi incubada por mais 3 horas nas mesmas condições de cultivo para ocorrer a redução do sal formazan. O sal foi solubilizado com 100µL de dimetilsulfoxido, seguida de leitura em espectrofotômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) no comprimento de onda 540 nm. A estimativa de células vivas é obtida pela fórmula:

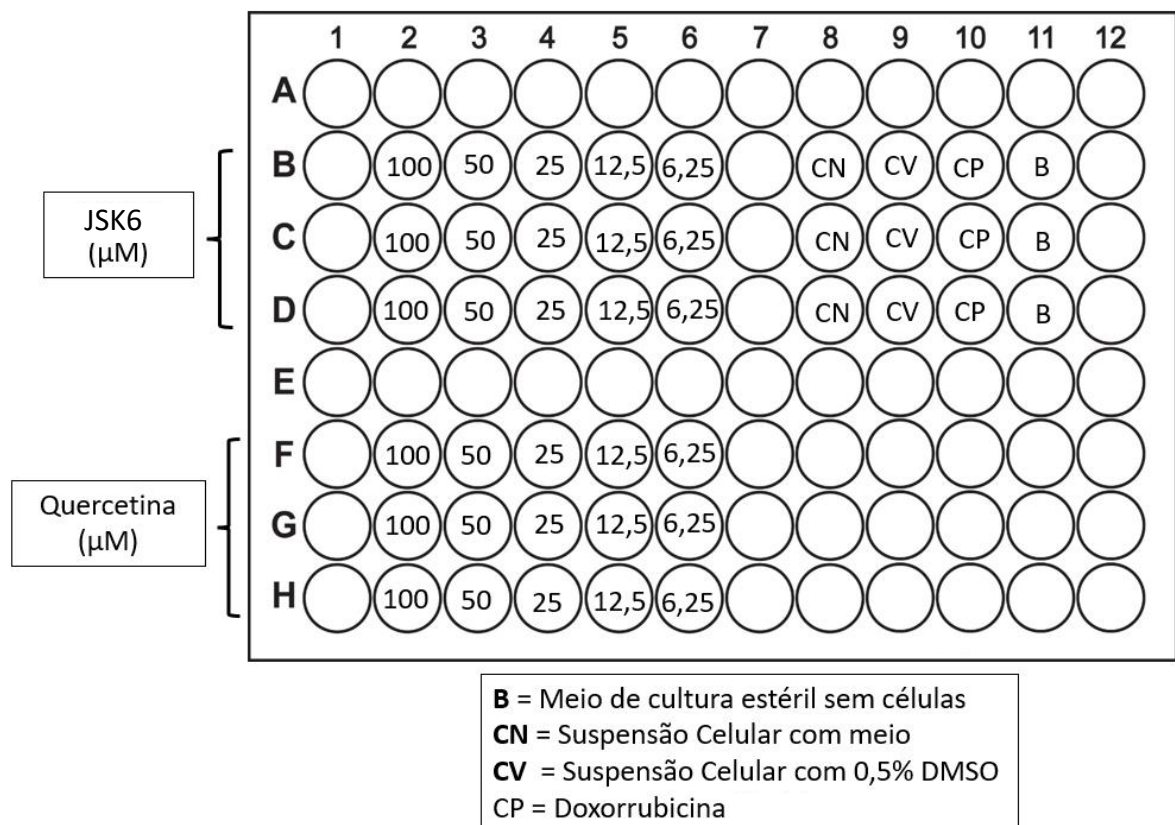
$$\% \text{ Células Vivas} = \frac{\text{Absorbância Teste} - \text{Absorbância Branco}}{\text{Absorbância Controle Negativo} - \text{Absorbância Branco}} \times 100$$

Para ambos os compostos foram realizados em triplicatas e três experimentos independentes. Ao final, utilizando os resultados obtidos através da leitura de cada poço, o cálculo de média e desvio padrão foram realizados para obtenção da viabilidade celular.

### 3.5. Desenho do experimento

Além dos compostos testados, cada experimento continha: um poço denominado “branco”, contendo somente meio de cultura suplementado com 10% soro fetal bovino e antibióticos, controle negativo, contendo a linhagem celular testada com meio de cultura suplementado com 10% soro fetal bovino e antibióticos, controle de veículo, contendo meio de cultura suplementado com 10% soro fetal bovino, antibióticos e preparado com 0,5% de DMSO, e o controle positivo, utilizando doxorrubicina 100 $\mu$ M. Dessa forma, o experimento foi desenhado e realizado como demonstrado na figura 3.

**Figura 3.** Modelo de plaqueamento: demonstração gráfica de como os experimentos foram plaqueados, sendo que à esquerda estão localizados os compostos testados e suas respectivas concentrações em triplicatas. À esquerda estão localizados os controles utilizados: CN (controle negativo), CV (controle de veículo), CP (controle positivo) e B (branco).



### 3.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos em triplicata e em três experimentos independentes foram avaliados pelo teste One-Way ANOVA com Pós-Test de Tukey de

comparações múltiplas entre os grupos, utilizando o software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA). Entre os dados fornecidos pelo programa, destacamos o valor P, também conhecido como “nível de significância observado”, considerado um resumo estatístico da compatibilidade entre os resultados encontrados, sendo indicado variando de 0 a 1, apresentando como ponto de corte o 0,05. Dessa forma, resultados com valores de p igual ou abaixo do ponto de corte são declarados estatisticamente significativos e declarados não significativos caso esteja acima do ponto de corte (GREENLAND, 2016).

A determinação das concentrações capazes de inibir 50% da viabilidade celular ( $CI_{50}$ ) foram obtidas através do excel utilizando a regressão linear da curva dose resposta dos compostos. O cálculo do índice de seletividade das substâncias (IS), que avalia quanto cada substância foi seletiva para as linhagens tumorais, foi calculada através da razão entre o  $CI_{50}$  da linhagem não tumoral em relação ao  $CI_{50}$  da linhagem tumoral, conforme indicado abaixo:

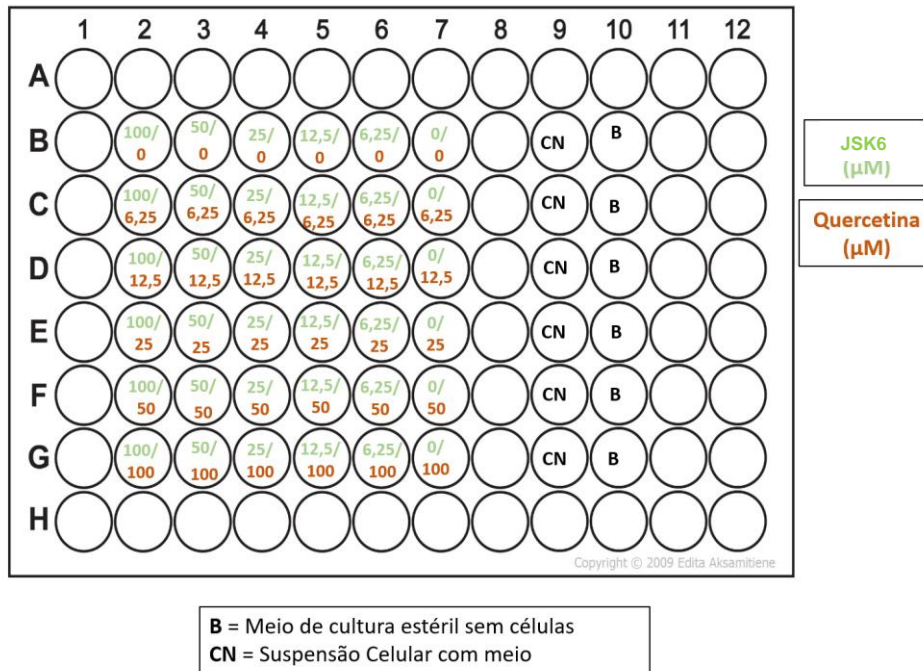
$$\text{Índice de seletividade (IS)} = \frac{\text{IC50 linhagem não tumoral}}{\text{IC50 linhagem tumoral}}$$

Para o índice de seletividade, os valores encontrados que demonstram ser  $>1,0$  indicam que o composto foi mais tóxico para a célula de linhagem tumoral do que para célula normal, enquanto que valores de  $IS <1,0$  demonstram toxicidade do composto para a linhagem não tumoral (MAKI et al, 2022).

### 3.7 Método Checkerboard

O ensaio de checkerboard tem como finalidade a avaliação da combinação de substâncias contra diferentes células ou microrganismos *in vitro*, utilizando de um padrão de diluição distribuído na placa de cultivo (MEDEIROS, 2012). Após o cultivo, utiliza-se do ensaio de MTT para realizar a revelação dos resultados, verificando assim, a atividade inibitória de crescimento da linhagem celular. A figura 4 exemplifica o plaqueamento experimental, onde na vertical, cada poço continha uma diferente concentração do composto JSK6, enquanto na horizontal diferentes concentrações de Quercetina, como pode ser visualizado na imagem de desenho de placa.

**Figura 4.** Plaqueamento CheckBoarder: demonstração gráfica de como os experimentos foram plaqueados, sendo que à esquerda estão localizados os compostos testados e suas respectivas concentrações em triplicatas, as concentrações de Quercetina estão sinalizadas em marrom e da JSK6 em verde. À esquerda estão localizados os controles utilizados: CN (controle negativo) e B (branco).



