



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

Kethllen Lisboa Espirito Santo Souza

**AVALIAÇÃO DE APOPTOSE DE NOVO INIBIDOR DE HISTONA
DEACETILASE (HDACi 1-2), EM COMPARAÇÃO COM O COMERCIAL
VORINOSTAT, EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL ASSOCIADA COM
O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

Araraquara, SP
2023

Kethllen Lisboa Espirito Santo Souza

**AVALIAÇÃO DE APOPTOSE DE NOVO INIBIDOR DE HISTONA
DEACETILASE (HDACi 1-2), EM COMPARAÇÃO COM O COMERCIAL
VORINOSTAT, EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL ASSOCIADA COM
O 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
Farmacêutica Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cauê Benito Scarim

**Araraquara, SP
2023**

S729a

Souza, Kethllen Lisboa Espirito Santo.

Avaliação de apoptose de novo inibidor de histona deacetilase (HDACi 1-2), em comparação com o comercial Vorinostat, em células de câncer cervical associada com o papilomavírus humano (HPV) / Kethllen Lisboa Espirito Santo Souza. – Araraquara: [s.n.], 2023.

37 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Cauê Benito Scarim.

1. HPV. 2. Câncer cervical. 3. Tratamento. 4. Epigenético. 5. Vírus. I. Scarim, Cauê Benito, orient. II. Título.

AGRADECIMENTO

A Deus, que me deu essa oportunidade e me ajudou durante toda minha trajetória.

A minha mãe que sempre acreditou em mim e me forneceu tudo que eu precisava para não desistir e entregar o melhor para mim, me deu todo o apoio necessário para que fosse possível essa conquista.

Ao Vinicius, que me ouviu e me incentivou durante todos os anos, me dando toda a paciência e amor que eu precisava.

Ao meu grupo de aliados, que estiveram comigo em toda graduação, me ajudando e crescendo juntos.

À Leticia Galdino 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;

E a minha orientadora de iniciação científica, Profa. Dra. Christiane Pienna Soares, que me deu a oportunidade de me aprofundar sobre esse tema e acreditou no meu potencial para tal.

Ao meu orientador de TCC Prof. Dr. Cauê Benito Scarim, que me acolheu e me ajudou nas etapas finais do meu percurso na graduação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do processo nº 2020/11304-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Nas últimas décadas, tem havido um crescente interesse no papel das modificações epigenéticas no processo de desenvolvimento do câncer. Entre essas modificações, a acetilação das histonas emerge como um processo regulado pelas enzimas histona deacetilases (HDAC) e histona acetiltransferases (HAT), desempenhando um papel crucial na regulação epigenética, permitindo o controle da expressão dos genes. Os papilomavírus humano (HPVs) são pequenos vírus de DNA de fita dupla sem envelope. Eles são os principais carcinógenos humanos, estando, intrinsecamente, ligados ao desenvolvimento de câncer em 4,5% dos pacientes diagnosticados em todo o mundo. Ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que HDACi pode ser uma terapia promissora para o câncer cervical relacionado ao HPV. No presente trabalho foi proposto o estudo de uma nova molécula sintetizada com potencial inibitório de HDAC, visando avaliar sua eficácia terapêutica frente ao câncer cervical associado com HPV. Com o objetivo verificar a atividade de molécula recém sintetizada de HDACi de histona deacetilase 1/2 comparada a um medicamento comercial Vorinostat® que também inibe essa mesma classe de HDAC, avaliando comparativamente seu efeito em monoterapia e em combinação, a fim de avaliar a eficácia do tratamento em monoterapia da nova molécula e verificar a possibilidade de sinergismo, aditivo ou antagonismo da terapia combinada em células de câncer cervical associado ao HPV 16 (SiHa e Caski) e em controles celulares de câncer cervical negativa para HPV (C33-A) e queratinócito normal de pele espontaneamente imortalizado (HaCaT). Com esse objetivo foi realizado ensaios de citotoxicidade por MTT para determinação de concentração dose-resposta e tempo-resposta de ambos os compostos (nova molécula e composto comercial), bem como a determinação do IC₅₀ e o potencial efeito sinérgico, aditivo ou antagônico da terapia combinada, através de ensaios de MTT e análise de resultados utilizando Graph Pad Prism 5.1 e SinergyFinder. A molécula recém sintetizada HDACi apresentou melhor ação nas células infectadas com HPV16 SiHa e CasKi apresentando resultados promissores com curva dose resposta em tempo de tratamento de 72h. No tratamento combinado, os compostos apresentaram ação antagônica nas células de queratinócitos (HaCat) e nas células com a presença de HPV (SiHa).

Palavra-chave: HPV; câncer cervical; tratamento; epigenético; vírus.

ABSTRACT

The role of epigenetic modifications in the process of carcinogenesis has received much attention in recent years. Among them, histone acetylation is a process regulated by histone deacetylases (HDAC) and histone acetyltransferases (HAT), and plays an important role in epigenetic regulation, allowing the control of gene expression. In the present study, the study of a new synthesized molecule with HDAC inhibitory potential was proposed to verify its therapeutic capacity against cervical cancer associated with HPV. Human papillomaviruses (HPVs) are small, non-enveloped, double-stranded DNA viruses. They are the main human carcinogens, being intrinsically linked to the development of cancer in 4.5% of patients diagnosed with cancer worldwide. In vitro and in vivo trials demonstrated that HDACi may be a promising therapy for HPV-related cervical cancer. Therefore, the present study aimed to verify the activity of a newly synthesized histone deacetylase 1/2 HDACi molecule compared to the commercial drug Vorinostat, which also inhibits this same class of HDAC, comparatively evaluating its effect in monotherapy and in combination, the in order to evaluate the effectiveness of the monotherapy treatment of the new molecule and verify the possibility of synergism or antagonism of the combined therapy in cervical cancer cells associated with HPV 16 (SiHa and Caski) and in cellular controls of HPV-negative cervical cancer (C33- A) and spontaneously immortalized normal skin keratinocyte (HaCaT). With this objective, MTT cytotoxicity assays were carried out to determine the dose-response concentration and time-response of both compounds (new molecule and commercial compound), as well as the determination of the IC₅₀ and the potential synergistic or antagonistic effect of the C33-A, combined therapy. Through MTT tests and analysis of results using Graph Pad Prism 5.1 and SinergyFinder. The newly synthesized HDACi molecule showed better action in cells infected with HPV16 SiHa and CasKi, presenting promising results with dose response curve with a treatment time of 72h. In the combined treatment, the compounds showed antagonistic action on keratinocyte cells (HaCat) and those with the presence of HPV (SiHa).

Keyword: HPV; cervical cancer; treatment; epigenetic; virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da infecção e do ciclo de vida do HPV de alto risco e progressão tumoral	12
Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV, assim como as funções de cada gene.....	13
Figura 3. Classificação das histonas	14
Figura 4. Acetilação e deacetilação de histonas	15
Figura 5. A) Estrutura química da molécula nova sintetizada, a HDACi 1-2; B) Estrutura química do composto comercial, o Vorinostat®	17
Figura 6. Desenho experimental do tratamento em ensaio de MTT	19
Figura 7. Desenho experimental do plaqueamento do ensaio de checkerboard	20
Figura 8. Representação gráfica e excel do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 (A) e SAHA (B) em SiHa em 24 horas (três experimentos independentes).	21
Figura 9. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em SiHa em 72 horas (três experimentos independentes)	22
Figura 10. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em CaSki em 24 horas	24
Figura 11. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em CaSki em 72 horas	25
Figura 12. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em C33-A em 24 horas	26
Figura 13. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em C33-A em 72 horas	27
Figura 14. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em HaCaT em 24 horas	27
Figura 15. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em HaCaT em 72 horas	29
Figura 16. Análise gráfica fornecida pelo SinergFinder da viabilidade da linhagem celular HaCat (A) e SiHa (B) frente ao tratamento com os compostos HDACi e SAHA.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. IC ₅₀ do tratamento em monoterapia de HDACi 1,2 e SAHA em tempos de 24h e 72h	30
---	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

B - Branco

CI₅₀ – Concentração inibitória mínima de 50%

CN - Controle negativo

CP - Controle positivo

CV - Controle de veículo

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMEM - Meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium

HBSS - Solução salina de Hank

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HATs - Histona acetiltransferase

HDACi – Inibidor histona deacetilase

HDACs - Histona deacetilase

HPV – Human papilomavirus

IS – Índice de seletividade

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólico

INCA - Instituto Nacional do Câncer

SAHA - Suberoylanilide hydroxamic acid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Epidemiologia.....	11
1.2. Câncer cervical e HPV	11
1.3. Terapia epigenetica.....	14
2. OBJETIVO	16
2.1. Objetivo geral	16
2.3. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODO	17
3.1.Estrutura química de composto HDACi 1-2 e VORINOSTAT (SAHA)	17
3.2. Cultura de células.....	17
3.3 Preparo das soluções tratamento.....	18
3.3.1. Solução de HDACi 1,2 e SAHA.....	18
3.4. Citotoxicidade - Ensaio de MTT.....	18
3.5. Ensaio de Checkerboard	19
3.6 Análise Estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

O câncer cervical, conhecido como câncer de colo do útero, excluindo o câncer de pele não melanoma, é uma enfermidade amplamente disseminada entre as mulheres, ligada a um considerável impacto na saúde e taxa de mortalidade em escala global (LUCKETT; FELDMAN, 2015). No ano de 2018, cerca de 570 mil mulheres foram diagnosticadas com câncer cervical, resultando em 311 mil mulheres óbitos relacionados com a doença, sendo a principal causa de morte relacionada ao câncer em mulheres na regiões leste, oeste, meio e sul da África (ARBYN *et al.*, 2020). É evidente que o câncer cervical é prevalente nas mulheres de nações em desenvolvimento e subdesenvolvidas, onde cerca de 88% dos casos são registrados (BYCHKOVSKY *et al.*, 2016).

O câncer cervical é o terceiro tumor maligno mais frequente na população feminina e a terceira causa de morte de mulheres por câncer no mundo, atrás apenas do câncer de mama e de pulmão (GLOBAL OBSERVATORY OF CANCER, 2020). No ano de 2020, foram notificados aproximadamente 604.000 novos diagnósticos de câncer cervical e 324.000 óbitos em escala global, sendo que quase 90% desses casos ocorreram em países de baixa e média renda (World Health Organization. 2022).

No Brasil, o câncer cervical ocupa a quarta posição nas causas de morte por câncer (GLOBAL OBSERVATORY OF CANCER, 2020). No último ano (2022), estimou-se a ocorrência de cerca de 17.010 novos casos da doença, resultando em 6.627 óbitos relacionados a ela (INCA, 2022). No Brasil, a estratégia de rastreamento para prevenção do câncer do colo do útero é direcionada para mulheres entre 25 e 64 anos, através de exames periódicos de Papanicolau que é pouco realizado em função da escassez de recursos e de profissionais de saúde treinados, o que limita a detecção precoce da citologia (HULL *et.al*, 2020). Martel *et al.* (2020), descreveu que cerca de 2,2 milhões de casos de câncer atribuíveis à infecção foram diagnosticados em todo o mundo em 2018. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, em 2018, foram estimados 16.370 novos diagnósticos de câncer em mulheres relacionados ao papilomavírus humano (HPV), representando 8,1% dos novos diagnósticos de câncer em mulheres associados ao HPV (INCA, 2022). Esses números indicam uma tendência de persistência e aumento de casos ao longo dos anos.

