

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”



**Reanálise do sequenciamento de célula única do câncer cervical
HPV positivo como estratégia para identificação de novas
abordagens terapêuticas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu (IBB), para a
obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós Graduação em Biologia Geral e
Aplicada.*

Aluna: Laíza Brugnerotto – Graduada em Física Médica - Univ. Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella - Univ. Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional- Setor: Morfologia.

Laboratório: Laboratório de Biologia do Câncer e Interações *In Vitro* (ICB Lab), Setor Morfologia, IBB/UNESP.

Botucatu - 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”



**Reanálise do sequenciamento de célula única do câncer cervical
HPV positivo como estratégia para identificação de novas
abordagens terapêuticas**

Mestranda: Laíza Brugnerotto

Orientadora: Prof^a. Dr^a Flávia Karina Delella

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu (IBB), para a
obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós Graduação em Biologia Geral e
Aplicada.*

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Brugnerotto, Laíza.

Reanálise do sequenciamento de célula única do câncer cervical HPV positivo como estratégia para identificação de novas abordagens terapêuticas / Laíza Brugnerotto. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Flávia Karina Delella

Capes: 20100000

1. Biologia computacional. 2. Colo uterino - Câncer.
3. *Papillomaviridae*. 4. Medicamentos - Desenvolvimento.
5. Análise da Expressão Gênica de Célula Única.

Palavras-chave: Biologia computacional; Câncer cervical; Papilomavírus humano; Predição de fármacos; SCRNA-seq.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LAÍZA BRUGNEROTTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 29 dias do mês de fevereiro do ano de 2024, às 08:30 horas, no(a) Sala da Pós Graduação, Central de Aulas, IBB/UNESP, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LAÍZA BRUGNEROTTO, intitulada **Reanálise do sequenciamento de célula única do câncer cervical HPV positivo como estratégia para identificação de novas abordagens terapêuticas**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. FLAVIA KARINA DELELLA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ROBSON FRANCISCO CARVALHO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. LUCAS TADEU BIDINOTTO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Humana e Experimental / Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. FLAVIA KARINA DELELLA 

Documento assinado digitalmente

FLAVIA KARINA DELELLA
Data: 09/03/2024 18:51:26-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Agradecimentos

Aos meus pais e familiares, que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado em toda a minha trajetória, dando suporte e carinho essenciais para que eu chegasse até aqui. Mesmo estando distante, eu sempre senti a presença de vocês. Eu amo vocês.

Aos meus colegas de laboratório, *Caxali, Mirian, Taína, Beatriz, Maria* e outros que me ajudaram em burocracias, questões acadêmicas e estudos, mas principalmente como ombro amigo que eu tanto precisei durante este mestrado. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido.

A minha orientadora, *Flávia Karina Delella*, que foi como uma mãe durante esses dois anos de trabalho, sendo sempre muito prestativa e carinhosa com nós alunos, mesmo em momentos difíceis. Tenho muita sorte e honra de poder trabalhar com você.

Aos meus amigos, *Leonardo, Ana Júlia* e tantos outros pela companhia e atenção quando eu mais precisei. Vocês tornaram meus dias ruins um pouco melhores e sou eternamente grata por ter vocês na minha vida.

Aos membros da banca, professores *Robson Carvalho e Lucas Bidinotto*. Obrigada por fazerem parte deste evento tão importante e por todo conhecimento e aprendizado compartilhado nele.

As minhas colegas de trabalho, *Victória e Sarah*, com as quais aprendi muito sobre o mundo dos sequenciamentos e da biologia computacional. Agradeço de coração por toda atenção e auxílio durante este trabalho.

Ao Programa de Biologia Geral e Aplicada e a CAPES pela oportunidade e fomento concedidos para minha formação e realização do mestrado.

Enfim, agradeço com muito carinho a todos os envolvidos e a todos que me aguentaram nessa jornada, tenho certeza que também não foi fácil para vocês.