### 3.8 SynergyFinder

O software *SynergyFinder* é um aplicativo web autônomo que foi desenvolvido por Jing Tang, da Faculdade de Medicina na Universidade de Helsinki. O programa tem como intuito a análise interativa e visualização da combinação multidoses de diferentes compostos. O programa estabelece resultados utilizando uma base de dados científicos e diferentes modelos matemáticos de análise. Dessa forma, para cada combinação de droga testada é gerado um valor denominado score, no qual os valores  $< -10$  indica uma provável interação antagônica entre duas drogas, no intervalo de  $-10$  a  $10$  uma interação aditiva e um valor maior que  $10$  a interação entre duas drogas é provavelmente sinérgica. Esses resultados podem ser analisados através de mapas 3D e 2D que interpretam os dados numéricos dos scores em cores, mostrando através da cor verde áreas que apresentaram scores indicativos de uma ação antagônica e na cor vermelha áreas com ação sinérgica. Além disso, o *SynergyFinder* auxilia na visualização da área considerada como mais sinérgica dos experimentos e cria um score de sinergia resumida para a combinação de uma forma geral do composto, utilizando da média dos scores de cada combinação

(SYNERGYFINDER, 2022). Para este trabalho, foi escolhido o método de análise ZIP, que captura as relações de interação medicamentosa comparando a mudança na potência das curvas dose-resposta entre medicamentos individuais e suas combinações.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

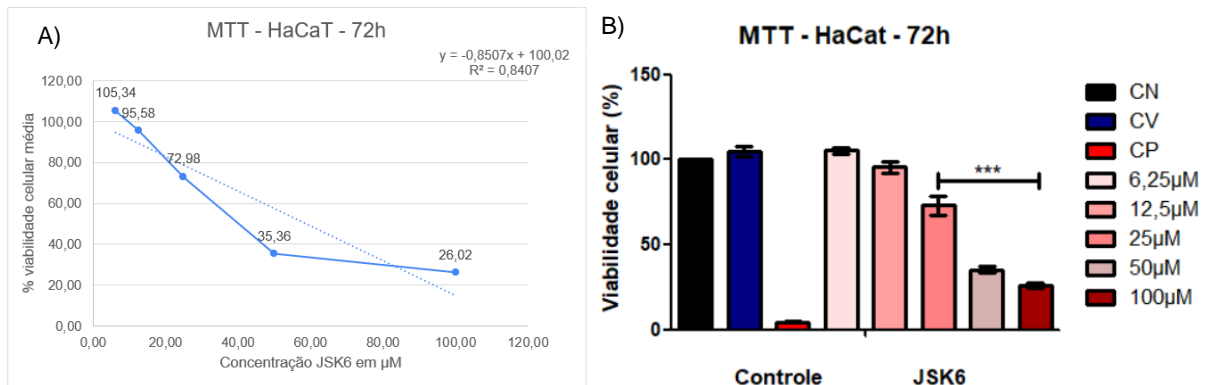
### 4.1 Ensaio em monoterapia: HACAT

Os experimentos tiveram início com o teste em monoterapia dos compostos, sendo realizados em todas as linhagens celulares concomitantemente. Os resultados do ensaio de citotoxicidade (MTT) na linhagem HaCat, em três independentes com o tratamento do composto JSK6 por 72 horas, podem ser observados na tabela 1. Esses resultados mostraram que o composto obteve uma curva dose-resposta sobre a linhagem, ou seja, quanto maior foi a dose testada, menor a quantidade de células viáveis, como podemos observar na figura 5. Dessa forma, esse resultado pode indicar que o composto tem ação sobre a linhagem testada e, por se tratar de uma linhagem de queratinócitos, esse efeito pode ser não desejado, visto que indica que haveria ação em células normais. Entretanto, analisando o resultado do controle positivo, doxorrubicina 100 $\mu$ M, é possível concluir que, embora a JSK6 apresenta ação sobre células saudáveis, a ação é reduzida quando comparada, na mesma concentração, com o composto já comercializado, sendo assim um ponto positivo para o composto. Por fim, o IC50 obtido foi de 58,80 $\mu$ M.

**Tabela 1.** Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em HaCaT no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	104,83	5,42
Controle Positivo	4,50	0,40
100 $\mu$ M	26,02	2,96
50 $\mu$ M	35,36	3,21
25 $\mu$ M	72,98	9,91
12,5 $\mu$ M	95,58	5,62
6,25 $\mu$ M	105,34	34,48
Branco	0,00	0,00

**Figura 5.** Relação concentração x viabilidade celular frente ao tratamento com HDACi 8 (JSK6) em HaCaT por 72 horas: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes na linhagem celular HaCaT, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. A) Gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de IC50. B) Representação gráfica obtido utilizando software *GraphPad Prism 5.1* para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*”. Quando comparado com o controle negativo, as concentrações de 25, 50 e 100µM (\*\*\*) apresentaram uma significância de  $p \leq 0.001$ .



Através do relatório com análises estatísticas, indicados na seção 3.6, foi possível identificar que houve valores significativos de tratamento com o composto, comparando com dois parâmetros, o não tratamento e o tratamento com a doxorrubicina 100µM (controle positivo), pois os valores encontrados para  $p$  estão abaixo do valor de corte de 0,05. Na figura 6, pode ser observado que o composto apresentou significância de tratamento quando comparado com o controle negativo, nas concentrações de 25, 50 e 100µM (\*\*\*) , sendo uma significância de  $p \leq 0.001$ , e em relação ao controle positivo, nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 (\*\*\*) , sendo  $p \leq 0.001$ , e em 100µM (\*\*), sendo  $p \leq 0.01$ . Além disso, pode-se observar que o foi obtido uma significância de tratamento de  $p \leq 0.001$  comparando o controle negativo com o controle positivo.

**Figura 6.** Análise Estatística JSK6 em HaCat: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P	Summary	95% CI of diff
17	CN (*) vs CV(**)	-4.830	1.714	No	ns	-18.63 to 8.968
18	CN (*) vs CP (***)	95.50	33.89	Yes	***	81.70 to 109.3
19	CN (*) vs 6,25µM	-5.333	1.893	No	ns	-19.13 to 8.465
20	CN (*) vs 12,5µM	4.417	1.567	No	ns	-9.382 to 18.22
21	CN (*) vs 25µM	27.02	9.588	Yes	***	13.22 to 40.82
22	CN (*) vs 50µM	64.64	22.94	Yes	***	50.84 to 78.44
23	CN (*) vs 100µM	73.98	26.26	Yes	***	60.18 to 87.78
24	CV(**) vs CP (***)	100.3	35.61	Yes	***	86.53 to 114.1
25	CV(**) vs 6,25µM	-0.5033	0.1786	No	ns	-14.30 to 13.30
26	CV(**) vs 12,5µM	9.247	3.282	No	ns	-4.552 to 23.05
27	CV(**) vs 25µM	31.85	11.30	Yes	***	18.05 to 45.65
28	CV(**) vs 50µM	69.47	24.65	Yes	***	55.67 to 83.27
29	CV(**) vs 100µM	78.81	27.97	Yes	***	65.01 to 92.61
30	CP (***) vs 6,25µM	-100.8	35.79	Yes	***	-114.6 to -87.04
31	CP (***) vs 12,5µM	-91.09	32.33	Yes	***	-104.9 to -77.29
32	CP (***) vs 25µM	-68.49	24.31	Yes	***	-82.29 to -54.69
33	CP (***) vs 50µM	-30.86	10.95	Yes	***	-44.66 to -17.06
34	CP (***) vs 100µM	-21.52	7.637	Yes	**	-35.32 to -7.722
35	6,25µM vs 12,5µM	9.750	3.460	No	ns	-4.048 to 23.55
36	6,25µM vs 25µM	32.35	11.48	Yes	***	18.55 to 46.15
37	6,25µM vs 50µM	69.97	24.83	Yes	***	56.17 to 83.77
38	6,25µM vs 100µM	79.32	28.15	Yes	***	65.52 to 93.12
39	12,5µM vs 25µM	22.60	8.021	Yes	***	8.802 to 36.40
40	12,5µM vs 50µM	60.22	21.37	Yes	***	46.42 to 74.02
41	12,5µM vs 100µM	69.57	24.69	Yes	***	55.77 to 83.37
42	25µM vs 50µM	37.62	13.35	Yes	***	23.82 to 51.42
43	25µM vs 100µM	46.97	16.67	Yes	***	33.17 to 60.77
44	50µM vs 100µM	9.343	3.316	No	ns	-4.455 to 23.14

Os resultados obtidos pelo tratamento com Quercetina em 72 horas na linhagem celular HACAT, podem ser observados na tabela 2. Quando a dose de 100µM do composto é comparada com o controle positivo, pode-se verificar que a ação da Quercetina é baixíssima nas células normais de queratinócitos, visto que a viabilidade celular encontrada é de 68,63% e 4,50%, respectivamente.

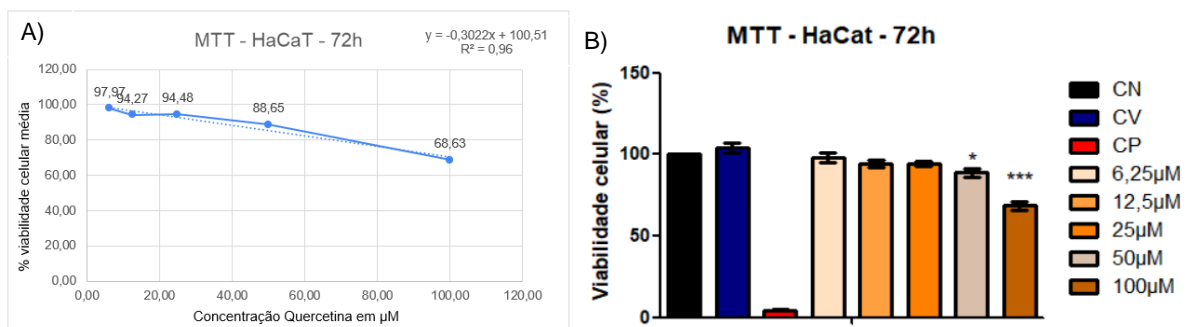
**Tabela 2.** Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em HaCaT no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	104,83	5,42
Controle Positivo	4,50	0,40
100µM	68,63	4,35
50µM	88,65	4,16
25µM	94,48	2,41
12,5µM	94,27	4,01
6,25µM	97,97	4,72
Branco	0,00	0,00

Além disso, os resultados demonstraram que não ocorreu o efeito dose-resposta no tempo de 72h, sendo observado um platô nos dados obtidos, como é

possível verificar na figura 7. Esse resultado pode ressaltar a baixa resposta das células normais de queratinócitos frente às doses testadas do composto, podendo ser associado como um ponto positivo da Quercetina, uma vez que, ao apresentar ação contra células de câncer associado ao HPV, pode ser considerada seletiva. O  $CI_{50}$  obtido foi de 167,14 $\mu$ M.

**Figura 7.** Relação concentração x viabilidade celular frente ao tratamento com Quercetina em HaCaT por 72 horas: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes na linhagem celular HaCaT, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. A) Gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de  $CI_{50}$ . B) representação gráfica obtido utilizando software Graph Pad Prism 5.1 para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*\*”. Quando comparado com o controle negativo, a concentração de 100 $\mu$ M (\*\*\*) apresentou uma significância de  $p \leq 0.001$ . e a concentração de 50  $\mu$ M (\*) apresentou uma significância de  $p \leq 0.05$ .