1.2. Câncer cervical e HPV

O câncer cervical, também conhecido como do colo do útero, é uma neoplasia maligna devastadora que afeta o colo do útero, apresentando-se frequentemente na forma de carcinomas de células escamosas (ZHANG *et al.*, 2020). Existem vários fatores de risco associados ao seu desenvolvimento, como exposição à tabagismo, álcool, uso de contraceptivos orais prolongados, infecções bacterianas, parasitárias e vírais como o

Papilomavírus Humano (HPV) (KHAN *et al.*, 2019). Sendo a infecção pelo HPV um dos principais fatores causais, contribuindo para aproximadamente 99,7% de todos os casos (OKUNADE, 2020). O sistema de vacinação contra o HPV em faixa etária precoce (9 a 14 anos em meninas e 11 a 14 anos em meninos), contribui significativamente para a eliminação da transmissão viral (TEKALEGN, 2022). No mercado, há disponível as vacinas bivalentes (Glaxo Smith-Klein©) e quadrivalentes (Merck©), dirigidas a imunização contra o HPV 16 e 18 (bivalente) e HPV 6, 11, 16 e 18 com proteção cruzada contra três tipos virais (HPV31/33/45) antes da exposição da infecção pelo HPV (quadrivalente) os quais protegem com alta eficiência a infecção para os tipos virais alvos, sendo uma terapia profilática. Recentemente foi aprovada pela ANVISA, uma nova vacina nonavalente (Gardasil 9, Merck ©), a qual protege contra nove tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) (TSANG, 2020). Entretanto, esta vacina é apenas disponibilizada em rede particular.

O HPV é um vírus DNA dupla fita, não envelopado, com capsídeo protéico icosaédrico, pertence à família *Papillomaviridae*, e com tropismo pelo epitélio escamoso (pele e mucosa). 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). A infecção é instalada pelo acesso do vírus as células basais por meio de microabrasão, onde o vírus entra na camada basal e estabelece uma infecção de longo prazo nessas células em divisão (MCBRIDE; WARBURTON, 2017). A infecção é iniciada na zona de transformação do epitélio cervical, localizada entre o epitélio pavimentoso e o epitélio colunar exposto por esta microlesão (HERFS *et al.*, 2012). Com estudos indicativos de que a junção ectoendocervical escamocolunar das células do colo do útero poderia ser o principal alvo para a carcinogênese cervical (Gurvich *et al.*, 2004) conforme figura 1.

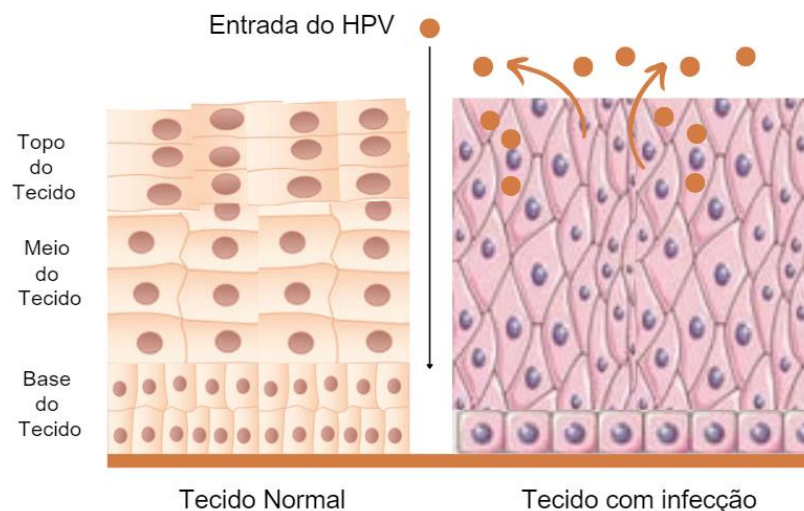


Figura 1. Representação da infecção e do ciclo de vida do HPV de alto risco e progressão tumoral. O vírus infecta a camada basal do epitélio através de microlesões, novas partículas virais são montadas e liberadas pelas camadas superficiais. Fonte: Souza 2023.

Embora existam mais de 100 tipos de HPV, são divididos em dois grupos, baixo e alto risco. Os grupos de baixo risco (HPV 6 e 11) dão origem a lesões benignas, como condilomas, enquanto grupos de alto risco (HPV 16, 18, 45, 33, 31, 52, 58, 35) são considerados oncogênicos e causam infecção persistente (MESRI; FEITELSON; MUNGER, 2014). Os HPVs foram classificados em categorias cancerígenas, como cancerígenos (Grupo 1), provavelmente cancerígenos (Grupo 2a), possivelmente cancerígenos (Grupo 2b), não classificáveis (Grupo 3) ou provavelmente não cancerígenos (Grupo 4) (SCHIFFMAN; CLIFFORD; BUONAGURO, 2009) Sendo os tipos HPV 16 e 18 responsáveis por cerca de 70% de todos os casos de câncer do colo do útero. Além do câncer de colo de útero, o vírus também pode provocar câncer de vulva, vagina, pênis, ânus e orofaringe (MCLAUGHLIN-DRUBI; MÜNGER, 2009)

O vírus possui 50 nm de diâmetro, com genoma de aproximadamente 8,000 pares de base, composto das regiões precoce (E) e tardia (L). A região 'inicial' contém seis proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que são responsáveis pela replicação do genoma do HPV e modulação imunológica (JENDOUBI-FERCHICHI *et al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2011). A região 'tardia' consiste em proteínas do capsídeo L1 e L2, que foram relatadas como desempenhando um papel na transmissão do vírus (GRAHAM, 2003). Entre as proteínas da região E, as principais causadoras de transformação maligna, em especial na cérvix uterina não as proteínas E6 e E7. Assim, a tumorigênese cervical parece depender integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (GUPTA; PRAMANIK, 2019), resultando no aumento nos níveis da oncoproteína E6, degradando p53, e da proteína E7, inativando a proteína supressora de tumor retinoblastoma – pRb 9, por consequência, interrompendo controles celulares, como apoptose e proliferação descontrolada (HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018) conforme figura 2.

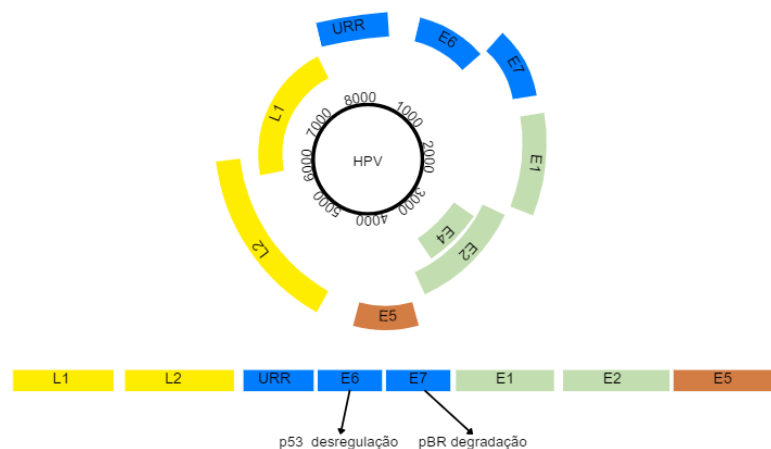


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Fonte: Souza 2023

Esses são dois eventos moleculares primordiais no descontrole de vias celulares, promovendo o câncer cervical. A infecção por vírus de alto risco aumenta com a expressão das proteínas virais resultam em alterações celulares que podem evoluir para o câncer cervical. (INCA, 2022). A carcinogênese cervical é um processo de múltiplos passos com o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas na célula hospedeira. Essas alterações envolvem alterações em oncogenes e genes supressores de tumor, eventos esses cruciais para regular vários eventos moleculares incluindo a apoptose.

1.3. Terapia epigenetica

A carcinogênese cervical passa por um processo de acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas na célula hospedeira. Essas alterações envolvem alterações em oncogenes e genes supressores de tumor, eventos esses cruciais para regular a progressão do ciclo celular, estabilidade cromossômica, ativação de telômeros e apoptose (RIVOIRE; CORLETA; BRUM, 2006). As histonas têm sido relacionadas com a transformação maligna em diferentes tipos de tumor. Em relação ao câncer cervical associado ao HPV, as proteínas HPV E6 e E7 alteram a competência transcricional das células infectadas associando ou modulando a expressão de HDACs, bem como modificando enzimas responsáveis pela modificação de histonas e de remodelamento de cromatina (GUPTA; PRAMANIK, 2019).

Histonas são membros de uma família de proteínas nucleares que interagem com o DNA, resultando no enovelamento desse DNA ao redor core octamérico de histonas numa estrutura complexa denominada nucleossomos. Dezoito isoformas de HDAC foram identificadas e classificadas em quatro classes (classe I – IV), de acordo com sua homologia e localização nas células conforme figura 3. As classes I, II e IV são enzimas dependentes de zinco, enquanto a classe III inclui enzimas dependentes de NAD⁺, também chamadas de sirtuínas (SIRTs) (BRADNER *et al.*, 2010).

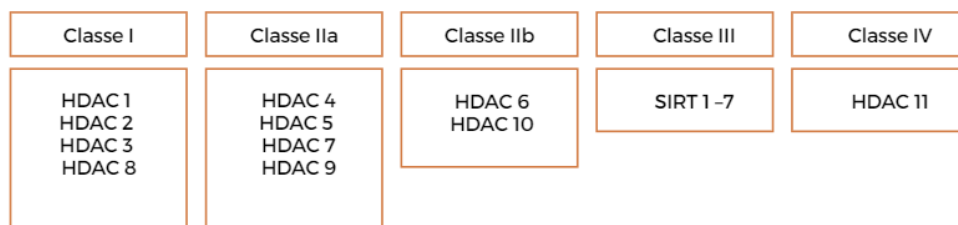


Figura 3. Classificação das histonas. Classe I (HDAC-1, 2, 3 e 8), classe IIa (HDAC-4, 5, 7 e 9), classe IIb (HDAC-6 e 10), classe III (SIRT1 –7) e classe IV (HDAC-11). Fonte: Souza 2023.

As HDACs de classe I são encontradas em todos os tecidos e células, sendo elas consideradas as principais HDACs responsáveis pela desacetilação de histonas, e sua

localização em sua maioria nuclear (SEGRE; CHIOCCA, 2011; FASS *et al.*, 2012). As HDACs de classe II são enzimas mais específicas, localizadas no cérebro, coração, músculo liso, rim e fígado, com estudos incativos de essas enzimas são substratos não histonas ou recrutadores para as HDACs (WITT *et al.*, 2009; BRADNER *et al.*, 2010; FASS *et al.*, 2012). A HDAC de classe IV localizada no núcleo de células neurais e imunes, possui semelhanças com as classes I e a II. As HDACs de classe III, são enzimas dependentes de dinucleotídeos nicotina-adenina como cofatores, gerando como resultado o complexo O-acetil-ADP-ribose (O-AADPR) e um substrato desacetilado. Essas hisnonas estão presentes na resposta celular ao estresse oxidativo, ciclo celular, termogênese, produção de ATP, secreção de insulina, ciclo da ureia e transcrição de rDNA, podendo estar localizado no núcleo, no citosol ou na mitocôndria (HAIGIS; SINCLAIR, 2010; FASS *et al.*, 2012).

A acetilação/deacetilação de histonas é um importante mecanismo epigenético de regular a expressão gênica e o remodelamento da cromatina (RASHEED; JOHNSTONE; PRINCE, 2007; ALBERTS, 2002). A acetilação de histonas, por exemplo, promove a expressão gênica, alterando a estrutura espacial dos nucleossomos e induzindo o afrouxamento da cromatina, aumentando assim a replicação do DNA e a transcrição. As HDACs, por outro lado, removem os resíduos acetil e estão associadas a condensação das estruturas da cromatina, suprimindo a transcrição, conforme figura 4.