Epígrafe

Se você quiser;
se você se esforçar;
se você treinar;
se você entrar de cabeça;
se você se concentrar:
nada garante que você vai conseguir.
(Craque Daniel)

Sumário

1.	Introdução	11
	1.1. Câncer de colo de útero: aspectos epidemiológicos e classificação tumoral	11
	1.2. Tratamentos.....	13
	1.3. Fatores de risco no desenvolvimento do câncer de colo de útero.....	14
	1.4. Vacinação Contra o HPV	16
	1.5. Análises computacionais e sequenciamento de RNA de célula única nos estudos sobre o câncer	18
2.	Justificativa e Hipótese	21
3.	Objetivos	22
	3.1. Objetivo Geral.....	22
	3.2. Objetivos Específicos.....	22
4.	Artigo Científico	22
5.	Conclusões	41
6.	Referências Bibliográficas Gerais.....	42
7.	Apêndice: Histórico escolar e atividades complementares desenvolvidas	50
8.	Material Suplementar.....	53

Lista de Abreviaturas

AAHS	Sulfato de Hidroxifosfato de Alumínio Amorfo
AG18	Tirfostina-AG-18
ASO4	Hidróxido de Alumínio e 3-O-Desacil-4' Monofosforil Lipídio A
Bulk RNA-seq	Sequenciamento de RNA em Massa
CA_HP	Câncer Cervical, HPV Positivo
CC	Câncer Cervical
CEC	Carcinoma Espinocelular
CopyKat	Copynumber Karyotyping of Tumors
CQ	Controle de Qualidade
CRT	Quimiorradiação Concomitante
DEGs	Genes Diferencialmente Expressos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECM	Matriz Extracelular
FAC	Fluxo de Ativação de Células por Seleção
FDA	Food and Drug Administration
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
GEO	Gene Expression Omnibus
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL_HP	Pré-Lesão, HPV Positivo
IA	Estágio I, subtipo A
IB	Estágio I, subtipo B
Ig	Imunoglobulinas
IIA	Estágio II, subtipo A
IIB	Estágio II, subtipo B
III	Estágio III
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Estágio IV

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto)
LCM	Microdissecção de Captura a Laser
LCR	Long Control Region (Região de Controle Longo)
m-AMSA	Amsacrina
N_HP	Tecidos cervicais normais, HPV positivo
N_NO_HP	Tecidos cervicais normais, HPV negativo
NF-kappa B	Fator nuclear kappa B
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ORF	Open Reading Frames (Fases de Leitura Aberta)
PCA	Principal Component Analysis
PI3K-Akt	Fosfatidilinositol-3-quinase-AKT
PS	Pterostilbeno
RNA	Ácido Ribonucleico
SAGE	Strategic Advisory Group of Experts on Immunization
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA de Célula Única
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
URR	Upstream Regulatory Region
VLPs	Partículas Semelhantes ao Vírus
WHO	World Health Organization

Resumo

O câncer cervical (CC) é predominante em mulheres de países com baixo índice de desenvolvimento, estabelecendo este como o quarto câncer mais comum atualmente. Os fatores de risco incluem uso prolongado de contraceptivos, alto número de gestações e de parceiros sexuais, porém o mais predominante é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), vírus sexualmente transmissível. Os HPVs mais propensos a desenvolverem a doença são os 16 e 18, sendo denominados como HPVs de alto risco. O tratamento inicial para CC é a cirurgia, mas em estágios mais avançados da doença, o padrão de terapia é a quimiorradioterapia concomitante à base de cisplatina. Como existe a grande possibilidade de resistência/intolerância à cisplatina, outros fármacos vêm sendo estudados como novas alternativas de tratamento e também como combinação para aperfeiçoamento da resposta. Entretanto, mesmo com estes avanços, as taxas de cura de CC ainda permanecem baixas, principalmente em casos de CC recorrente e associados à metástase. Neste cenário, a biologia computacional vem sendo utilizada como forma de analisar comportamentos, identificar e validar possíveis biomarcadores terapêuticos por meio de ferramentas, plataformas e bancos de dados de pacientes disponíveis *online*, a fim de trazer melhorias no âmbito oncológico através da medicina de precisão e predição de novas drogas. Portanto, nosso estudo adaptou uma metodologia que proporciona uma pesquisa a nível celular da histologia e expressão gênica do tecido tumoral de CC HPV positivo, através da análise de sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq), para identificar possíveis genes marcadores tumorais e novas potenciais drogas para o tratamento personalizado do CC.