Através do relatório de análises estatísticas, foi possível identificar que houve valores significativos de tratamento com o composto, comparando com dois parâmetros, o não tratamento e o tratamento com a doxorrubicina 100 $\mu$ M (controle positivo), apenas para as concentrações de 50 e 100 $\mu$ M. Na figura 8, pode-se observar que o composto apresentou significância de tratamento quando comparado com o controle negativo nas concentrações de 50 (\*) e 100 $\mu$ M (\*\*\*), sendo uma significância de  $p \leq 0.05$  e  $p \leq 0.001$ , respectivamente. Em relação ao controle positivo, todas as concentrações apresentaram significância de  $p \leq 0.001$ .

**Figura 8.** Análise Estatística do tratamento com Quercetina em HaCat: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software *GraphPad Prism 5.1* (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
CN (*) vs CV(**)	-4.063	1.957	No	ns	-14.23 to 6.107
CN (*) vs CP (***)	95.50	45.99	Yes	***	85.33 to 105.7
CN (*) vs 6,25µM	2.033	0.9791	No	ns	-8.137 to 12.20
CN (*) vs 12,5µM	5.727	2.757	No	ns	-4.443 to 15.90
CN (*) vs 25µM	5.520	2.658	No	ns	-4.650 to 15.69
CN (*) vs 50µM	11.35	5.464	Yes	*	1.177 to 21.52
CN (*) vs 100µM	31.37	15.10	Yes	***	21.20 to 41.54
CV(**) vs CP (***)	99.57	47.94	Yes	***	89.40 to 109.7
CV(**) vs 6,25µM	6.097	2.936	No	ns	-4.073 to 16.27
CV(**) vs 12,5µM	9.790	4.714	No	ns	-0.3802 to 19.96
CV(**) vs 25µM	9.583	4.614	No	ns	-0.5868 to 19.75
CV(**) vs 50µM	15.41	7.420	Yes	**	5.240 to 25.58
CV(**) vs 100µM	35.43	17.06	Yes	***	25.26 to 45.60
CP (***) vs 6,25µM	-93.47	45.01	Yes	***	-103.6 to -83.30
CP (***) vs 12,5µM	-89.78	43.23	Yes	***	-99.95 to -79.61
CP (***) vs 25µM	-89.98	43.33	Yes	***	-100.2 to -79.81
CP (***) vs 50µM	-84.16	40.52	Yes	***	-94.33 to -73.99
CP (***) vs 100µM	-64.13	30.88	Yes	***	-74.30 to -53.96
6,25µM vs 12,5µM	3.693	1.778	No	ns	-6.477 to 13.86
6,25µM vs 25µM	3.487	1.679	No	ns	-6.683 to 13.66
6,25µM vs 50µM	9.313	4.484	No	ns	-0.8568 to 19.48
6,25µM vs 100µM	29.34	14.13	Yes	***	19.17 to 39.51
12,5µM vs 25µM	-0.2067	0.09951	No	ns	-10.38 to 9.963
12,5µM vs 50µM	5.620	2.706	No	ns	-4.550 to 15.79
12,5µM vs 100µM	25.64	12.35	Yes	***	15.47 to 35.81
25µM vs 50µM	5.827	2.806	No	ns	-4.343 to 16.00
25µM vs 100µM	25.85	12.45	Yes	***	15.68 to 36.02
50µM vs 100µM	20.02	9.641	Yes	***	9.853 to 30.19

## 4.2 Ensaio em monoterapia: SiHa

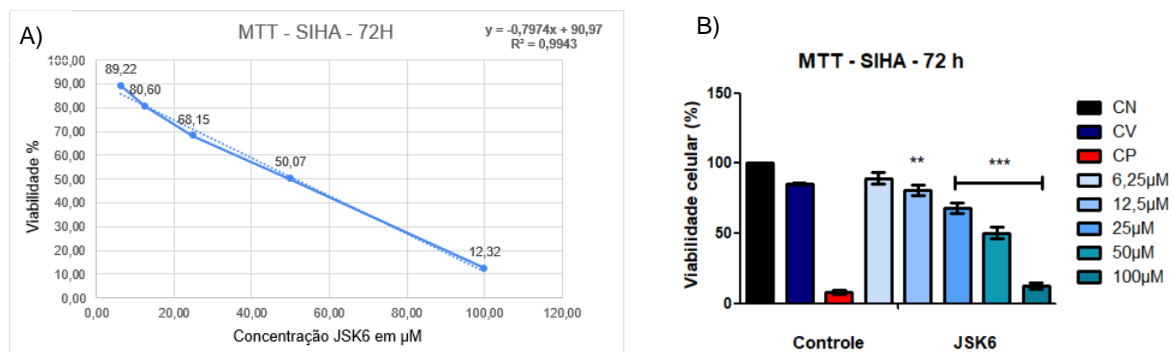
Os resultados dos experimentos com a linhagem de câncer cervical HPV16 positiva (SiHa) com tratamento dose-resposta em 72 horas utilizando o composto JSK6, indicaram que houve uma ação do composto, causando morte celular nas células, como pode ser observados na tabela 3. Quando comparado com o controle positivo, pode-se verificar que a ação da JSK6 na concentração de 100µM apresentou uma ação bem semelhante a doxorrubicina, visto a proximidade dos números da viabilidade celular obtidos.

**Tabela 3.** Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em SiHa no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	85,17	1,03
Controle Positivo	8,08	2,11
100µM	12,32	3,99
50µM	50,07	7,15
25µM	68,15	6,56
12,5µM	80,60	6,16
6,25µM	89,22	7,36
Branco	0,00	0,00

Além disso, o composto apresentou uma curva dose-resposta, indicando a relação inversa de dose e viabilidade, e ressaltando uma boa ação em células cancerígenas infectadas com o HPV, como mostrado na figura 9. O  $CI_{50}$  encontrado foi igual a  $51,38\mu\text{M}$ , valor muito próximo do  $CI_{50}$  do composto para linhagem celular HaCaT ( $58,8\mu\text{M}$ ), fato que pode não ser interessante pensando no quesito seletividade celular. Entretanto, o índice de seletividade encontrado foi de 1,14, o que demonstra que o valor encontrado ainda permite com que o composto seja seletivo para o tratamento, agindo mais sobre as células com cópias virais.

**Figura 9.** Relação concentração x viabilidade celular de JSK6 em SiHa: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes na linhagem celular SiHa, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. A) Gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de  $IC_{50}$ . B) representação gráfica obtido utilizando software *GraphPad Prism 5.1* para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*”. Quando comparado com o controle negativo, a concentração de 25, 50 e  $100\mu\text{M}$  (\*\*\*) apresentaram uma significância de  $p \leq 0.001$  e a de  $12,5\mu\text{M}$  (\*\*) significância de  $p \leq 0.01$ .



Para esse experimento, o relatório de análises estatísticas demonstrou que houve valores significativos de tratamento com o composto, quando comparado com o controle negativo nas concentrações de 25, 50 e  $100\mu\text{M}$  (\*\*\*) , sendo uma significância de  $p \leq 0.001$ , e na concentração  $12,5\mu\text{M}$  (\*\*),  $p \leq 0.01$ . Quando comparado com o controle positivo, as concentrações de 6,25, 12,5, 25 e  $50\mu\text{M}$  (\*\*\*) apresentaram significância de  $p \leq 0.001$  (figura 10).

**Figura 10.** Análise Estatística JSK6 em SiHa: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software *GraphPad Prism 5.1* (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant?	Summary	95% CI of diff
CN (*) vs CV(**)	14.83	5.040	Yes	*	0.4215 to 29.23
CN (*) vs CP (***)	91.92	31.25	Yes	***	77.51 to 106.3
CN (*) vs 6,25µM	10.78	3.665	No	ns	-3.625 to 25.19
CN (*) vs 12,5µM	19.40	6.596	Yes	**	4.998 to 33.81
CN (*) vs 25µM	31.85	10.83	Yes	***	17.44 to 46.26
CN (*) vs 50µM	49.93	16.97	Yes	***	35.52 to 64.33
CN (*) vs 100µM	87.68	29.81	Yes	***	73.27 to 102.1
CV(**) vs CP (***)	77.09	26.21	Yes	***	62.68 to 91.50
CV(**) vs 6,25µM	-4.047	1.376	No	ns	-18.45 to 10.36
CV(**) vs 12,5µM	4.577	1.556	No	ns	-9.828 to 18.98
CV(**) vs 25µM	17.02	5.787	Yes	*	2.618 to 31.43
CV(**) vs 50µM	35.10	11.93	Yes	***	20.69 to 49.51
CV(**) vs 100µM	72.85	24.77	Yes	***	58.45 to 87.26
CP (***) vs 6,25µM	-81.14	27.58	Yes	***	-95.54 to -66.73
CP (***) vs 12,5µM	-72.51	24.65	Yes	***	-86.92 to -58.11
CP (***) vs 25µM	-60.07	20.42	Yes	***	-74.47 to -45.66
CP (***) vs 50µM	-41.99	14.27	Yes	***	-56.40 to -27.58
CP (***) vs 100µM	-4.237	1.440	No	ns	-18.64 to 10.17
6,25µM vs 12,5µM	8.623	2.931	No	ns	-5.782 to 23.03
6,25µM vs 25µM	21.07	7.163	Yes	**	6.665 to 35.48
6,25µM vs 50µM	39.15	13.31	Yes	***	24.74 to 53.55
6,25µM vs 100µM	76.90	26.14	Yes	***	62.49 to 91.31
12,5µM vs 25µM	12.45	4.231	No	ns	-1.958 to 26.85
12,5µM vs 50µM	30.52	10.38	Yes	***	16.12 to 44.93
12,5µM vs 100µM	68.28	23.21	Yes	***	53.87 to 82.68
25µM vs 50µM	18.08	6.145	Yes	**	3.672 to 32.48
25µM vs 100µM	55.83	18.98	Yes	***	41.42 to 70.24
50µM vs 100µM	37.75	12.83	Yes	***	23.35 to 52.16

Os ensaios utilizando Quercetina na linhagem celular SiHa também obteve um resultado com uma curva dose resposta no tempo de 72h. Na tabela 4, pode-se verificar os resultados desse experimento e, através deles, pode-se notar a presença da ação do composto na linhagem celular, mostrando que ele induz a morte das células. Entretanto, quando comparado com o controle positivo, nota-se grande diferença no poder citotóxico, sendo o controle positivo mais eficaz, pois obteve uma maior porcentagem de morte celular.