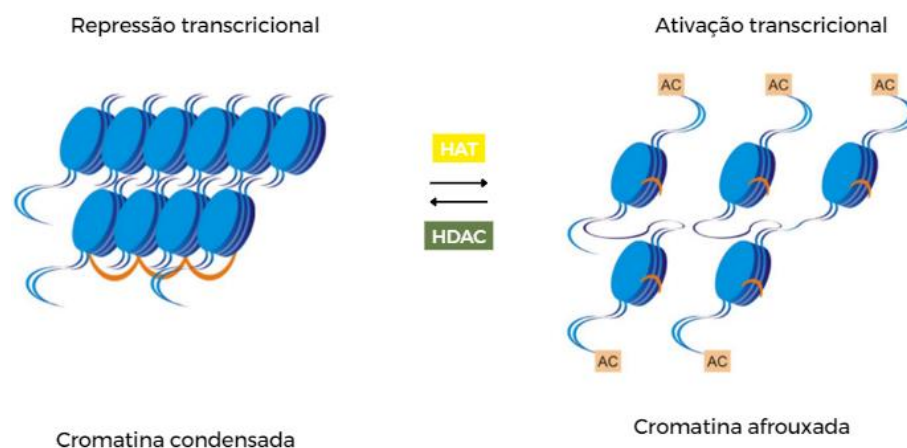


Figura 4. Acetilação e deacetilação de histonas. Acetilação de histonas (HATs) promove a expressão gênica, alterando a estrutura espacial dos nucleossomos e induzindo o afrouxamento da cromatina, aumentando assim a replicação do DNA e a transcrição. A deacetilação de histonas (HDACs), por outro lado, removem os resíduos acetil e estão associadas a condensação das estruturas da cromatina, suprimindo a transcrição. Fonte: Souza 2023

Dessa forma, um grande recrutamento de HDAC reprime a expressão de genes específicos na célula, acreditando ser esse um mecanismo de oncogênese em alguns desenvolvimentos de tumores específicos (JONES; BAYLIN, 2002).

Devido à superexpressão de HDAC em diversos tipos de câncer, como no colo do útero, sabe-se que os inibidores de HDAC atuam reduzindo o desenvolvimento do tumor,

sendo usados isoladamente ou em combinação com outras drogas. Alguns compostos têm a capacidade de reverter os padrões de metilação e acetilação do DNA e histonas (APARICIO *et al.*, 2009). Pesquisas demonstraram que ao inibir a atividade das histonas deacetilases, ocorre um bloqueio do ciclo celular e apoptose das células por mecanismos desconhecidos, fazendo dessas enzimas possíveis alvos terapêuticos (GIBBS, 2007). Além da remodelação da cromatina, as HDACs afetam proteínas não-histonas em locais específicos, incluindo supressores de tumor e oncoproteínas envolvidas nas vias de sinalização tumoral, afetando em última análise o destino celular. HDACs desacetilam muitos grupos de proteínas não histonas, incluindo: fatores de transcrição, proteínas de adesão celular, proteínas celulares, proteínas de reparo de DNA, proteínas de sinalização celular e proteínas virais. No entanto, o papel dos HDACs na tumorigênese é controverso: promovendo a sobrevivência das células cancerígenas ou causando a morte celular entre diferentes tipos de câncer (WAWRUSZAK *et al.*, 2021). Dessa forma, os inibidores de HDAC (HDACi) são amplamente utilizados na pesquisa epigenética do câncer. Tais inibidores reduzem a deacetilação de histonas e melhora os níveis de histona de acetilação controlando o emaranhamento de DNA em histonas portanto, desempenhando um papel na regulação da expressão gênica (LIU *et al.*, 2019).

Estudos mostram que a terapia epigenética com a utilização de HDACi foi capaz de efeito proliferativo, indutores de apoptose e diminuição de tumores induzidos em camundongos nude Balb-C, utilizando diferentes tipos celulares, inclusive a células HeLa (câncer cervical HPV18). (CHENG *et al.*, 2019). Ainda os inibidores de HDAC potencialmente induzem parada do ciclo celular, processo de diferenciação e apoptose sem apresentar efeitos citotóxicos em células normais (LIU *et al.*, 2012).

O inibidor de HDAC SAHA (ácido hidroxâmico suberoylanilida), também chamado Vorinostat, é um inibidor de pan-HDAC (Classes I (HDAC1, 2, 3 and 8), II (HDAC4, 5, 6, 7, 9, and 10), and IV (HDAC11)) e apresentou boa atividade contra o câncer de colo uterino (SERRANO-OLVERA *et al.*, 2014). Entretanto o presente estudo propõe a avaliação de molécula sintetizada, cuja modificação química merece avaliação quanto sua atividade antitumoral contra o câncer de colo uterino associado ao HPV, sendo avaliado inibidores de HDAC linhagens cervicais HPV16 (SiHa e CasKi), utilizando esses inibidores como estratégia terapêutica.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de uma nova molécula HDACi 1-2 em comparação com um composto comercial (Vorinostat) em monoterapia e em terapia combinada, a fim de avaliar sua eficiência para o tratamento de câncer de colo uterino associado à infecção pelo HPV.

2.3. Objetivos específicos

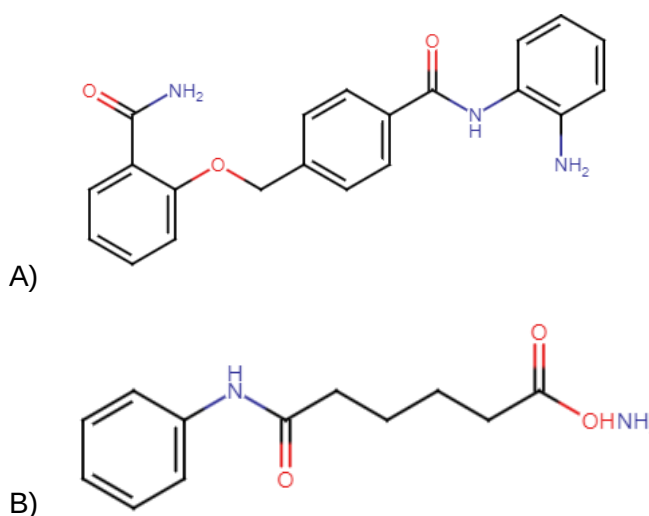
Verificar comparativamente o efeito citotóxico, por meio da viabilidade celular, através de ensaio de citotoxicidade pelo ensaio do MTT, de dois compostos, um comercial (SAHA) e outro recém sintetizada (HDACi 1,2) inibidoras de histona deacetilase 1,2 em diferentes concentrações e tempos de tratamento em linhagens celulares normais e de câncer cervical HPV-16 positiva.

Avaliar o tratamento concomitante de ambos os compostos (nova molécula de HDACi 1-2 e composto comercial Vorinostat), a fim de identificar se a terapia combinada resulta em um efeito sinérgico, aditivo ou antagônico. Avaliado pelo ensaio de checkerboard e software SynergyFinder .

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Estrutura química de composto HDACi 1-2 e VORINOSTAT (SAHA)

Figura 5. A) Estrutura química de molécula nova sintetizada de HDACi 1-2; B) Estrutura química de composto comercial do Vorinostat



3.2. Cultura de células

As linhagens celulares foram cultivadas em ambiente esterilizado nos frascos de cultura de célula utilizando meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (Cultilab, Campinas, SP) e solução de antibiótico/antimicótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37 °C em atmosfera com CO₂ 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 foram as linhagens de câncer cervical transformadas com HPV16 positiva SiHa (1 a 2 cópias virais) e linhagem não tumoral de pele espontaneamente imortalizada (HaCaT). Em função dos problemas com o estoque e reativação das linhagens (explicitado como mencionado na justificativa), as células foram gentilmente cedidas pela Professora Associada Marília de Freitas Calmon, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo.

3.3 Preparo das soluções tratamento

3.3.1. Solução de HDACi 1,2 e SAHA

Para o preparo da solução de ambos os compostos, foram preparadas alíquotas dos compostos solubilizados com DMSO, preparando soluções de estoque. Segundo protocolo padrão para preparação da solução de trabalho, 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, sendo armazenadas posteriormente congelada a -20°C, sob abrigo de luz.

3.4. Citotoxicidade - Ensaio de MTT

Com o objetivo de desenvolver quimioterápicos essenciais para o controle de diversos tipos de câncer, um dos principais testes é o método de redução do tetrazólio. Esse teste pode determinar a concentração inibitória mínima necessária para obter 50% das células viáveis ou inviáveis pela citotoxicidade promovida pelo agente testado, o tempo de exposição ao medicamento e a eficácia da administração do medicamento (OZI et. al, 2011; BOURNINE *et al.*, 2017).

Através do ensaio com brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) pode-se determinar a atividade metabólica da mitocôndria e correlacionar com as células viáveis após tratamento dos compostos HDACi 1-2 e Vorinostat (SAHA). Para determinação da citotoxicidade e seletividade sobre as linhagens, as células foram cultivadas em placas de cultura de células de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/mL, em estufa a 37 °C com atmosfera com 5% de CO₂, durante 24 horas (h), antes dos tratamentos com as amostras. As linhagens celulares testadas foram tratadas em cinco diferentes concentrações (100µM a 6.5µM) de HDACi 1-2 e SAHA (Vorinostat) nos tempos de 24h e 72h. Depois do tratamento, o meio de cultura foi descartado da placa e colocado 10 µL de MTT, a 5 mg/mL em PBS, em cada poço. A placa foi incubada por mais 3 h nas mesmas condições de cultivo para ocorrer a redução do sal. A seguir o sal de formazana foi solubilizado com 100 µL de isopropanol, seguida de leitura em espectrofotômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) no

comprimento de onda 570 nm, descontando a absorbância a 655 nm. A estimativa de células vivas é obtida pela fórmula:

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

Três experimentos independentes foram realizados, com triplicatas. Adicionalmente foram realizados o controle negativo (células sem tratamento) controle positivo (Doxorrubicina a 100µM) e como controle de veículo (DMSO 0,5%) e branco contendo somente meio de cultura suplementado com 10% soro fetal bovino e antibióticos. Dessa forma, o experimento foi desenhado e realizado como demonstrado na figura 6.

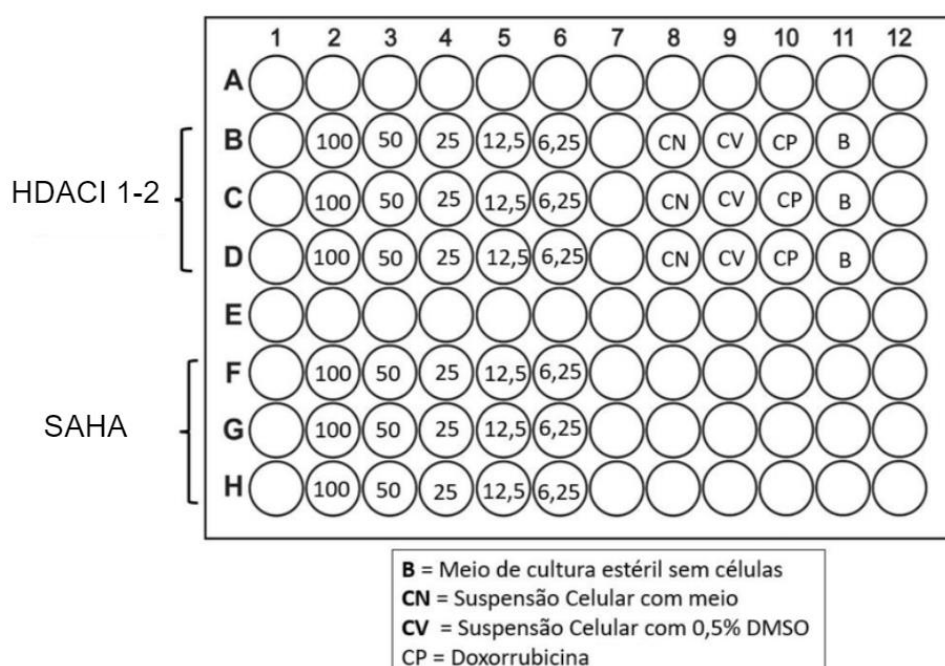


Figura 6. Desenho experimental do tratamento em ensaio de MTT

3.5. Ensaio de Checkerboard

O ensaio de checkerboard tem como objetivo avaliar a combinação de substâncias com 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. Para o ensaio é realizado o plaqueamento da linhagem, onde na vertical, cada poço é tratado com uma concentração diferente do composto HDACi 1,2, enquanto na horizontal diferentes concentrações de SAHA, conforme figura 6.