Palavras-chave: câncer cervical; câncer colo de útero; papilomavírus humano; scRNA-seq; biologia computacional; predição de fármacos.

Abstract

Cervical cancer (CC) is predominant in women from countries with a low rate of development, establishing it as the fourth most common cancer today. One of the biggest risk factors is human papillomavirus (HPV) infection, as well as other elements related to sexual intercourse and the use of contraceptives. The HPVs most likely to develop the disease are 16 and 18, which are called high-risk HPVs. The initial treatment for CC is surgery, but in more advanced stages of the disease, the standard of therapy is concomitant cisplatin-based chemoradiotherapy. As there is a great possibility of resistance/intolerance to cisplatin, other drugs have been studied as new treatment alternatives and also as combinations to improve the response. However, even with these advances, CC cure rates remain low, especially in cases of recurrent CC and metastases. In this scenario, computational biology has been used as a way to analyze behaviors, identify and validate possible therapeutic biomarkers through tools, platforms and databases available online, to bring improvements in the oncological field through precision medicine and prediction of new drugs. Therefore, our study adapted a methodology that provides research at the cellular level on the histology and gene expression of HPV-influenced CC tumor tissue, through single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis, to identify possible tumor marker genes and consequently new potential drugs for personalized treatment in CC.

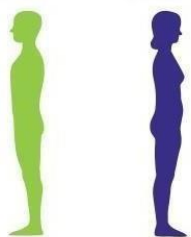
Keywords: cervical cancer; human papillomavirus; scRNA-seq; computational biology; drug prediction.

1. Introdução

1.1. Câncer de colo de útero: aspectos epidemiológicos e classificação tumoral

O câncer é uma doença mundialmente conhecida por sua incidência e agressividade, assim como pelos desafios atribuídos à comunidade científica de saúde frente aos estudos que visam tratamento e melhora no prognóstico e na qualidade de vida dos pacientes. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se a ocorrência de 704 mil novos casos de câncer no Brasil, no período triênio de 2023-2025 (INCA, 2022).

Em relação às mulheres, atualmente o câncer de colo de útero, também conhecido como câncer cervical (CC), é o quarto mais prevalente, ficando atrás de cânceres como mama, colorretal e pulmão (BHATLA *et al.*, 2021). O número de casos de CC é desproporcionalmente maior em países de baixo desenvolvimento, em razão ao menor acesso aos processos de prevenção e diagnóstico (LAVIGNE *et al.*, 2017). No Brasil (Figura 1), estima-se a ocorrência de 17.010 novos casos para cada ano do triênio 2023-2025, correspondendo a um risco estimado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%		Homens	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*, segundo o INCA, 2022. Imagem retirada de INCA, 2022.

O colo do útero é formado por epitélio escamoso estratificado que reveste a exocérvice como uma continuação do epitélio vaginal e o epitélio colunar secretor de muco, típico do canal endocervical. A junção entre a população de células da exocérvice e do epitélio colunar é denominada junção escamocolunar e nela está presente a prevalência da transformação neoplásica viral. O carcinoma espinocelular (CEC), ou também conhecido como carcinoma de células escamosas, é o tumor que surge na exocérvice e abrange cerca de 85% dos casos de

CC. Já os tumores que surgem na endocérvice, são propícios a serem adenocarcinomas (histologia não escamosa) e correspondem a aproximadamente 15% desse tipo tumoral, sendo associados com um pior prognóstico (Figura 2) (SMALL *et al.*, 2017; DEVINE *et al.*, 2019).



Figura 2: Histologia do colo do útero mostrando a exocérvice (seta contínua), endocérvice (seta tracejada), a junção entre essas duas regiões (círculo tracejado) e nódulos de Naboth (**). Disponível em <https://histologyguide.com/slideview/MHS-207-cervix/18-slide-1.html>.

De acordo com a *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO), o CC é dividido em 4 estágios: estágio 0 (inicial), no qual há células cancerosas na região cervical, porém estas não se espalharam para outras regiões uterinas; estágio IA (1-2) e IB (1-3), em que o câncer prevalece dentro do colo do útero; estágio IIA (1-2) e IIB, quando as células cancerosas começam a se espalhar em tecidos adjacentes ao inicial; estágio III, caracteriza que o câncer já se espalhou pela região pélvica e estágio IV quando o câncer está em processo de metástase (BEDFORD, 2009). Geralmente, as pacientes são assintomáticas nos primeiros estágios, podendo apresentar alguns sintomas como sangramento vaginal irregular ou intenso e após o coito. No caso de estágios mais avançados, as mulheres comumente apresentam dor na região lombar e lesões pélvicas (STUMBAR *et al.*, 2019).