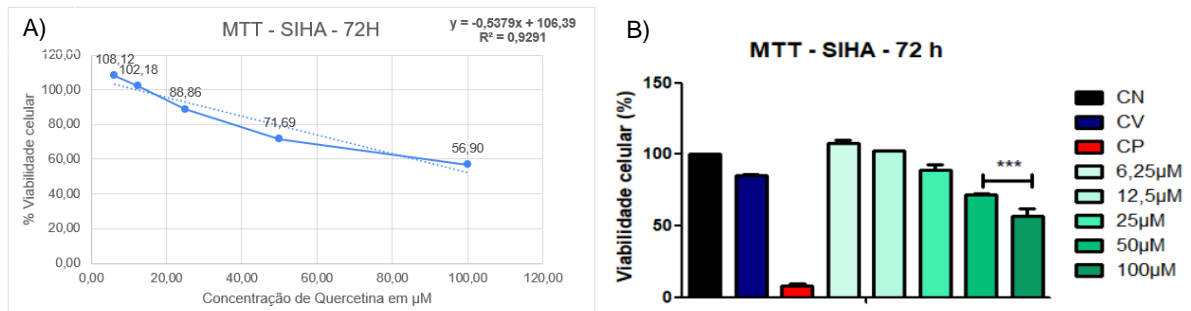
**Tabela 4.** Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em SiHa no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	85,17	1,03
Controle Positivo	8,08	2,11
100µM	56,90	8,40
50µM	71,69	1,84
25µM	88,86	6,88
12,5µM	102,18	0,54
6,25µM	108,12	2,75
Branco	0,00	0,00

O IC<sub>50</sub> encontrado foi de 104,83µM, valor menor do que o CI<sub>50</sub> para HaCat, o que seria algo interessante, visto que nessa concentração o composto poderia ter mais ação sobre as células com HPV do que na células saudáveis. O índice de seletividade obtido foi de 1,54, mostrando-se seletivo para a linhagem celular. Ademais, analisando o CI<sub>50</sub> de Quercetina, para esse composto requer uma maior concentração, quando comparado com a JSK6, para atingir a morte de 50% das células.

Foram encontrados dois estudos na literatura que demonstraram que a linhagem celular SiHa por 48 horas com a Quercetina, obtendo CI<sub>50</sub> de 140µM e 160µM (CLEMENTE-SOTO et al, 2019; YADAV et al, 2022). Ambos os resultados encontram-se abaixo dos alcançados neste trabalho, este fato pode indicar a possibilidade de que ao aumentar o tempo de exposição, é possível diminuir a dose necessária para atingir a concentração capaz de inibir 50% das células.

**Figura 11.** Relação concentração x viabilidade celular de Quercetina em SiHa: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes na linhagem celular SiHa, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. A) gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de  $CI_{50}$ . B) representação gráfica obtido utilizando software *GraphPad Prism 5.1* para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*”. Quando comparado com o controle negativo, a concentração de 50 e 100 $\mu$ M (\*\*\*) apresentaram uma significância de  $p \leq 0.001$ .



Para esse experimento, o relatório estatístico demonstrou que houve valores significativos de tratamento com o composto quando comparado com o controle negativo nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M (\*\*\*) , com uma significância de  $p \leq 0.001$ . Quando comparado com o controle positivo, todas as concentrações testadas apresentaram significância de  $p \leq 0.001$  (figura 12).

Ademais, vale ressaltar que nos experimentos com SiHa, os valores de morte celular encontrados no controle de veículo podem indicar que houve possível interferência do composto veículo, o DMSO. Esse fato pode ser verificado na figura 12 que indicou valor significativo, quando compara o controle negativo com o controle veículo, sendo  $p \leq 0.01$ .

**Figura 12.** Análise Estatística de Quercetina em SiHa: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software *GraphPad Prism 5.1* (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? F	Summary	95% CI of diff
CN (*) vs CV(**)	14.83	6.261	Yes	**	3.230 to 26.42
CN (*) vs CP (***)	91.92	38.81	Yes	***	80.32 to 103.5
CN (*) vs 6,25µM	-8.117	3.427	No	ns	-19.71 to 3.480
CN (*) vs 12,5µM	-2.180	0.9206	No	ns	-13.78 to 9.417
CN (*) vs 25µM	11.14	4.704	No	ns	-0.4567 to 22.74
CN (*) vs 50µM	28.31	11.95	Yes	***	16.71 to 39.91
CN (*) vs 100µM	43.10	18.20	Yes	***	31.51 to 54.70
CV(**) vs CP (***)	77.09	32.55	Yes	***	65.49 to 88.69
CV(**) vs 6,25µM	-22.94	9.688	Yes	***	-34.54 to -11.35
CV(**) vs 12,5µM	-17.01	7.181	Yes	**	-28.60 to -5.410
CV(**) vs 25µM	-3.687	1.557	No	ns	-15.28 to 7.910
CV(**) vs 50µM	13.48	5.694	Yes	*	1.887 to 25.08
CV(**) vs 100µM	28.28	11.94	Yes	***	16.68 to 39.87
CP (***) vs 6,25µM	-100.0	42.24	Yes	***	-111.6 to -88.44
CP (***) vs 12,5µM	-94.10	39.73	Yes	***	-105.7 to -82.50
CP (***) vs 25µM	-80.78	34.11	Yes	***	-92.37 to -69.18
CP (***) vs 50µM	-63.01	26.80	Yes	***	-75.20 to -52.01
CP (***) vs 100µM	-48.81	20.61	Yes	***	-60.41 to -37.22
6,25µM vs 12,5µM	5.937	2.507	No	ns	-5.660 to 17.53
6,25µM vs 25µM	19.26	8.132	Yes	***	7.660 to 30.85
6,25µM vs 50µM	36.43	15.38	Yes	***	24.83 to 48.02
6,25µM vs 100µM	51.22	21.63	Yes	***	39.62 to 62.82
12,5µM vs 25µM	13.32	5.625	Yes	*	1.723 to 24.92
12,5µM vs 50µM	30.49	12.88	Yes	***	18.89 to 42.09
12,5µM vs 100µM	45.28	19.12	Yes	***	33.69 to 56.88
25µM vs 50µM	17.17	7.250	Yes	**	5.573 to 28.77
25µM vs 100µM	31.96	13.50	Yes	***	20.37 to 43.56
50µM vs 100µM	14.79	6.247	Yes	**	3.197 to 26.39

### 4.3 Ensaio em monoterapia: CasKi

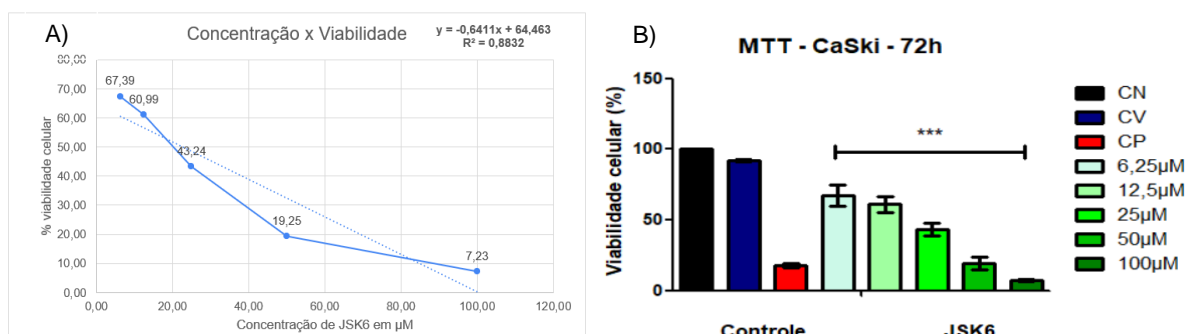
Através do ensaio de citotoxicidade em monoterapia na linhagem celular CasKi, foi possível verificar que o composto JSK6 apresentou uma curva dose-resposta no tempo de 72h (Figura 13). Neste experimento, as porcentagens de viabilidade indicam que o composto apresentou forte ação sobre a linhagem celular CasKi e mostram uma possível maior potência em relação ao próprio controle positivo, como é possível verificar na tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em CasKi no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	92,10	5,42
Controle Positivo	17,85	1,47
100µM	7,23	0,74
50µM	19,25	8,37
25µM	43,24	8,22
12,5µM	60,99	9,95
6,25µM	67,39	12,65
Branco	0,00	0,00

O  $CI_{50}$  encontrado foi de 22,56µM, valor bem abaixo do valor de  $CI_{50}$  do mesmo composto nas células de queratinócitos (HaCaT). O índice de seletividade obtido foi de 2,61, confirmando a seletividade para a linhagem com cópias virais, Esse experimento, reafirma a hipótese de que a JSK6 apresenta uma ação em células cancerígenas positivas para HPV, uma vez que também apresentou bons resultados na linhagem celular SiHa. Além disso, poderia ser deduzido uma possível relação da maior potência do composto com a maior quantidade de cópias virais, entretanto seria necessário estudos mais aprofundados para confirmar tal afirmação.

**Figura 13.** Relação concentração x viabilidade celular de JSK6 em CasKi: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes na linhagem celular SiHa, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. A) Gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de  $CI_{50}$ . B) Representação gráfica obtido utilizando software *GraphPad Prism 5.1* para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*”. Quando comparado com o controle negativo, todas as concentrações testadas apresentaram valores significantes de  $p \leq 0.001$ .



Para esse experimento, o relatório estatístico demonstrou que houve valores significativos em todas as concentrações testadas quando comparado com o controle negativo, com uma significância de  $p \leq 0.001$ . Quando comparado com o controle

positivo, as concentrações 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$  apresentaram um valor de  $p \leq 0.001$  e a concentração de 25  $\mu\text{M}$  apresentou valor de  $p \leq 0.01$ , como mostrado na imagem xx.