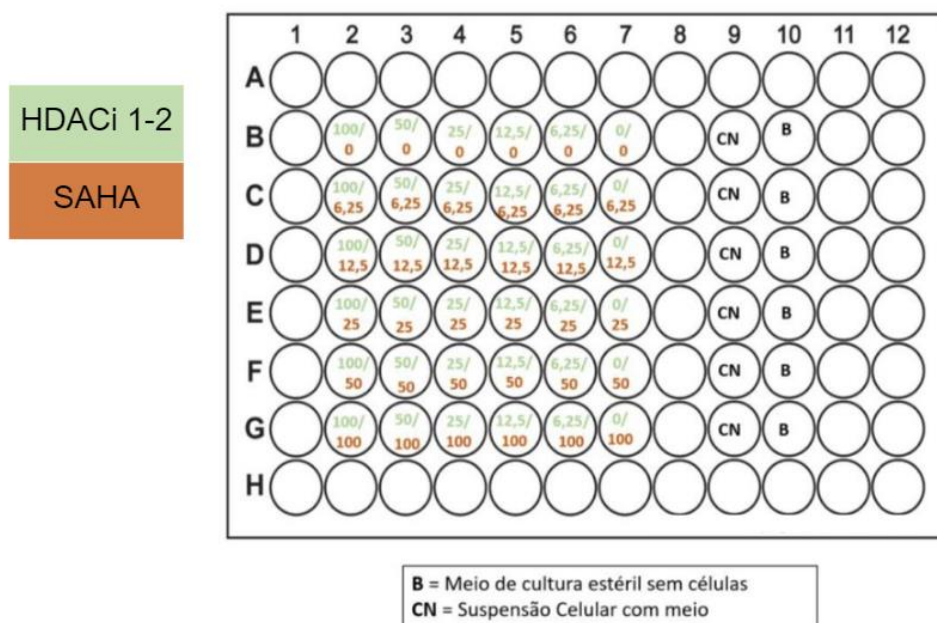


Figura 7. Desenho experimental do plaqueamento do ensaio de checkerboard

Em seguida é realizado o cálculo para viabilidade celular e realizado a média dos três experimentos independentes. Após a obtenção da média, é criada uma planilha com os resultados no template do programa SynergyFinder e realizado as análises a partir do software.

3.6 Análise Estatística

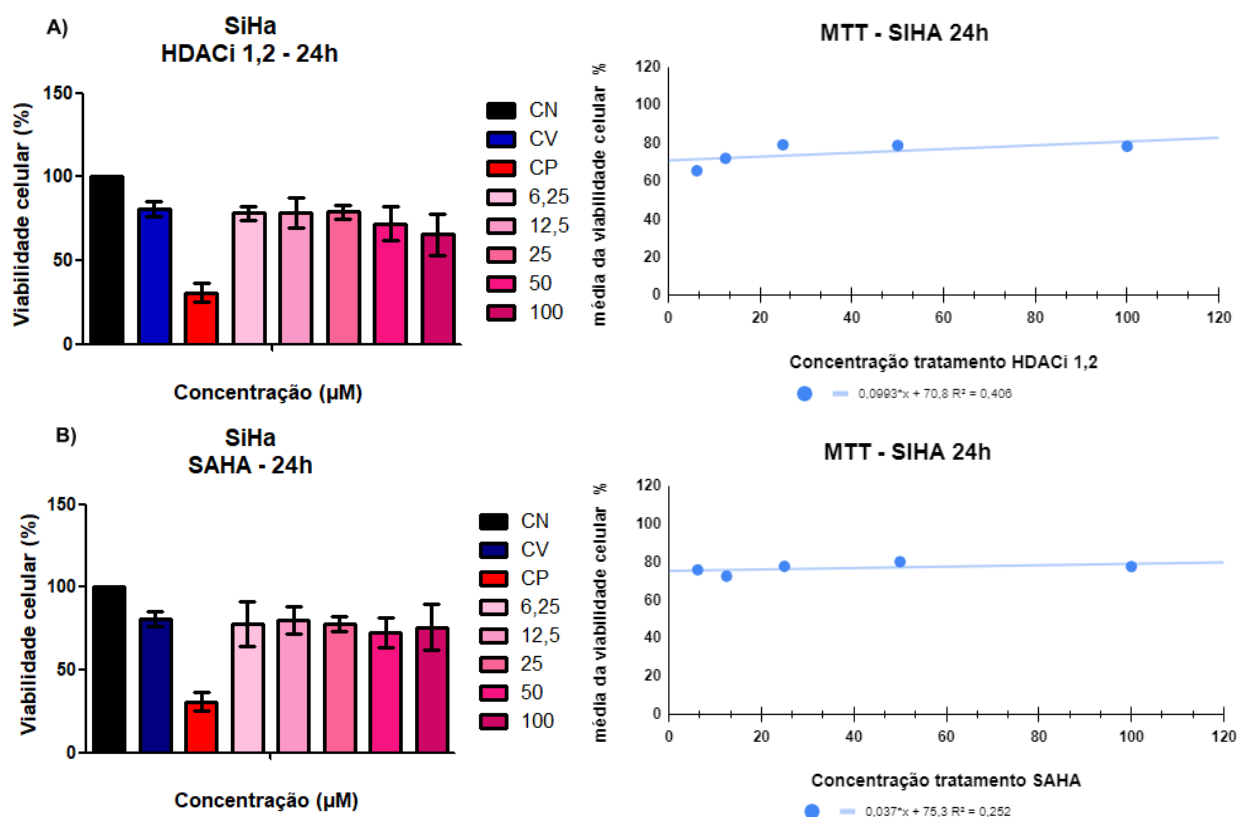
Para analisar os resultados obtidos em triplica e três experimentos independentes foram aplicados no teste One-Way ANOVA com Pós-Test de Tukey de comparações múltiplas entre os grupos, utilizando o software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA). O IC₅₀ (concentrações capazes de inibir 50% da viabilidade celular) foi obtido através do excel utilizando a regressão linear da curva dose resposta dos compostos. Para a análise do ensaio de checkerboard, foi utilizado o software SynergyFinder, com intuito de analisar as combinações multidose 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, na 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. Para análise, foi escolhido o método de análise ZIP, o qual 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

Inicialmente, para analisar o efeito citotóxico nas células de câncer cervical HPV16 positivo tratadas com novo composto recém sintetizado HDACi 1,2 e SAHA em monoterapia, foram realizados experimentos com linhagem de câncer cervical HPV16 positiva (SiHa e CasKi) HPV negativa (C33A) e linhagem não tumoral de pele espontaneamente imortalizada (HaCaT), tratadas com HDACi 1,2 e SAHA, em tempo de 24h. De forma que, por meio da viabilidade celular, obtidos através do ensaio de MTT, fosse possível indicar se há uma resposta efetiva de morte celular, levando a uma curva dose-resposta nas concentrações de 6,25µM, 12,5µM, 25µM, 50µM e 100µM em ambos os tratamentos.

Os resultados dos experimentos com a linhagem de câncer cervical HPV16 positiva (SiHa) com tratamento 24 horas utilizando o composto HDACi 1,2 e SAHA, não indicaram uma ação do composto significativa, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 8. Representação gráfica e excel do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 (A) e SAHA (B) em SiHa em 24 horas (três experimentos independentes). Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMSO 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100µM). Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p = 0,0005$, significativo (***) para HDACi 1,2 e $p = 0,0034$ ($p < 0.05$), significativo (**) para SAHA. Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA).



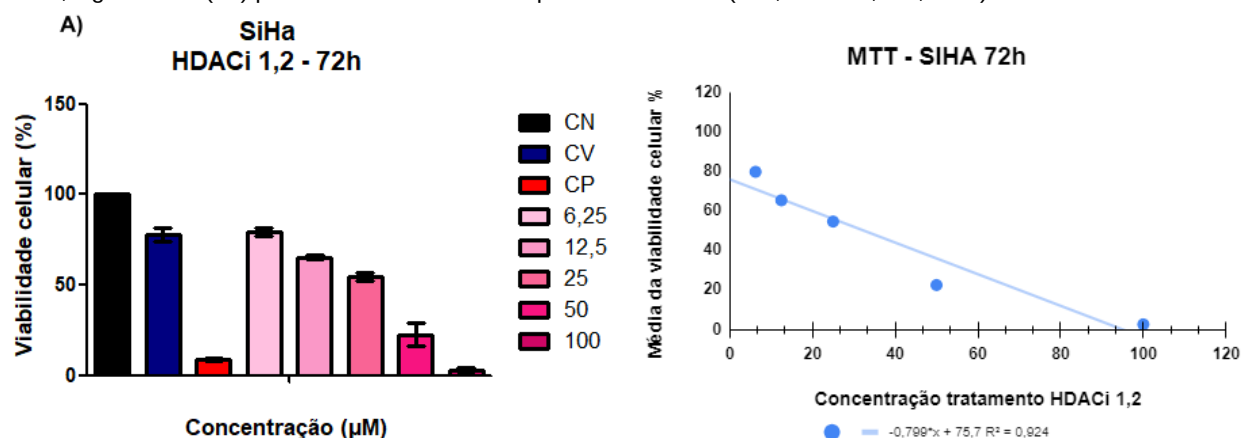
Ambos tratamentos apresentaram significância estatística apenas para os controles. Indicando que o tratamento com HDACi 1,2 e SAHA não apresenta diferença

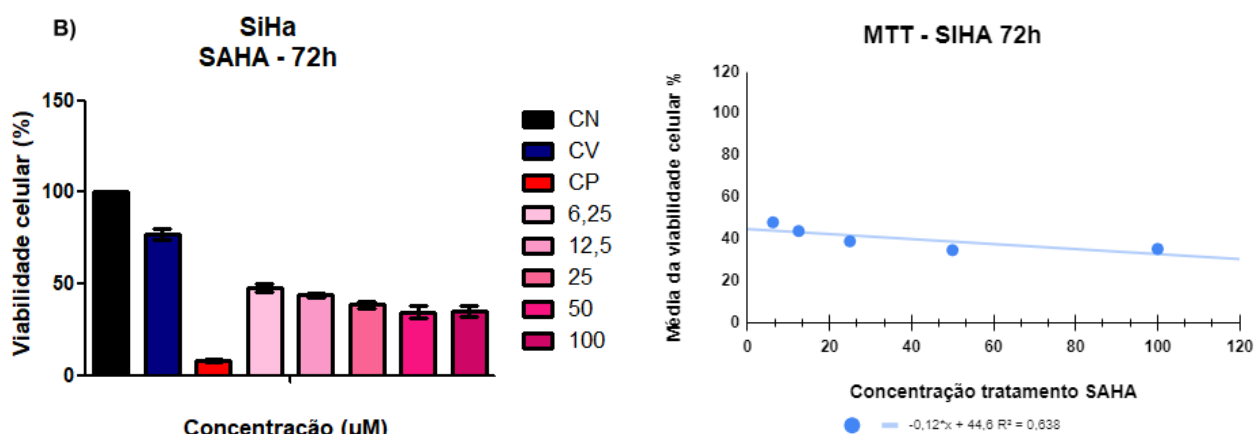
estatística e curva dose resposta em linhagem câncer cervical HPV16 positivo em tempo de 24h. Segundo estudos, molecularmente, o câncer é definido pela divisão celular descontrolada, seguida por alterações genéticas e modificações epigenéticas. A ativação de oncogenes e a desativação de genes supressores de tumor resultam na inibição ou inativação de vias de sinalização apoptóticas, aumentando assim a proliferação celular (WAWRUSZAK *et al.*, 2021). Estudos prévios mostraram que os inibidores da histona desacetilase, bloqueiam a expressão de HDACs, levando à regulação positiva da acetilação da histona e da proteína não-histona (WAWRUSZAK *et al.*, 2021), e potencialmente induzem parada do ciclo celular, processo de diferenciação e apoptose sem apresentar efeitos citotóxicos em células normais (LIU *et al.*, 2012). Com essa base, os resultados do tratamento com HDACi 1,2 e SAHA na linhagem SiHa indicaram que o tratamento em 24h não foi suficiente para promover a ativação das vias apoptóticas, onde em 24h não há tempo de ver alterações significativas. Estudos anteriores indicaram que um tratamento de 72h e 96h permitiria um tempo de ação mais efetivo para os compostos. Entretanto em 96h haveria a perda do controle negativo, devido ao super crescimento das células nos poços controle sem tratamento.