1.2. Tratamentos

Os tratamentos para CC dependem do estágio da doença quando diagnosticada, incluindo terapias como ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia e a combinação entre essas três modalidades (NAGA CH *et al.*, 2018). Segundo a classificação FIGO 2018, a cirurgia é indicada para estágios iniciais como IA (1-2), IB (1-2) e IIA1, sendo que a radioterapia também pode ser escolhida como tratamento primário nos estágios IB2 e IIA1, dependendo dos aspectos tumorais de cada paciente. Os estágios mais avançados, IB3 e IIA2, requerem radioterapia adjuvante seguida da cirurgia, pois o risco de recorrência é maior. Porém, como essa dualidade aumenta a morbidade e diminuiu a qualidade de vida da mulher, a quimiorradiação concomitante (CRT) à base de platina foi considerada tratamento padrão para lesões localmente avançadas, incluindo radiação externa e braquiterapia intracavitária (BHATLA *et al.*, 2018).

Na quimioterapia, a cisplatina vem sendo considerada o agente mais ativo no tratamento de CC avançado. Alguns pesquisadores demonstraram que a combinação de cisplatina com outros fármacos podem melhorar a taxa de resposta e conseqüentemente a sobrevida dos pacientes. O estudo GOG-179 apresentou que a cisplatina combinada com topotecano possui uma vantagem significativa na sobrevida quando comparada com o agente sozinho (MARQUINA *et al.*, 2018; LONG *et al.*, 2005). Outras combinações como cisplatina/paclitaxel e bevacizumabe também podem ser aplicadas para pacientes com recorrência, persistência ou metástase (SCHUBERT *et al.*, 2023). Porém, mesmo com sua alta indicação como tratamento, a cisplatina está associada há várias complicações ligadas a dose e principalmente a resistência do tumor, muitas vezes devida a alterações nos mecanismos moleculares e microambiente tumoral (BHATTACHARJEE *et al.*, 2022a). A carboplatina também entra como um agente anticancerígeno para CC e estudos recentes demonstraram que a combinação de carboplatina com paclitaxel e bevacizumabe possui uma eficácia comparável a cisplatina, além de mostrar menos efeitos colaterais (SCHUBERT *et al.*, 2023).

1.3. Fatores de risco no desenvolvimento do câncer de colo de útero

Evidências reunidas na literatura mostram que os fatores de risco relacionados ao CC variam entre tabagismo, uso prolongado de contraceptivos, múltiplas gestações, número de parceiros sexuais e idade da primeira relação e gestação. Porém, o fator predominante é a infecção por papilomavírus humano (HPV), uma infecção viral sexualmente transmissível muito comum, sendo 12% de mulheres ao redor do mundo diagnosticadas com HPV positivo. Além disso, o HPV também é considerado agente causador da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (FANG *et al.* 2014; JOHNSON *et al.*, 2019; PURUT; UÇKAN, 2023).

Os HPVs são pequenos vírus não envelopados de simetria icosaédrica, com capsídeos compostos por 72 capsômeros, com genoma circular de fita dupla e um tamanho estimado de 8 pares de quilobases (ARANDA-RIVERA *et al.*, 2021; TOMMASINO, 2014; YOUSEFI *et al.*, 2022). O genoma do HPV de alto risco (como o HPV16 e o HPV18) é organizado em oito regiões, conhecidas por fase de leitura aberta (ORF, da sigla em inglês *Open Reading Frames*), que são separadas em três partes: região precoce, composta por seis ORFs (genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7); região tardia, formada pelas ORFs L1 e L2 e a região de controle longo (LCR) ou região reguladora *upstream* (URR) (PAL; KUNDU, 2020). O início do ciclo viral (Figura 3) é dado pela transcrição de proteínas reguladoras como a E1, responsável por mediar a replicação e transcrição viral e a E2 que também desempenha um papel na transcrição, além de aumentar a especificidade de E1 para sua sequência de DNA alvo (VASHISHT *et al.*, 2019; ARANDA-RIVERA *et al.*, 2021; YOUSEFI *et al.*, 2022). A proteína E4 é expressa tardiamente e contribui na produção e liberação de vírions, tendo um papel importante na alteração da matriz intracelular (VASHISHT *et al.*, 2019; DE CAMPOS FERRAZ *et al.*, 2012). As proteínas E5, E6 e E7 são oncoproteínas que modificam as vias de sinalização e fazem a manutenção do genoma viral, facilitando a evasão imune e o desenvolvimento do tumor maligno (VASHISHT *et al.*, 2019; ARANDA-RIVERA *et al.*, 2021; YOUSEFI *et al.*, 2022).