**Figura 14.** Análise Estatística de JSK6 em CasKi: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software *GraphPad Prism 5.1* (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P	Summary	95% CI of diff
CN (*) vs CV(**)	7.903	1.925	No	ns	-12.20 to 28.01
CN (*) vs CP (***)	82.15	20.01	Yes	***	62.05 to 102.3
CN (*) vs 6,25 $\mu\text{M}$	32.61	7.944	Yes	***	12.51 to 52.72
CN (*) vs 12,5 $\mu\text{M}$	39.01	9.502	Yes	***	18.90 to 59.11
CN (*) vs 25 $\mu\text{M}$	56.76	13.83	Yes	***	36.66 to 76.87
CN (*) vs 50 $\mu\text{M}$	80.75	19.67	Yes	***	60.65 to 100.9
CN (*) vs 100 $\mu\text{M}$	92.77	22.60	Yes	***	72.67 to 112.9
CV(**) vs CP (***)	74.25	18.09	Yes	***	54.15 to 94.35
CV(**) vs 6,25 $\mu\text{M}$	24.71	6.019	Yes	*	4.607 to 44.81
CV(**) vs 12,5 $\mu\text{M}$	31.10	7.577	Yes	**	11.00 to 51.21
CV(**) vs 25 $\mu\text{M}$	48.86	11.90	Yes	***	28.76 to 68.96
CV(**) vs 50 $\mu\text{M}$	72.85	17.74	Yes	***	52.74 to 92.95
CV(**) vs 100 $\mu\text{M}$	84.87	20.67	Yes	***	64.77 to 105.0
CP (***) vs 6,25 $\mu\text{M}$	-49.54	12.07	Yes	***	-69.64 to -29.44
CP (***) vs 12,5 $\mu\text{M}$	-43.15	10.51	Yes	***	-63.25 to -23.04
CP (***) vs 25 $\mu\text{M}$	-25.39	6.185	Yes	**	-45.49 to -5.287
CP (***) vs 50 $\mu\text{M}$	-1.403	0.3418	No	ns	-21.51 to 18.70
CP (***) vs 100 $\mu\text{M}$	10.62	2.587	No	ns	-9.483 to 30.72
6,25 $\mu\text{M}$ vs 12,5 $\mu\text{M}$	6.393	1.557	No	ns	-13.71 to 28.50
6,25 $\mu\text{M}$ vs 25 $\mu\text{M}$	24.15	5.883	Yes	*	4.047 to 44.25
6,25 $\mu\text{M}$ vs 50 $\mu\text{M}$	48.14	11.73	Yes	***	28.03 to 68.24
6,25 $\mu\text{M}$ vs 100 $\mu\text{M}$	60.16	14.65	Yes	***	40.06 to 80.26
12,5 $\mu\text{M}$ vs 25 $\mu\text{M}$	17.76	4.325	No	ns	-2.347 to 37.86
12,5 $\mu\text{M}$ vs 50 $\mu\text{M}$	41.74	10.17	Yes	***	21.64 to 61.85
12,5 $\mu\text{M}$ vs 100 $\mu\text{M}$	53.77	13.10	Yes	***	33.66 to 73.87
25 $\mu\text{M}$ vs 50 $\mu\text{M}$	23.99	5.843	Yes	*	3.883 to 44.09
25 $\mu\text{M}$ vs 100 $\mu\text{M}$	36.01	8.772	Yes	***	15.91 to 56.11
50 $\mu\text{M}$ vs 100 $\mu\text{M}$	12.02	2.929	No	ns	-8.080 to 32.13

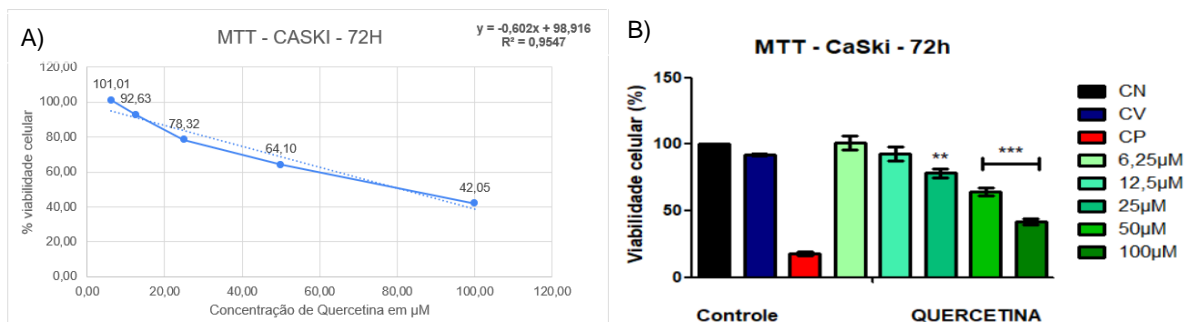
Os resultados dos ensaios de Quercetina na linhagem celular CasKi mostraram que ocorreu um efeito de dose-resposta no período de tratamento por 72 horas. Os valores de viabilidade mostram que houve ação nas células, mas quando comparado com o composto padrão, doxorubicina, existe uma diferença que indica que o composto natural mata menos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em CasKi no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	92,10	5,42
Controle Positivo	17,85	1,47
100µM	42,05	3,98
50µM	64,10	5,35
25µM	78,32	5,67
12,5µM	92,63	9,40
6,25µM	101,01	8,47
Branco	0,00	0,00

O  $CI_{50}$  encontrado com o tratamento de CasKi com quercetina foi de 81,26µM, valor bem abaixo do  $CI_{50}$  encontrado para a HaCaT. O índice de seletividade foi igual a 2,06, mostrando que esse composto apresenta maior ação sobre a CasKi do que sobre as células normais de queratinócitos.

**Figura 15.** Relação concentração x viabilidade celular de Quercetin em CasKi: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes na linhagem celular SiHa, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. A) Gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de  $CI_{50}$ . B) Representação gráfica obtido utilizando software Graph Pad Prism 5.1 para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*”. Quando comparado com o controle negativo, as concentrações 100 e 50 µM (\*\*\*) apresentaram uma significância de  $p \leq 0.001$  e de 25 µM uma significância de  $p \leq 0.01$ .



Para esse experimento, o relatório estatístico demonstrou que houve valores significativos nas concentrações de 100 e 50 µM (\*\*\*), sendo  $p < 0,001$ , e na concentrações de 25 µM, sendo  $p \leq 0.01$ . Quando comparado com o controle positivo, as concentrações 6,25, 12,5, 25 e 50 µM apresentaram significância de  $p \leq 0.001$  e a concentração de 100 µM apresentou significância de  $p \leq 0.01$ .

**Figura 16.** Análise Estatística de Quercetina em CasKi: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software *GraphPad Prism 5.1* (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P	Summary	95% CI of diff
CN (*) vs CV(**)	7.903	2.479	No	ns	-7.712 to 23.52
CN (*) vs CP (***)	82.15	25.76	Yes	***	66.54 to 97.77
CN (*) vs 6,25µM	-1.007	0.3157	No	ns	-16.62 to 14.61
CN (*) vs 12,5µM	7.370	2.311	No	ns	-8.245 to 22.99
CN (*) vs 25µM	21.69	6.801	Yes	**	6.071 to 37.30
CN (*) vs 50µM	35.90	11.26	Yes	***	20.28 to 51.51
CN (*) vs 100µM	57.95	18.17	Yes	***	42.34 to 73.57
CV(**) vs CP (***)	74.25	23.29	Yes	***	58.63 to 89.87
CV(**) vs 6,25µM	-8.910	2.794	No	ns	-24.53 to 6.705
CV(**) vs 12,5µM	-0.5333	0.1673	No	ns	-16.15 to 15.08
CV(**) vs 25µM	13.78	4.322	No	ns	-1.832 to 29.40
CV(**) vs 50µM	27.99	8.779	Yes	***	12.38 to 43.61
CV(**) vs 100µM	50.05	15.70	Yes	***	34.43 to 65.67
CP (***) vs 6,25µM	-83.16	26.08	Yes	***	-98.78 to -67.54
CP (***) vs 12,5µM	-74.78	23.45	Yes	***	-90.40 to -59.17
CP (***) vs 25µM	-60.47	18.96	Yes	***	-76.08 to -44.85
CP (***) vs 50µM	-46.26	14.51	Yes	***	-61.87 to -30.64
CP (***) vs 100µM	-24.20	7.589	Yes	**	-39.82 to -8.585
6,25µM vs 12,5µM	8.377	2.627	No	ns	-7.239 to 23.99
6,25µM vs 25µM	22.69	7.117	Yes	**	7.078 to 38.31
6,25µM vs 50µM	36.90	11.57	Yes	***	21.29 to 52.52
6,25µM vs 100µM	58.96	18.49	Yes	***	43.34 to 74.58
12,5µM vs 25µM	14.32	4.490	No	ns	-1.299 to 29.93
12,5µM vs 50µM	28.53	8.946	Yes	***	12.91 to 44.14
12,5µM vs 100µM	50.58	15.86	Yes	***	34.97 to 66.20
25µM vs 50µM	14.21	4.456	No	ns	-1.405 to 29.83
25µM vs 100µM	36.27	11.37	Yes	***	20.65 to 51.88
50µM vs 100µM	22.06	6.917	Yes	**	6.441 to 37.67

#### 4.4 Ensaio em monoterapia: C33-A

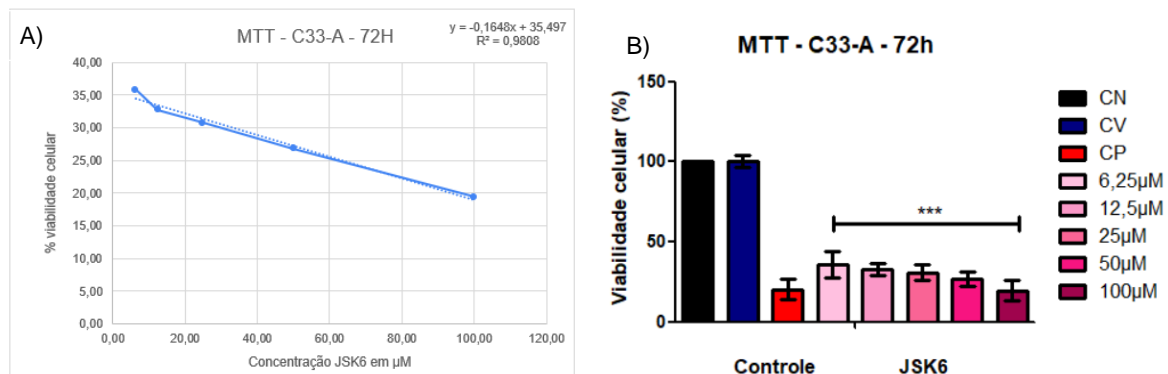
Finalizando os testes em monoterapia, a linhagem celular C33-A apresentou uma curva dose-resposta frente ao tratamento com o composto JSK6 em 72 horas. Os resultados indicaram uma ação eficiente sobre a linhagem de câncer de colo de útero, mostrando uma ação mais potente do que o composto padrão, ver tabela 7. Entretanto, abre-se uma interpretação dos resultados de que o composto não seja seletivo para a presença de HPV, visto que a linhagem celular apresenta células de câncer, sem cópias virais.