Dessa forma, foi estudado a possibilidade de aumentar o tempo de tratamento, o qual disponibilizaria maior tempo de ação da molécula e assim permitir maior regulação epigenética e controle da expressão gênica, visto que a estudos apontam que a desacetilação de histonas está frequentemente associada à transcrição e repressão e silenciamento de genes, podendo modular a atividade de HDACs e, assim, regular a expressão gênica (KAWAGOE; KAWAGOE; SANO, 2002).

Logo, foram realizados experimentos com linhagem de câncer cervical HPV16 positiva (SiHa), tratadas com HDACi 1,2 e SAHA, em tempo de 72h conforme Figura 2.

Figura 9. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em SiHa em 72 horas (três experimentos independentes). Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMSO 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100µM). Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p < 0.0001$, significativo (***) para HDACi 1,2 e $p < 0.0001$, significativo (***) para SAHA. Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA).

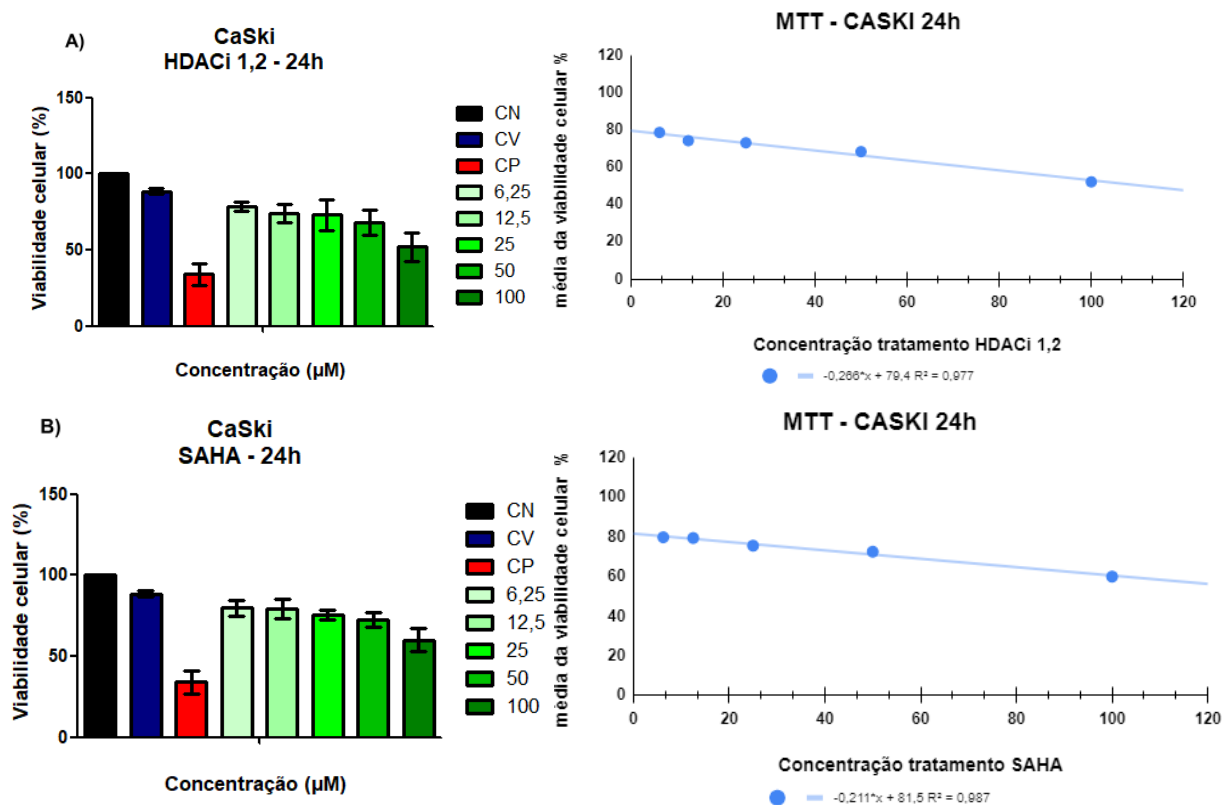




Os resultados do tratamento de SiHa com HDACi 1,2 e SAHA em 72h demonstraram maior efetividade, com uma curva dose-resposta mais acentuada e diferença significativa entre os tratamentos. Quando comparado com o controle positivo, pode-se verificar que a ação do HDACi 1,2 na concentração de 100μM apresentou uma ação bem semelhante a doxorrubicina, visto a proximidade da viabilidade celular obtidos. Indicando que o tempo-resposta para linhagem celular de câncer cervical HPV16 (SiHa) apresentou resultados melhores em 72h, com uma dose inibitória de 50% (IC₅₀) de 32,2μM para HDACi 1,2. Para esse experimento, o relatório de análises estatísticas demonstrou que houve valores significativos de tratamento com o composto HDACi 1,2, onde quando comparado com controle negativo a concentração de 100μM, 50μM, 25μM, 12,5μM apresentaram $p < 0,0001$ e 6,25 $p < 0,01$ e o composto SAHA apresentou valores significativos quando comparado com controle negativo a concentração de 100μM, 50μM, 25μM, 12,5μM e 6,25μM apresentaram $p < 0,0001$, com IC₅₀ abaixo de 1μM indicando que ambos compostos induzem a morte das células. Estudos apontaram que a atividade de SAHA in vitro inibe HDACs de classe I e II em cerca de 50nM, interrompendo o crescimento celular de uma ampla variedade de células em cultura à 2,5–5,0 μM (MARKS; BRESLOW, 2007).

Em seguida, para avaliar amplamente o efeito do tratamento com a molécula recém sintetizada e a comercial nas linhagens de câncer cervical associados com HPV16, foram realizados experimentos com linhagem de câncer cervical HPV16 positivo com mais cópias virais (CaSKi) em tempo de 24h conforme Figura 4.

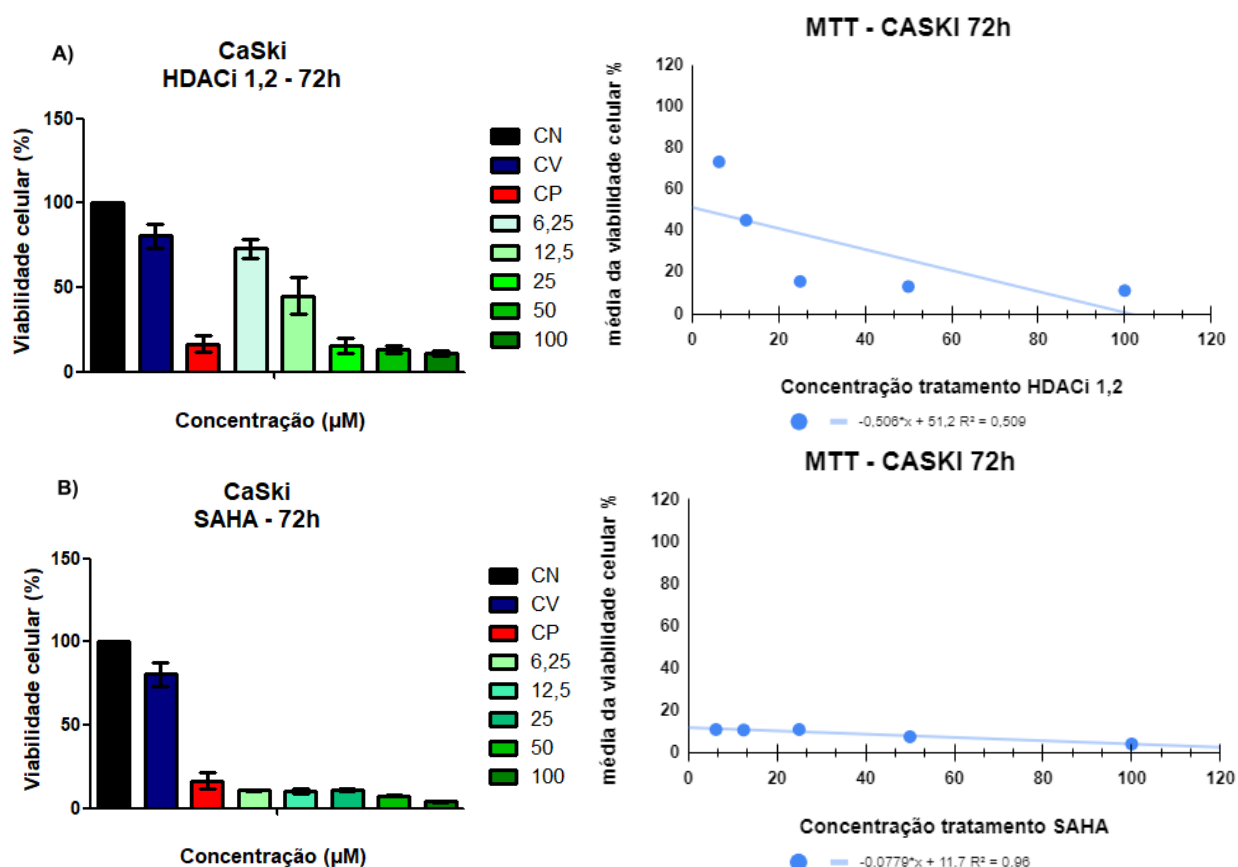
Figura 10. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em CaSKi em 24 horas (três experimentos independentes). Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMSO 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100μM). . Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p < 0.0001$, significativo (***) para HDACi 1,2 e SAHA. Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA).



Os resultados obtidos com o tratamento de ambos compostos em tempo de 24h demonstraram curva dose-resposta. O tratamento com HDACi 1,2 apresentou significância de $p < 0,01$ para controle negativo e 100µM com dose inibitória (IC_{50}) de 110,5µM para HDACi 1,2. Já o tratamento com SAHA apresentou diferença significativa de $p < 0,0001$ para controle negativo em comparação a 100, 50 e 25µM e com dose inibitória (IC_{50}) de 149,3µM. As células CaSki abrigam cerca de 600 cópias do genoma integrado do HPV-16 e expressam os genes E6 e E7 (BAKER, 1987), podendo ser responsável pelo aumento da resposta aos compostos. Todavia, o tratamento da linhagem apresentou maior resposta em tempo 72h comparado ao tempo de 24h, com diferença significativa nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100µM ($p < 0,0001$) em relação a HDACi 1,2 com controle negativo, com IC_{50} de 12,85µM e em todas concentrações ($p < 0,0001$) em relação ao tratamento com SAHA e controle negativo, com IC_{50} abaixo de 1µM, apresentando um acentuado efeito inibitório para ambos tratamentos, conforme Figura 5. Demonstrando com isso, a hipótese de que os compostos apresentam uma ação em células cancerígenas positivas para HPV, visto que apresentou resultados significativos na linhagem celular SiHa. Ademais, os resultados induzem uma possível relação da maior potência dos compostos com a maior quantidade de cópias virais, porém para melhor elucidar seria necessário mais estudos. Foi possível observar que houve uma ação maior em relação ao composto SAHA, visto que obteve uma ação inibitória maior em todas as concentrações em comparação ao inibidor HDACi 1,2. Podendo ser explicado por SAHA ser um inibidor de HDACs de classe I e II e