**Tabela 7.** Resultados experimentais do tratamento com JSK6 em C33-A no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	100,17	6,83
Controle Positivo	20,35	11,45
100µM	19,39	10,97
50µM	26,84	8,18
25µM	30,74	8,28
12,5µM	32,75	6,33
6,25µM	35,84	13,92
Branco	0,00	0,00

O  $CI_{50}$  encontrado foi de 88,00µM, valor maior do que o  $CI_{50}$  encontrado para a HaCaT. Entretanto, através do Índice de seletividade obteve-se um valor de 0,67, o que indicou uma maior ação nas células normais do que nas células tumorais.

**Figura 17.** Relação concentração x viabilidade celular de JSK6 em C33-A: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes na linhagem celular C33-A, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. A) Gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de  $CI_{50}$ . B) Representação gráfica obtido utilizando software *GraphPad Prism 5.1* para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*”. Quando comparado com o controle negativo, todas as concentrações apresentaram valores significantes de  $p \leq 0.001$ .



Através dos resultados estatísticos, pode-se concluir que apenas houve valores significantes de  $p$  para a comparação do composto com o não tratamento, de forma que quando comparado com o controle negativo, todas as concentrações apresentaram uma significância de  $p \leq 0.001$ . Quando comparado com o controle positivo, nenhuma concentração apresentou valor significativo de  $p$ , todos estavam acima do valor de corte de  $p < 0.05$ .

**Figura 18.** Análise Estatística JSK6 em C33-A: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software *GraphPad Prism 5.1* (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
CN (*) vs CV(**)	-0.1700	0.03223	No	ns	-26.00 to 25.66
CN (*) vs CP (***)	79.65	15.10	Yes	***	53.83 to 105.5
CN (*) vs 6,25µM	64.15	12.16	Yes	***	38.33 to 89.98
CN (*) vs 12,5µM	67.25	12.75	Yes	***	41.42 to 93.07
CN (*) vs 25µM	69.27	13.13	Yes	***	43.44 to 95.09
CN (*) vs 50µM	73.16	13.87	Yes	***	47.34 to 98.99
CN (*) vs 100µM	80.61	15.28	Yes	***	54.78 to 106.4
CV(**) vs CP (***)	79.82	15.13	Yes	***	54.00 to 105.7
CV(**) vs 6,25µM	64.32	12.20	Yes	***	38.50 to 90.15
CV(**) vs 12,5µM	67.42	12.78	Yes	***	41.59 to 93.24
CV(**) vs 25µM	69.44	13.17	Yes	***	43.61 to 95.26
CV(**) vs 50µM	73.33	13.90	Yes	***	47.51 to 99.16
CV(**) vs 100µM	80.78	15.32	Yes	***	54.95 to 106.6
CP (***) vs 6,25µM	-15.50	2.939	No	ns	-41.33 to 10.33
CP (***) vs 12,5µM	-12.41	2.352	No	ns	-38.23 to 13.42
CP (***) vs 25µM	-10.39	1.969	No	ns	-36.21 to 15.44
CP (***) vs 50µM	-6.490	1.231	No	ns	-32.32 to 19.34
CP (***) vs 100µM	0.9567	0.1814	No	ns	-24.87 to 26.78
6,25µM vs 12,5µM	3.093	0.5865	No	ns	-22.73 to 28.92
6,25µM vs 25µM	5.113	0.9695	No	ns	-20.71 to 30.94
6,25µM vs 50µM	9.010	1.708	No	ns	-16.82 to 34.84
6,25µM vs 100µM	16.46	3.120	No	ns	-9.371 to 42.28
12,5µM vs 25µM	2.020	0.3830	No	ns	-23.81 to 27.85
12,5µM vs 50µM	5.917	1.122	No	ns	-19.91 to 31.74
12,5µM vs 100µM	13.36	2.534	No	ns	-12.46 to 39.19
25µM vs 50µM	3.897	0.7388	No	ns	-21.93 to 29.72
25µM vs 100µM	11.34	2.151	No	ns	-14.48 to 37.17
50µM vs 100µM	7.447	1.412	No	ns	-18.38 to 33.27

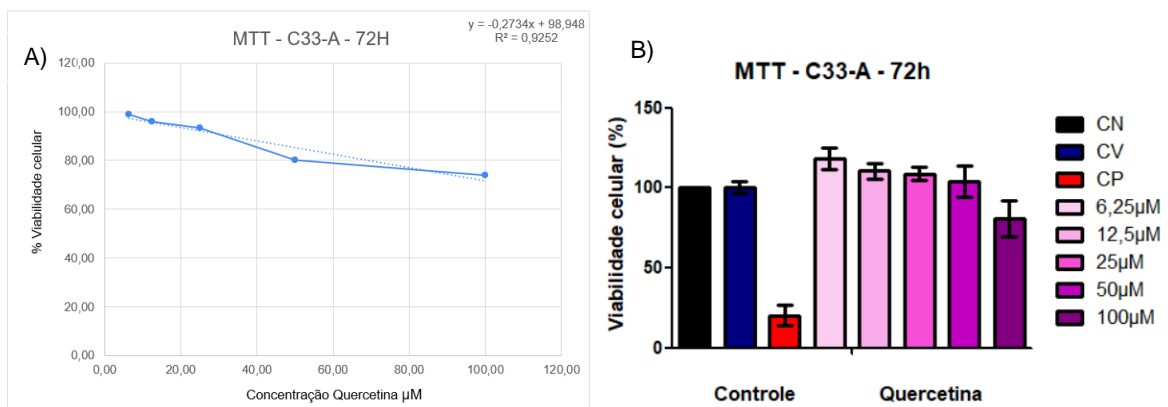
Por fim, nos resultados do ensaio com o tratamento de Quercetina, foi possível observar um platô, e não uma curva dose-resposta. Esse acontecimento pode indicar que o composto está diretamente ligado à presença de HPV, visto que a linhagem celular C33-A apresenta o câncer, porém sem cópias virais. Quando comparado com o controle positivo, a droga padrão ainda apresentou uma maior eficácia. A partir desses resultados, pode-se criar a hipótese de que a Quercetina seja específica para o tratamento do câncer de colo de útero associado ao vírus do HPV.

**Tabela 8.** Resultados experimentais do tratamento com Quercetina em C33-A no período de 72 horas.

	% média da viabilidade celular	Desvio médio
Controle negativo	100,00	0,00
Controle de veículo	100,17	6,83
Controle Positivo	20,35	11,45
100µM	80,74	19,02
50µM	104,20	16,75
25µM	108,79	7,43
12,5µM	111,02	7,70
6,25µM	118,27	11,92
Branco	0,00	0,00

O  $CI_{50}$  encontrado foi de 187,30 µM, valor acima do encontrado na HaCaT. O índice de seletividade encontrado foi de 0,89, o que mostrou que houve mais ação sobre as células normais do que nas células tumorais.

**Figura 19.** Relação concentração x viabilidade celular de Quercetina em C33-A: Resultados da média dos experimentos de citotoxicidade com MTT em independentes, indicados através da porcentagem da viabilidade celular. À esquerda, gráfico obtido através do Excel para visualização da curva dose-resposta e obtenção de equação para cálculo de  $CI_{50}$ . À direita, representação gráfica obtido utilizando software Graph Pad Prism 5.1 para análise estatística dos resultados, indicados através de “\*\*\*\*”.



Relacionado com os dados estatísticos, pode-se observar que quando comparado com o controle negativo, nenhuma concentração apresentou valor significativo de p. Quando comparado com o controle positivo, todas as concentrações apresentaram significância de  $p \leq 0.001$ .

**Figura 20.** Análise Estatística Quercetina em C33-A: Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. Software *GraphPad Prism 5.1* (Inc., La Jolla, CA, USA). Em vermelho, encontram-se destacados os resultados de significância para as comparações com o controle positivo e negativo.

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
CN (*) vs CV(**)	-0.1700	0.02517	No	ns	-33.24 to 32.90
CN (*) vs CP (***)	79.65	11.79	Yes	***	46.58 to 112.7
CN (*) vs 6,25µM	-18.27	2.705	No	ns	-51.34 to 14.80
CN (*) vs 12,5µM	-10.38	1.537	No	ns	-43.45 to 22.69
CN (*) vs 25µM	-8.790	1.302	No	ns	-41.86 to 24.28
CN (*) vs 50µM	-4.203	0.6224	No	ns	-37.27 to 28.87
CN (*) vs 100µM	19.26	2.852	No	ns	-13.81 to 52.33
CV(**) vs CP (***)	79.82	11.82	Yes	***	46.75 to 112.9
CV(**) vs 6,25µM	-18.10	2.680	No	ns	-51.17 to 14.97
CV(**) vs 12,5µM	-10.21	1.512	No	ns	-43.28 to 22.86
CV(**) vs 25µM	-8.620	1.276	No	ns	-41.69 to 24.45
CV(**) vs 50µM	-4.033	0.5972	No	ns	-37.10 to 29.04
CV(**) vs 100µM	19.43	2.878	No	ns	-13.64 to 52.50
CP (***) vs 6,25µM	-97.92	14.50	Yes	***	-131.0 to -64.85
CP (***) vs 12,5µM	-90.04	13.33	Yes	***	-123.1 to -56.97
CP (***) vs 25µM	-88.44	13.10	Yes	***	-121.5 to -55.37
CP (***) vs 50µM	-83.86	12.42	Yes	***	-116.9 to -50.79
CP (***) vs 100µM	-60.39	8.942	Yes	***	-93.46 to -27.32
6,25µM vs 12,5µM	7.887	1.168	No	ns	-25.18 to 40.96
6,25µM vs 25µM	9.480	1.404	No	ns	-23.59 to 42.55
6,25µM vs 50µM	14.07	2.083	No	ns	-19.00 to 47.14
6,25µM vs 100µM	37.53	5.558	Yes	*	4.462 to 70.60
12,5µM vs 25µM	1.593	0.2359	No	ns	-31.48 to 34.66
12,5µM vs 50µM	6.180	0.9151	No	ns	-26.89 to 39.25
12,5µM vs 100µM	29.65	4.390	No	ns	-3.425 to 62.72
25µM vs 50µM	4.587	0.6792	No	ns	-28.48 to 37.66
25µM vs 100µM	28.05	4.154	No	ns	-5.018 to 61.12
50µM vs 100µM	23.47	3.475	No	ns	-9.605 to 56.54

#### 4.5 Ensaio em terapia combinada: JSK6 e Quercetina

Considerando os resultados obtidos através do ensaio de MTT em monoterapia e o tempo restante para conclusão da pesquisa, foi escolhido as células HaCat e SiHa para serem submetidas ao teste de terapia combinada de JSK6 e Quercetina. As linhagens celulares escolhidas devem-se devido à representatividade, uma vez que uma das células é formada por queratinócitos (HaCaT) e outra células tumoral com cópia viral do HPV (SiHa). A fim de obter-se o máximo de combinações possíveis das concentrações dos compostos, optou-se por seguir através da metodologia de checkerboard. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes, expondo a célula ao composto por 72h, calculado a média e desvio padrão.