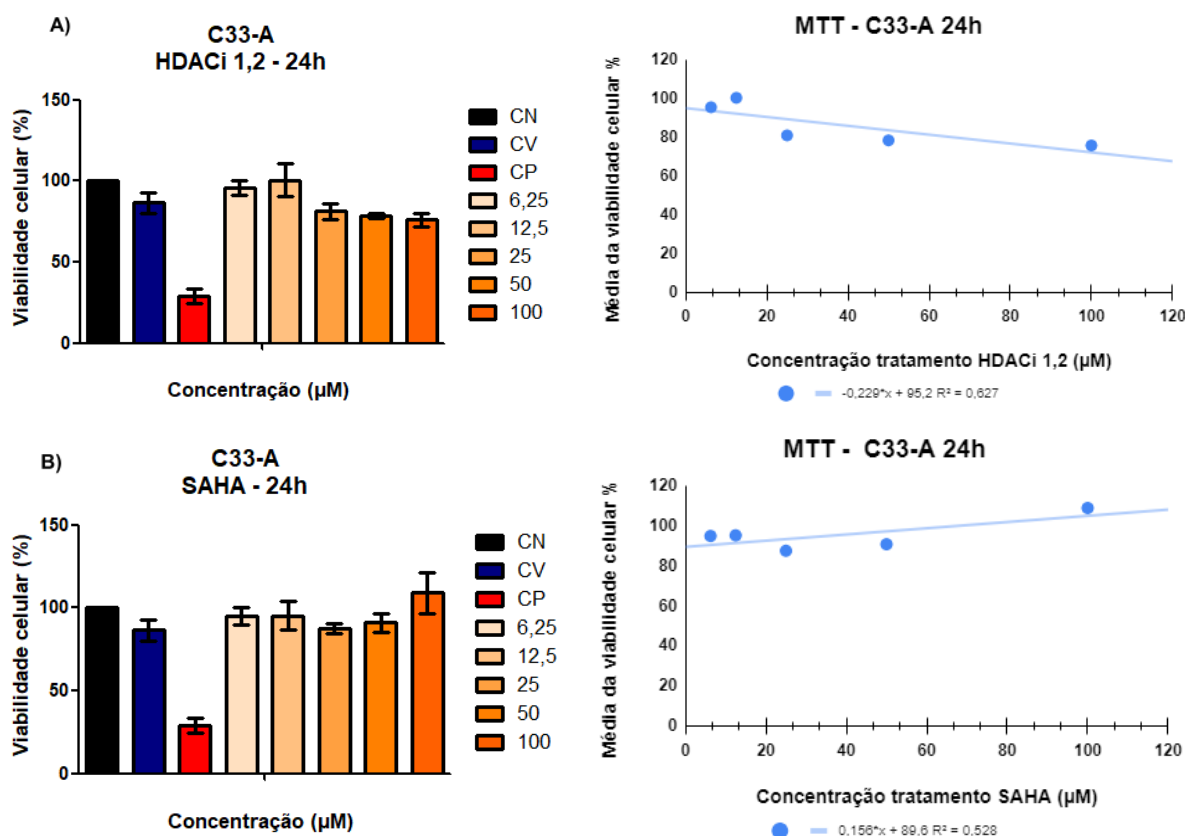
IV, sendo um composto mais abrangente, diferente do composto inibidor de HDAC 1,2 que inibe apenas a classe I.

Figura 11. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em CaSki em 72 horas (três experimentos independentes), Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMSO 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100µM). . Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p < 0.0001$, significativo (***) para HDACi 1,2 e SAHA. Software Graph Pad Prism 5.1.



Com o intuito de avaliar a seletividade do composto por linhagens de câncer cervical associado com HPV16, foi avaliado o tratamento com a molécula recém sintetizada (HDACi 1,2) e a comercial (SAHA) em células de linhagem de câncer cervical HPV16 negativo C33-A, seguindo a metodologia anteriormente usada nos demais experimentos, conforme a Figura 6.

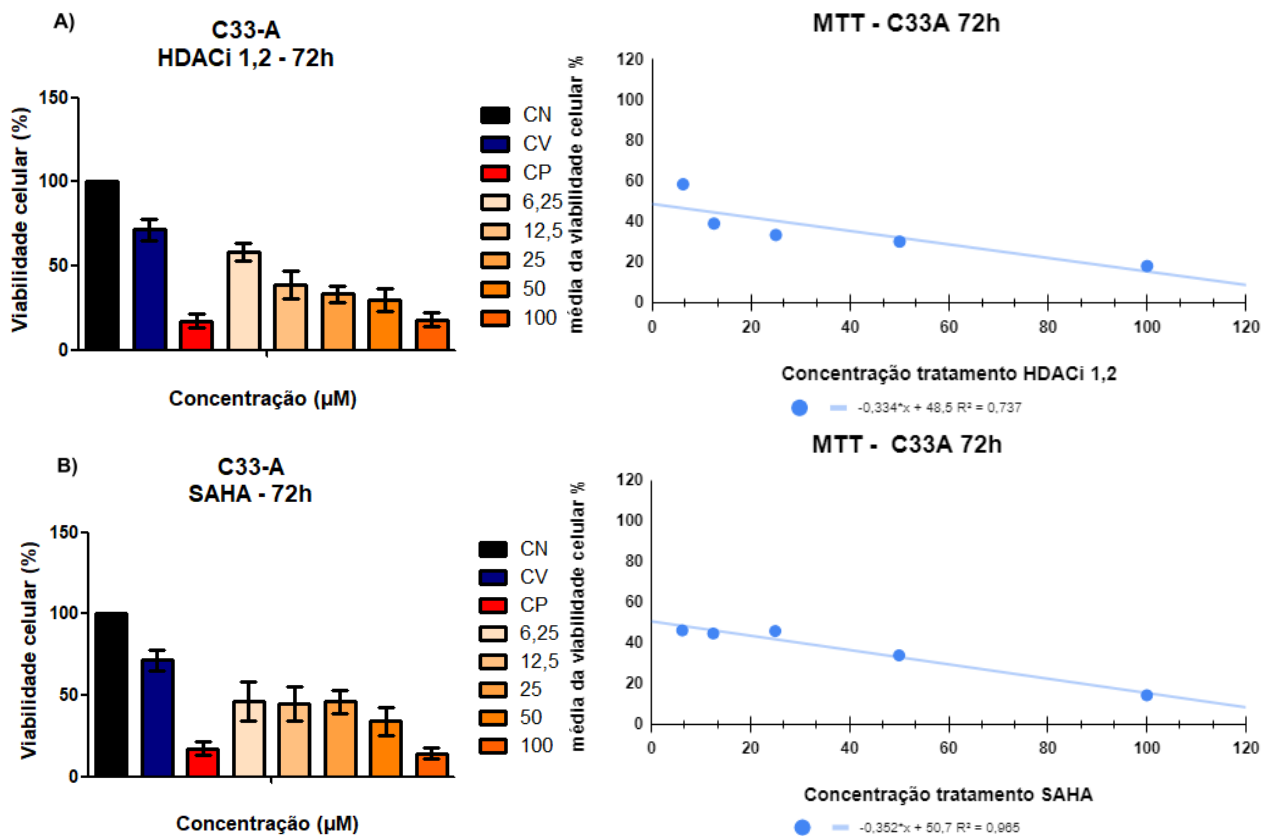
Figura 12. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em C33-A em 24 horas (três experimentos independentes). Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMSO 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100µM). Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p < 0.0001$, significativo (***) para tratamento HDACi 1,2 e SAHA. Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA).



Os resultados apresentaram o mesmo padrão de viabilidade celular referente ao tratamento em tempo de 24h, não apresentando diferença significativa entre as concentrações e curva dose resposta. Necessitando de concentrações altas para inibir 50% das células (IC_{50} HDACi 1,2 = 197,4μM , IC_{50} SAHA = 253,8μM).

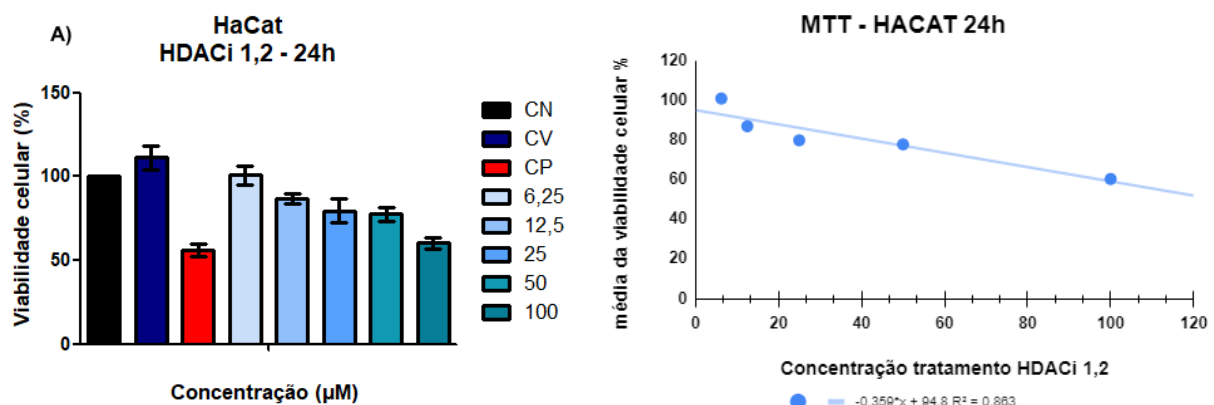
Entretanto para o tratamento em tempo de 72h apresentou maior efetividade e curva dose resposta, conforme apresentado na Figura 7, com redução da concentração inibitória (IC_{50} HDACi 1,2 = 4,41μM e SAHA = 1,99μM), indicando que ambos os tratamentos levam a morte celular em linhagens celulares de câncer celular associado e não associado com HPV16, abrindo-se uma interpretação dos resultados de que o composto inibidor de HDAC 1,2 não seja seletivo para a presença de HPV, visto que a linhagem celular C33-A apresenta células de câncer cervical HPV negativo.

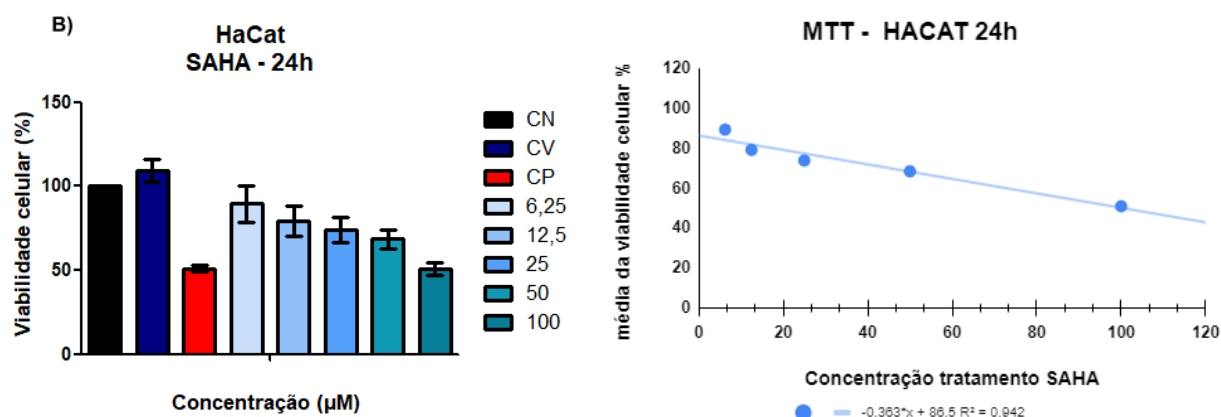
Figura 13. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em C33-A em 72 horas (três experimentos independentes). Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMSO 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100μM). . Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p < 0.0001$, significativo (***). Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA). (*** CN e 100 ($p < 0,0001$), (***) CN e 50 ($p < 0,0001$), (**) CN e 25 ($p < 0,01$), (**) CN e 12,5 ($p < 0,01$), (**) CN e 6,25 ($p < 0,01$) para HDACi 1,2 e (*** CN e 100 ($p < 0,0001$), (***) CN e 50 ($p < 0,0001$), (***) CN e 25 ($p < 0,0001$), (***) CN e 12,5 ($p < 0,0001$), (**) CN e 6,25 ($p < 0,01$), (**) 6,25 e 100 ($p < 0,01$), (*) 6,25 e 50 ($p < 0,05$). para SAHA .