A combinação dos compostos, em sua grande maioria, apresentou uma ação inibitória no crescimento de HaCaT, entretanto não são encontrados valores altos de inibição como foi encontrado no teste de JSK6 nessa linhagem celular. Esse acontecimento pode indicar que a combinação poderia auxiliar na menor seletividade

do composto JSK6. Para controle, foi realizado o plaqueamento puro das substâncias, sem combinação dos compostos, como pode ser observado na Tabela 9, e os resultados obtidos foram similares aos encontrados na primeira etapa da pesquisa.

**Tabela 9.** Resultados terapia combinada em HaCat: Representação do tratamento dose-resposta da combinação dos compostos Quercetina e JSK6 na linhagem celular HaCaT por 72 horas, considerando os três experimentos independentes, obtidos através de leitura em espectrofotômetro. Sendo que, à esquerda a média da porcentagem de células viáveis frente ao tratamento utilizando a combinação dos compostos, considerando os três experimentos. À direita a tabela indica o desvio padrão das viabilidades nos três experimentos.

Média da Viabilidade %							Desvio da Viabilidade						
JSK6 → Quercetina ↓	100µM	50µM	25µM	12,5µM	6,25µM	0µM	JSK6 → Quercetina ↓	100µM	50µM	25µM	12,5µM	6,25µM	0µM
0µM	28,480	42,485	69,563	72,571	81,866	100,376	0µM	18,139	12,107	15,289	16,390	13,520	0,767
6,25µM	55,648	58,640	67,078	106,636	90,901	98,507	6,25µM	24,298	35,308	35,085	23,645	9,668	9,630
12,5µM	40,103	40,928	54,391	90,042	86,393	95,091	12,5µM	15,816	25,343	36,127	28,497	35,511	18,017
25µM	35,175	36,480	61,900	85,943	69,713	92,221	25µM	20,823	31,076	31,983	17,667	26,192	3,647
50µM	35,734	43,425	52,994	95,891	77,879	92,812	50µM	18,614	26,801	36,397	18,011	21,407	4,052
100µM	31,485	45,245	61,820	71,860	85,016	80,856	100µM	25,540	21,109	40,119	48,962	14,672	17,176

Para a exposição de SiHa à combinação dos compostos, pode-se observar na Tabela 10 que também houve inibição do crescimento celular, porém, em sua maioria, também não apresentou grandes valores de inibição, diferente dos resultados obtidos em monoterapia, nos quais obteve-se uma maior inibição, tanto para JSK6 como para Quercetina. Esse fato pode ser compreendido como uma possível ação antagônica dos compostos, que poderá ser comprovada com a utilização do *Synergyfinder*.

**Tabela 10.** Resultados terapia combinada em SiHa: Representação gráfica do tratamento dose-resposta da combinação dos compostos Quercetina e JSK6 na linhagem celular SiHa por 72 horas, considerando os três experimentos independentes, obtidos através de leitura em espectrofotômetro. Sendo que, a primeira tabela indica numericamente a média porcentagem de células viáveis frente ao tratamento utilizando a combinação dos compostos, considerando os três experimentos. A segunda tabela indica o desvio padrão das viabilidades nos três experimentos.

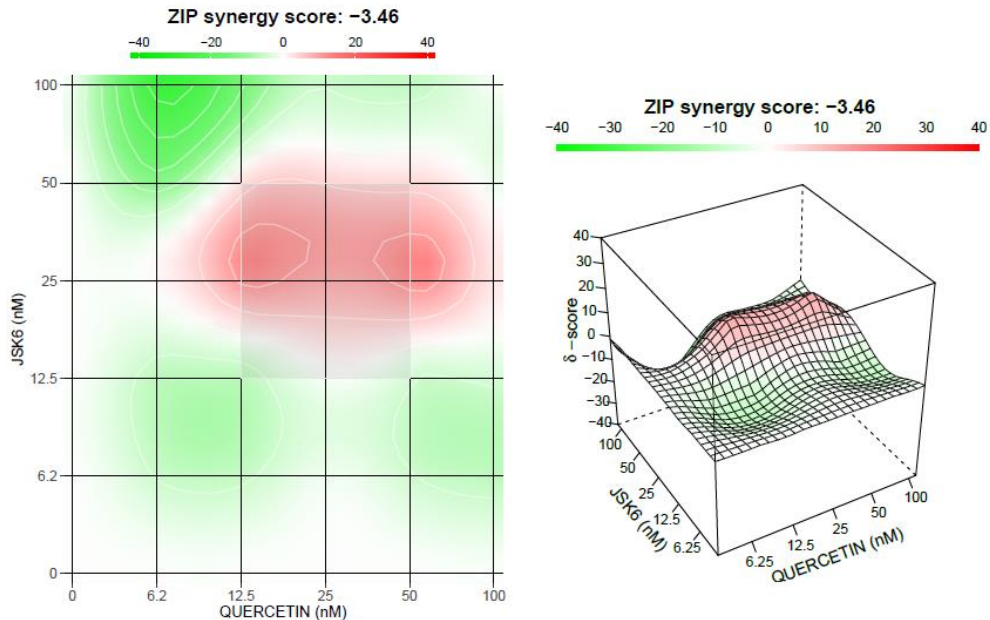
Média da Viabilidade %							Desvio da Viabilidade						
JSK6 → Quercetina ↓	100µM	50µM	25µM	12,5µM	6,25µM	0µM	JSK6 → Quercetina ↓	100µM	50µM	25µM	12,5µM	6,25µM	0µM
0µM	22,765	25,375	32,729	57,200	66,922	93,471	0µM	3,210	6,505	17,695	18,259	31,741	26,111
6,25µM	32,400	56,522	59,896	71,780	87,622	111,660	6,25µM	11,993	19,793	5,964	23,753	18,762	20,950
12,5µM	34,119	35,429	59,011	74,368	90,827	88,866	12,5µM	18,950	4,031	25,943	18,289	24,019	6,789
25µM	28,735	50,987	66,412	85,988	89,723	85,225	25µM	9,852	11,561	19,156	12,118	5,581	17,944
50µM	34,625	54,831	71,873	93,768	97,439	91,796	50µM	10,915	16,993	13,911	13,113	26,715	4,448
100µM	38,889	59,018	80,895	96,710	78,608	94,285	100µM	15,703	18,385	18,496	28,241	13,529	12,976

#### 4.6 Análise do ensaio de terapia combinada

Após a obtenção dos resultados experimentais de viabilidade celular com a combinação dos compostos, os dados foram analisados pelo software *Synergyfinder 2.0*. O programa permite a compreensão do comportamento dos compostos quando testados de forma conjunta, uma vez que, através da sua base de dados, ele cria um *score* que indica o tipo de ação quando há combinação de dois ou mais compostos, e desenvolve um mapa que identifica as regiões e as diferentes interações.

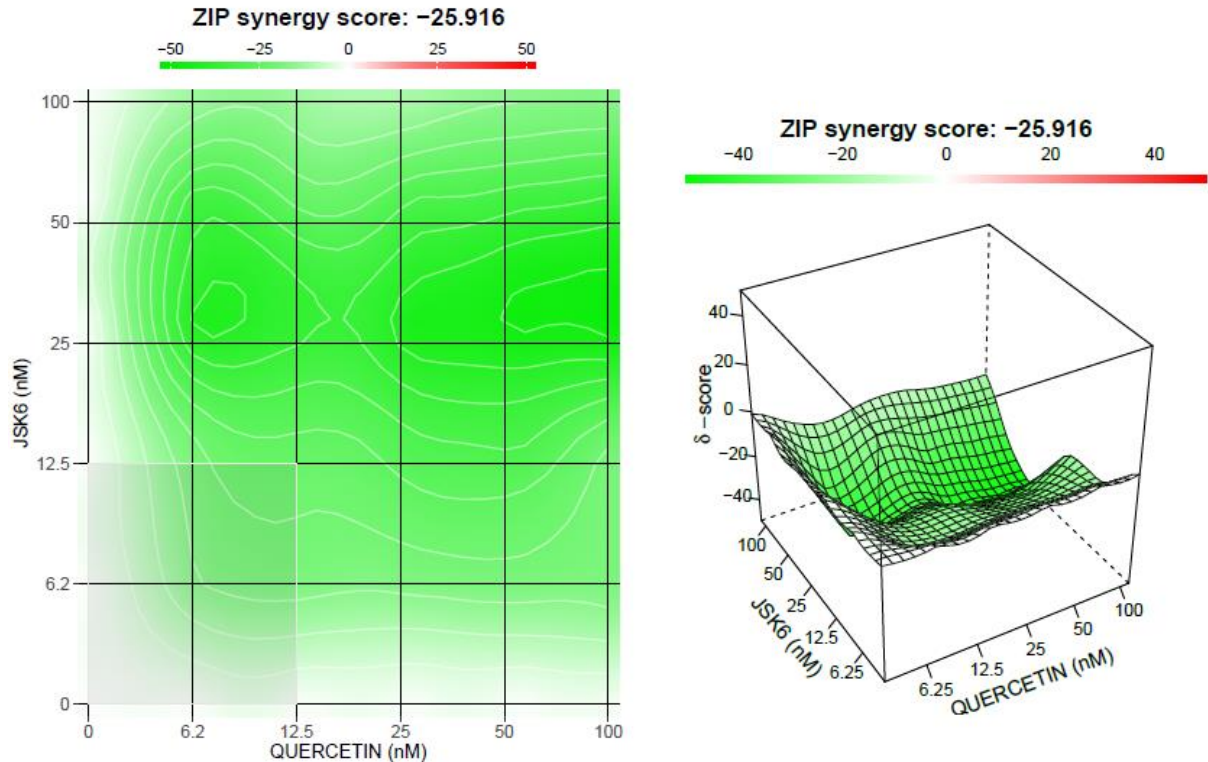
Inicialmente, esperava-se que os compostos apresentassem ação sinérgica, de forma a somar sua ação, potencializar o tratamento e reduzir ação em células normais, uma vez que ambos teriam ação de inibição de HDAC. Por meio da análise do programa foi possível observar que na linhagem celular HaCaT os compostos apresentam, na maior parte das concentrações testadas, um efeito antagônico, identificado nas áreas em verde do mapa. Ademais, nas concentrações 50 e 12,5 $\mu$ M da JSK6 e 6,25 e 100 $\mu$ M de quercetina, foi identificado uma região sinérgica, sinalizada em vermelho, como pode ser visualizada na figura 23. Entretanto, quando analisado o *score* resumido, fornecido pela média dos *scores* de cada combinação, a mistura desses compostos apresentou uma ação aditiva frente a linhagem de queratinócitos, visto que o *score* de -3.46 está dentro dos valores padrão estabelecidos para ação aditiva, entre - 10 e 10. Esse resultado mostra que a ação da combinação dos compostos se equipara a ação dos compostos isolados, fato que poderia não ser interessante, visto que os compostos isolados apresentaram ação sobre as células de câncer associado ao HPV, ao mesmo tempo que apresentam ação em queratinócitos (JSK6) e menor eficácia em relação ao padrão comercial (Quercetina).

**Figura 21.** Relatório fornecido pelo software Synergyfinder da HaCat: análise gráfica a respeito da viabilidade da linhagem celular HaCat frente ao tratamento com os compostos Quercetina e JSK6. Em verde encontram-se as regiões que apresentaram possível ação antagônica e em vermelho as regiões que apresentaram ação sinérgica.



Para a linhagem celular tumoral, SiHa, a combinação da JSK6 com a Quercetina apresentou um comportamento semelhante aos resultados obtidos nas células de queratinócitos, porém, não apresentou nenhuma área que indicasse uma ação sinérgica. Através dos mapas desenvolvidos pelo software, é possível verificar que todas as áreas analisadas apresentam uma coloração verde, mostrados na figura 24. Além disso, o escore médio confirma a ação antagônica, uma vez que o valor obtido é de -25.916, valor dentro do padrão estabelecido como ação antagônica ( $< -10$ ). Essa ação antagônica já havia sido visualizada na etapa pré-análise, uma vez que foi identificado menores valores de inibição celular de SiHa nos experimentos com a combinação dos compostos em relação aos testes dos mesmos em monoterapia. Esses resultados não demonstraram ser interessante para o tratamento de câncer de colo de útero associado com HPV, pois indica que o efeito dos compostos combinados têm menor eficácia do que eles separados, e os valores de tratamento encontrado em monoterapia, para ambos os compostos, havia indicado ação eficaz frente a linhagem celular para os dois compostos.

**Figura 22.** Relatório fornecido pelo software Synergyfinder da SiHa: Análise gráfica a respeito da viabilidade da linhagem celular SiHa frente ao tratamento com os compostos Quercetina e JSK6. Em verde encontram-se as regiões que apresentaram possível ação antagônica.



Dessa forma, a partir desses resultados é possível verificar que, para essas linhagens celulares e nas concentrações testadas, a combinação dos compostos quercetina e JSK6 não demonstram uma ação mais eficaz do que quando comparado entre o tratamento em monoterapia.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados através dos ensaios realizados em monoterapia nas diferentes linhagens celulares permitem concluir que o composto sintético se mostra como opção promissora de uma possível opção para o tratamento do câncer associado ao HPV. Essa hipótese decorre pela ação citotóxica do composto em todas as células de câncer e, embora tenha mostrado ação nas células de queratinócitos, sua ação ainda foi inferior do que o composto padrão, doxorrubicina. Em relação ao composto natural, quercetina, também pode ser concluído que esse composto tem potencial para ser utilizado como uma opção de tratamento, porém apresenta características distintas do composto sintético. Para um tratamento eficaz, seriam

necessárias maiores concentrações para se obter o efeito equivalente da doxorrubicina. Entretanto, em relação à associação dos dois compostos, os resultados dos ensaios experimentais mostraram que não há uma potencialização do efeito sobre a morte celular. Assim, sua combinação não se demonstrou interessante para o tratamento de câncer cervical, visto que a ação individualizada de cada uma se mostrou mais eficiente, inibindo uma maior porcentagem de crescimento celular. Porém, devido ao potencial encontrado dos compostos de forma individual, a combinação não deve ser descartada, podendo ser realizada em outras linhagens celulares para compreender se as características apresentadas seriam mais benéficas do que malélicas para o tratamento. Ademais, a inibição celular provocada pelos compostos poderia ser utilizada como parâmetro para futura análises, de forma a compreender melhor o mecanismo de ação dessas novas moléculas.

## REFERÊNCIAS

- ARBYN, M. et al. Estimates of Incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, p. e191–203, 2020.
- BALASUBRAMANIAM, S. et al. Key molecular events in cervical cancer development. **Medicina**, v. 55, p. 384, 2019.
- BASU, P. et al. Management of cervical premalignant lesions. **Current Problems in Cancer**. v. 42, p. 129-136, 2018.
- BORDIGNON, V. et al. How human papillomavirus replication and immune evasion strategies take advantage of the host DNA damage repair machinery. **Viruses**, v. 9, p. 390, 2017.
- BURANAAMNUAY, K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. **Open veterinary journal**, v. 11, p. 251–269, 2021.
- CLEMENTE-SOTO, A. et al. Quercetin induces G2 phase arrest and apoptosis with the activation of p53 in an E6 expression-independent manner in HPV-positive human cervical cancer-derived cells. **Molecular medicine reports**, v. 19, p. 2097–2106, 2019.
- DELLA FERA, A. et al. Persistent human papillomavirus infection. **Viruses**, v. 13, p. 321, 2021.
- FASS, D. et al. Histone acetylation and deacetylation. **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Epigenetic Regulation and Epigenomics**. 2nd. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. p. 1-47.
- FREITAS N. et al. Histone deacetylase inhibitors as therapeutic 39 interventions on cervical cancer induced by Human Papillomavirus. **Frontiers Cell and Developmental**, 2021.
- FISCHER, M. et al. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. **Scientific Reports**, v. 7, p. 2603, 2017.
- GANAI, S.; SHEIKH, F.; BABA, Z. Plant flavone chrysin as an emerging histone deacetylase inhibitor for prosperous epigenetic-based anticancer therapy. **Phytotherapy Research**, v. 35, p. 823-834, 2020.
- GLOBAL OBSERVATORY OF CANCER (GLOBOCAN). **Estimated number of incident cases and deaths Brazil, females, all ages**. Globocan, 2020. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=76&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522t](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=76&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522t)

op%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D#collapse-by\_country. Acesso em: 11 de jan. 2023

GREENLAND, S. et al. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. **Eur J Epidemiol**, v. 31, p. 337-350, 2016.

GUPTA, S.; MANIA-PRAMANIK, J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. **Journal of biomedical science**, v. 26, p. 28, 2019.

HERFS, M. et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proc Natl Acad Sci**, v. 109, p. 26, 2012.

HO, T.; CHAN, A.; GANESAN, A. Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 insight and hindsight. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 12460–12484, 2020.

HOPPE-SEYLER, K. et al. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. **Trends in Microbiology**, v.26, p.158-168, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa câncer de colo de útero**. Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em: 14 de jan. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Incidência do câncer de colo de útero**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-uterio/dados-e-numeros/incidencia>. Acesso em: 14 de jan. 2023.

KOPS, N. et al. Factors associated with HPV and other self-reported STI coinfections among sexually active Brazilian young adults: cross-sectional nationwide study. **BMJ Open**, v. 9, p. e027438, 2019.

MAKI, P. et al. Ethnopharmacological nexus between the traditional Thai medicine theory and biologically based cancer treatment. **Journal of ethnopharmacology**. v. 287, p.114932, 2022.

MCBRIDE, A. Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. **Nat Rev Microbiol**, v. 20, p.95–108, 2022.

MCBRIDE, A.; WARBURTON, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLoS Pathog**, v.13, n.4, p. e1006211, 2017.

MEDEIROS, M. **Avaliação *in vitrol* de efeitos sinérgicos de antibacterianos para o tratamento de infecções por *Acinetobacter baymannii* Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil**. 2012, 97 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MOKHTARI, R. et al. Combination therapy in combating cancer. **Oncotarget**, v.8, p. 38022–38043, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Guia prático sobre o HPV**: guia de perguntas e respostas para profissionais da saúde, 2014. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//guia-pratico-hpv-2013.pdf>. Acesso em 11 de jan. 2023.

OKUNADE, K. Human papillomavirus and cervical cancer. **J Obstet Gynaecol**, v.40, p. 602-608, 2020.

PAL, A.; KUNDU, R. Human Papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy. **Front Microbiol**, v. 10, p. 3116, 2020.

ROMAN, B.; ARAGONES, A. Epidemiology and incidence of HPV-related cancers of the head and neck. **Journal of surgical oncology**, v. 124, p. 920–922, 2021.

SANJOSE, S. et al. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 47, p. 2–13, 2018.

SOTO, D.; SONG, C.; MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. Epigenetic alterations in human papillomavirus-associated cancers. **Viruses**, v. 9, p.248, 2017.

STUMBAR, S. et al. Cervical cancer and its precursors: a preventative approach to screening, diagnosis, and management. **Prim Care**, v. 46, n. 1, p. 117-134, 2019.

Synergyfinder. **User Documentation**, 2022. Disponível em: [https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/synfin\\_docs/](https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/synfin_docs/). Acesso em: 03 mar. 2023.

YADAV, P. et al. Phytochemicals approach towards the treatment of cervical cancer using polyphenols and flavonoids. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v.23, p. 261–270, 2022.

XU, W. et al. Effects of quercetin on the efficacy of various chemotherapeutic drugs in cervical cancer cells. **Drug Des Devel Ther**, v.15, p.577-588, 2021.