Finalizando os testes em monoterapia, foi realizado experimentos nas linhagem celular imortalizada de pele humana não tumoral (HaCaT), tratadas com HDACi 1,2 e SAHA em monoterapia, a fim de observar o efeito do tratamento em linhagem não tumoral, conforme a Figura 8 e 9.

Figura 14. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em HaCaT em 24 horas (três experimentos independentes). Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMS0 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100μM). Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p < 0.0001$ ($p < 0.05$), significativo (**). Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA). (** CN e 100 ($p < 0,01$), (*) 6,25 e 100 ($p < 0,05$) para HDACi 1,2 e $p < 0.0001$ ($p < 0.05$), significativo (**). (***) CN e 100 ($p < 0,0001$), (***) 6,25 e 100 ($p < 0,0001$), (*) 12,5 e 100 ($p < 0,05$) para SAHA.



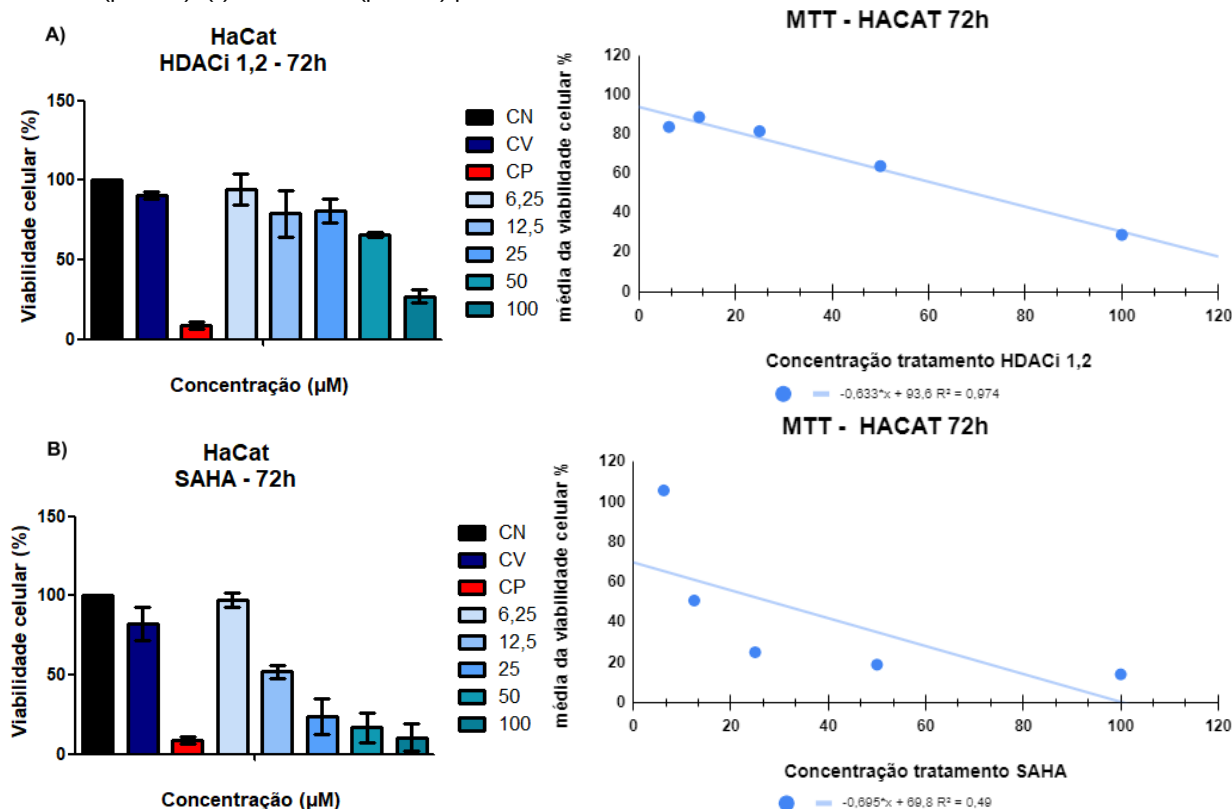


O tratamento de HaCaT com HDACi 1,2 e SAHA, apresentou curva dose-resposta em tempo de 24h. Identificando que no tratamento com HDACi 1,2 revelou resultado significativo para 100μM ($p < 0,01$) com controle negativo em um IC_{50} de 124,8μM, enquanto que para SAHA apresentou um resultado significativo em 100μM ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo, com IC_{50} de 100,5μM. Além disso, para o tratamento de HaCaT com HDACi 1,2 e SAHA em 72h, foi observado curva dose resposta mais acentuada, com uma concentração IC_{50} de 68,9μM para HDACi 1,2 e 28,5μM para SAHA.

Com este resultado, surge a hipótese que o tratamento com HDACi 1,2 e SAHA leva à morte celular em linhagens celulares de câncer celular associado com HPV16, não associado ao HPV16 e em linhagens não tumorais, fato que pode não ser interessante pensando na seletividade celular, onde com o tratamento com SAHA, por atuar em diferentes histonas dentro das três principais classes, não possui seletividade para as células tumorais. Entretanto, com o cálculo do índice de seletividade (IS) dos compostos, o qual avalia quanto cada substância foi seletiva para as linhagens tumorais, demonstrou que HDACi 1,2 em 24h possui índice de seletividade igual a 0,63 e 72h igual a 15,6, enquanto que para SAHA apresentou um índice de seletividade para 24h de 0,39 e 72h de 14,3 em relação a linhagem celular tumoral C33A. Dessa forma, considerando que os valores encontrados que demonstram que $IS > 1,0$ 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), é possível avaliar uma seletividade para o tratamento em 72h nas linhagens tumorais, o que pode ser um resultado positivo para os tratamentos, visto que em baixas concentrações o inibidor HDAC 1,2 e SAHA possui uma ação maior em comparação ao controle de linhagem não tumoral. Todavia, HDAC 1,2 não apresentou-se mais seletiva que o tratamento com SAHA, sendo esse apresentando maior inibição em todas as linhagens.

Figura 15. Representação gráfica do tratamento dose-resposta com HDACi 1,2 e SAHA em HaCaT em 72 horas (três experimentos independentes). Experimento de citotoxicidade com MTT. CN= Meio de Cultura (DMEM F10) CV= Controle de Veículo (DMSO 0.05%); CP= Controle Positivo (Doxorrubicina 100μM). Análise Estatística, Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey com comparações múltiplas entre os grupos. $p < 0.0001$ ($p < 0.05$), significativo (***). Software

Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA). (***) CN e 100 ($p < 0,0001$), (***) 6,25 e 100 ($p < 0,0001$), (**) 12,5 e 100 ($p < 0,01$), (**) 25 e 100 ($p < 0,01$), (*) 50 e 100 ($p < 0,05$) para HDACi 1,2 e $p = < 0,0001$ ($p < 0,05$), significativo (***)). Software Graph Pad Prism 5.1 (Inc., La Jolla, CA, USA). (***) CN e 100 ($p < 0,0001$), (***) CN e 50 ($p < 0,0001$), (***) CN e 25 ($p < 0,0001$), (**) CN e 12,5 ($p < 0,01$), (***) 6,25 e 100 ($p < 0,0001$), (***) 6,25 e 50 ($p < 0,0001$), (***) 6,25 e 25 ($p < 0,0001$), (*) 6,25 e 12,5 ($p < 0,05$), (*) 12,5 e 100 ($p < 0,05$) para SAHA.



Conforme a Tabela 1, foi possível observar resultados promissores no tratamento em 72h, visto que para as linhagens de células tumorais associado e não associado com HPV16, as concentrações inibitórias mínimas do novo composto se mostrou-se eficaz em baixas concentrações, enquanto que para linhagem de células não tumorais (HaCaT) apresentou a necessidade de uma concentração maior, possibilitando um tratamento mais seletivo em baixas dosagens.

Tabela 1 - IC₅₀ do tratamento em monoterapia de HDACi 1,2 e SAHA em tempos de 24h e 72h

24h								
IC ₅₀	HACAT		C33-A		SIHA		CASKI	
	HDACi 1,2	SAHA	HDACi 1,2	SAHA	HDACi 1,2	SAHA	HDACi 1,2	SAHA
	124,8	100,5	197,4	253,8	209,5	683,7	149,3	110,5

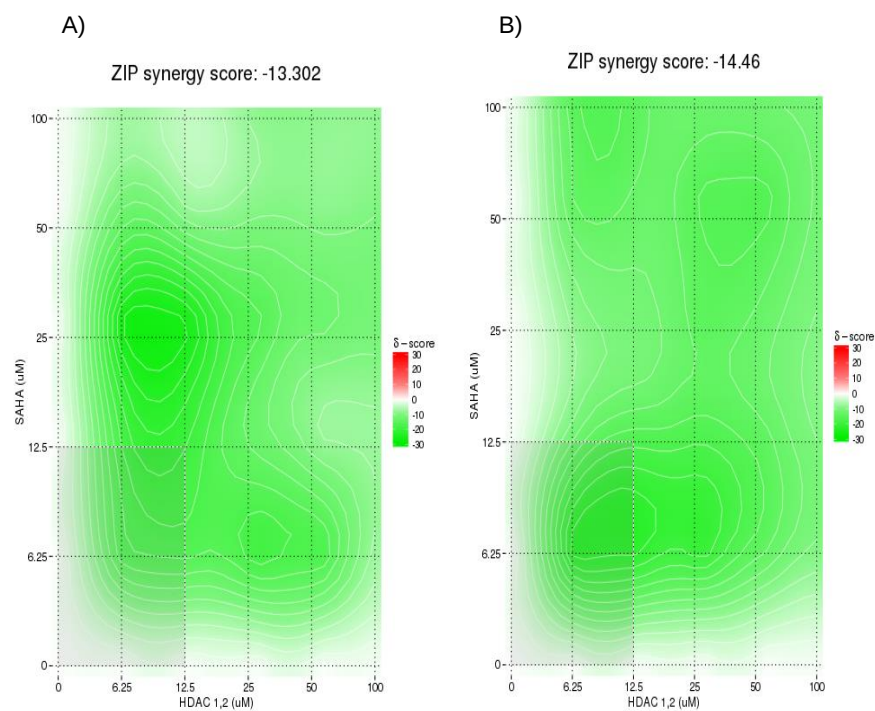
72h								
IC ₅₀	HACAT		C33-A		SIHA		CASKI	
	HDACi 1,2	SAHA	HDACi 1,2	SAHA	HDACi 1,2	SAHA	HDACi 1,2	SAHA
	68,9	28,5	4,41	1,99	32,16	-*	12,85	-*

-* concentração abaixo de 1µM

Após a obtenção dos resultados experimentais de viabilidade celular em monoterapia, foi realizado a combinação dos compostos para verificação do efeito da combinação dos compostos utilizando o software SynergyFinder, onde o programa, através da sua base de dados, cria um score que indica o tipo de ação quando há combinação de dois ou mais compostos. Na linhagem de células imortalizadas (HaCaT) foi observado um score de -13.302, indicando uma ação antagonista dos compostos usados em combinação, identificado nas áreas em verde do mapa, onde os mapas gerados traduzem os dados numéricos dos escores em cores, mostrando através da cor verde áreas que apresentaram escores indicativos de uma ação antagônica e na cor vermelha áreas com ação sinérgica conforme Figura 10.

A princípio, era esperado que os compostos apresentassem ação sinérgica, visto que ambos teriam ação de inibição de HDAC. Estudos de combinação de SAHA e Doxorubicina relataram efeito sinérgico, com o aumento na acetilação da p53 em células cancerígenas cervicais e outras células cancerosas induzidas pelo co-tratamento regulando positivamente o nível de expressão da proteína pró-apoptótica Bad, levando consequentemente à inibição sinérgica do crescimento através da promoção da morte apoptótica (LEE *et al.*, 2014). Entretanto, na combinação dos compostos nas células de câncer infectados com HPV16 (SiHa), foi apresentado um score de -14.46, indicando uma ação antagonista dos compostos usados em combinação nas linguagens tumorais, indicando uma ação semelhante nas duas linhagens, o que pode não ser interessante, visto que os compostos apresentaram ação sobre as células de câncer associado ao HPV, ao mesmo tempo que apresentam ação em linhagem não tumoral. Esse resultado pode ser explicado devido a HDAC estarem trabalhando na transcrição de outros genes, os estão sendo alterados e levando a diferentes mecanismos celulares. Para uma melhor conclusão desse resultado é necessário realizar mais estudos voltados a proteômica e redox celular completo aumentando e diminuindo a expressão dos genes.

Figura 16. Análise gráfica fornecida pelo SinergFinder da viabilidade da linhagem celular HaCat (A) e SiHa (B) frente ao tratamento com os compostos HDACi e SAHA.



5. CONCLUSÃO

A carcinogênese cervical é um processo de múltiplos passos com o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas na célula hospedeira. Essas alterações envolvem alterações em oncogenes e genes supressores de tumor. Dentre elas, a acetilação das histonas é um processo regulado pelas histonas deacetilases (HDAC) e histonas acetiltransferases (HAT), e desempenha importante papel na regulação epigenética, permitindo o controle da expressão gênica. Todavia tem se notado uma superexpressão de HDAC em diversos tipos de câncer, inclusive no colo do útero. Como dito anteriormente, estudos indicam que os inibidores de HDAC atuam reduzindo o desenvolvimento do tumor, sendo usados isoladamente ou em combinação com outras drogas. Dessa forma, viu-se a importância de um estudo mais aprofundado para avaliar a atividade de molécula recém sintetizada de HDACi de histona deacetilase 1,2 comparado o fármaco comercial Vorinostat® (SAHA), que também inibe essa mesma classe de HDAC, avaliando comparativamente seu efeito ou em sinergismo em células de câncer cervical associado ao HPV 16 (SiHa e Caski) e respectivos controles celulares – linhagem celular de câncer cervical negativa para HPV (C33-A) e queratinócito normal de pele espontaneamente imortalizado (HaCaT).

Os resultados obtidos indicaram que o tratamento de 24 horas com HDACi 1,2 e SAHA são pouco efetivos nas linhagens testadas, enquanto que os experimentos com tratamento em 72h demonstraram maiores efeitos citotóxicos em todas as linhagens. Os experimentos com tratamento com HDACi 1,2 em linhagem de câncer cervical associado ao HPV16 (72 horas) foi mais citotóxico, quando comparado com as células não tumorais.

O tratamento com SAHA nas mesmas concentrações, em 72 horas, também demonstrou maior citotoxicidade frente às células não tumorais. Entretanto, tanto o tratamento de HDACi 1,2 e SAHA nas células não tumorais e células de câncer cervical HPV negativo demonstraram ser citotóxicos, não apresentando exclusividade para células de câncer cervical associado com HPV16. Porém é possível analisar uma maior citotoxicidade em ambas moléculas referente às células associadas com HPV16, todavia os ensaios a fim de ser avaliar o sinergismo entre os dois compostos, conforme descrito nos objetivos iniciais, não demonstraram os efeitos esperados, apresentando um efeito antagônico nas linhagem de célula não tumoral e tumoral infectada com HPV16. Importante ressaltar, que para uma melhor conclusão quanto a avaliação do mecanismo de apoptose da nova molécula de HDACi 1-2 mostra-se necessário a realização de ensaios futuros de proliferação celular, citometro de fluxo e anexina V, afim de aprofundar os efeitos do composto, verificando a capacidade antitumoral *in vitro* desses compostos para o câncer cervical associado ao HPV.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; *et al.* **The molecular cell biology**. 4th. ed. New York: Garland Science, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- APARICIO, A.; *et al.* LINE-1 methylation in plasma DNA as a biomarker of activity of DNA methylation inhibitors in patients with solid tumors. **Epigenetics**, v.4, n.3, p.176-184, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19421002/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- ARBYN, M.; *et al.* Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e191–e203, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31812369/>. Acesso em: 19 jul. 2023.
- BOURNINE, L. *et al.* Evaluation of the cytotoxic and cytostatic activities of alkaloid extracts from different parts of Peganum harmala L. (Zygophyllaceae). **European Journal of Integrative Medicine**, v.9, p.91-96, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22147232/>. Acesso em: 02 nov. 2023.
- BRADNER, J. E.; *et al.* Chemical phylogenetics of histone deacetylases. **Nat. Chem. Biol.**, v. 6, p. 238–243, 2010.
- BYCHKOVSKY, B. L.; *et al.* Cervical cancer control in Latin America: A call to action. **Cancer**, v. 122, n. 4, p. 502–514, 2016. DOI: 10.1002/cncr.29813. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26670695/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- BAKER, C. C. *et al.* Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **J Virol**, v.61, p.962–971, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3029430/>. Acesso em: 05 nov. 2023.
- CHENG, C. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel thioquinazolinone-based 2-aminobenzamide derivatives as potent histone deacetylase (HDAC) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.173, p.185-202, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31003060/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- MARTEL, C. de; *et al.* Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31862245/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- FASS, D.M.; *et al.* Histone acetylation and deacetylation. *In*: MEYERS, R. A. (ed.). **Reviews in cell biology and molecular medicine**. 2. ed. 2012. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/278306886_Encyclopedia_of_Molecular_Cell_Biology_and_Molecular_Medicine. Acesso em: 20 jul. 2023.

GIBBS, W. W. Além do DNA. **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 16, Edição Especial, Genoma: o código da vida, p. 44-51, 2007.

GLOBAL OBSERVATORY OF CANCER (GLOBOCAN). [Site organizado pela Organização Mundial da Saúde e pela Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC)]. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/>. Acesso em: 18 jul. 2023.

GRAHAM, S. Human papillomavirus: Gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future. Microbiol.**, v. 5, p. 1493–1506, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.10.107>. Acesso em: 19 de julho de 2023.

GUPTA, S. M.; MANIA-PRAMANIK, J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 28, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31014351/>. Acesso em: 20 de julho de 2023.

GURVICH, N. *et al.* Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. **Cancer Res.**, v. 64, p. 1079–1086, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0799.

HAIGIS, M. C.; SINCLAIR, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 5, p. 253–295, 2010.

HERFS, M. *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, p. 10516–10521, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1202684109.

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. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28823569/> Acesso em: 20 jul. 2023.

HULL, R.; *et al.* Cervical cancer in low and middle-income countries. **Oncology Letters**, v. 20, n. 3, p. 2058–2074, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7400218/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-uterio>. Acesso em: 19 jul. 2023.

JENDOUBI-FERCHICHI, M.; *et al.* Phylogeny and Classification of Human Papillomavirus (HPV)16 and HPV18 Variants Based on E6 and L1 genes in Tunisian Women with Cervical Lesions. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 19, p. 3361–3366, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.12.3361>. Acesso em: 19 de julho de 2023.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.415-428, 2002. Disponível em: <https://pure.johnshopkins.edu/en/publications/the-fundamental-role-of-epigenetic-events-in-cancer-6>. Acesso em: 20 jul. 2023.

KAWAGOE, R.; KAWAGOE, H.; SANO, K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. **Leuk Res**, v.26, p.495–502, 2002. Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca/pdfs/Cancer/ca-3999.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2023.

KHAN, I. *et al.* LC/MS-based polar metabolite profiling identified unique biomarker signatures for cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia using global and targeted metabolomics. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 511, 2019.

LEE, S. J.; *et al.* Transactivation of bad by vorinostat-induced acetylated p53 enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in cervical cancer cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v.46, p. e76, 2014. DOI: 10.1038/emm.2013.149. Acesso em: 06 nov. 2023.

LIU, N.; *et al.* Histone deacetylase inhibitors inducing human cervical cancer cell apoptosis by decreasing DNA-methyltransferase 3B. **Chinese Medical Journal**, v.125, n.18, p.3273-3278, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22964322/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

LIU, S.; *et al.* The function of histone acetylation in cervical cancer development. **Bioscience Reports**, v.39, p.1-11, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9331760/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

LUCKETT, R.; FELDMAN, S. Impact of 2-, 4- and 9-valent HPV vaccines on morbidity and mortality from cervical cancer. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, p. 1332–1342, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2015.1108500>. Acesso em: 19 jul. 2023.

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. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34953977/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

MARKS, P.; BRESLOW, R. Dimetilsulfóxido para vorinostat: desenvolvimento deste inibidor de histona desacetilase como uma droga anticâncer. **Nat Biotechnol**, v.25, p.84-90, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt1272>. Acesso em: 05 nov. 2023.

MCBRIDE, A. A.; WARBURTON, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLoS Pathog.**, v. 13, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006211.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. **Virus Res.**, v. 143, n. 2, p. 19, 2009.

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

MESRI, E. A.; FEITELSON, M. A.; MÜNGER, K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 266–282, 2014. DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático sobre o HPV**: guia de perguntas e respostas para profissionais da saúde. Brasília: Ministério 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 janeiro de 2023.

OKUNADE, K.S. Human papillomavirus and cervical cancer. **J. Obstet. Gynaecol.**, v. 40, p. 602–608, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01443615.2019.1634030?journalCode=ijog20>. Acesso em: 19 de julho de 2023.

OZI, J. M. *et al.* In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Brazilian oral research**, v.25, n.6, p.519-525, 2011.

RASHEED, W.K.; JOHNSTONE, R.W.; PRINCE, H. M. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 16, n. 5, p. 659-678, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535906/> . Acesso em: 20 de jul. de 2023.

RIVOIRE, W. A.; CORLETA, H. V. E.; BRUM, I. S. Molecular biology of cervical cancer.

Ponto de Vista: Rev. Bras. Saude Mater. Infant., v. 6, n. 4, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-38292006000400012>. Acesso em: 02 de nov. de 2023.

SCHIFFMAN, M.; CLIFFORD, G.; BUONAGURO, F. M. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. **Infect. Agent. Cancer**, v. 4, p. 1–8, 2009. DOI: 10.1186/1750-9378-4-8.

SEGRE, C. V.; CHIOCCA, S. Regulating the regulators: the posttranslational codemof class I HDAC1 and HDAC2. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2011, 690848–690862, 2011.

SERRANO-OLVERA, A.; CETINA, L.; CORONEL, J.; DUEÑAS-GONZÁLEZ, A. Emerging drugs for the treatment of cervical cancer. **Expert Opin. Emerging Drugs**, v.20, n.2, p.1-18, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25578210/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

TEKALEGN, Y. *et al.* **High parity is associated with increased risk of cervical cancer: Systematic review and meta-analysis of case–control studies.** *Women's Health*, 2022.

TSANG, S.H. *et al.* Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. Durability of crossprotection by different schedules of the bivalent HPV vaccine: the CVT trial. **J Natl Cancer Inst.**, v. 112, n. 10, p. 1030-1037, 2020. DOI: 10.1093/jnci/djaa010.

WAWRUSZAK, A.; *et al.* Vorinostat (SAHA) and breast cancer: an overview. **Cancers (Basel)**, v.13, n.18, p.4700, 2021. doi: 10.3390/cancers13184700. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34572928/>. Acesso em: 03 nov. 2023.

WILLIAMS, V. M.; *et al.* integration and carcinogenesis: Putative roles for inflammation and oxidative stress. **Future Virol.**, v. 6, p. 45–57, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fvl.10.73>. Acesso em 19 de julho de 2023.

WITT, O.; *et al.* HDAC family: What are the câncer relevant targets? **Cancer Lett.**, v. 277, p. 8–21, 2009.

ZHANG, S.; XU, H.; ZHANG, L.; QIAO, Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 32, p. 720–728, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7797226/>. Acesso em: 20 jul. 2023.