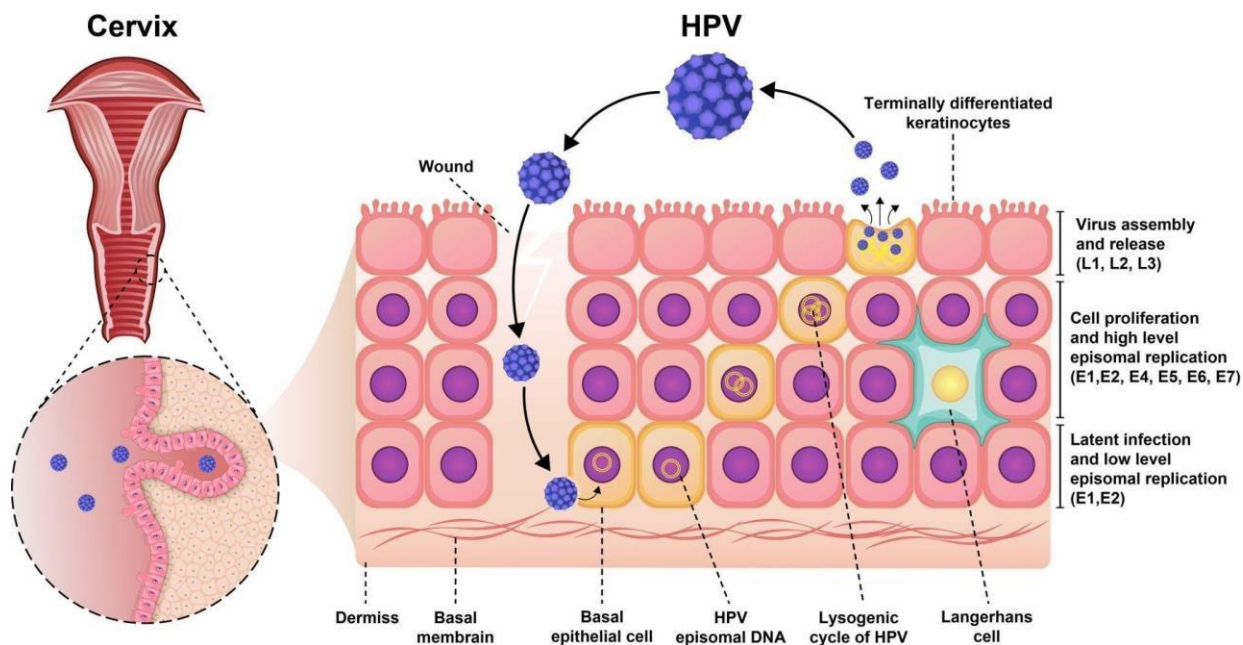


Figura 3: Patogênese do HPV no colo de útero. Imagem extraída de YOUSEFI et al., 2022. Disponível em <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.805695/full>.

Através de estudos, foram identificados cerca de 200 tipos deste vírus, sendo 15 deles diretamente ligados ao desenvolvimento do CC, denominados em categorias de alto e baixo risco oncogênico. Os altos geralmente estão ligados ao crescimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), neoplasias invasoras e constituem os vírus de numeração HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 82 (DE CAMPOS FERRAZ *et al.*, 2012; MANINI; MONTOMOLI, 2018). Alguns estudos demonstraram que os HPVs oncogênicos auxiliam em seis alterações cancerígenas estabelecidas por *hallmarks of cancer*, como sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento, ativação da invasão tecidual e metástase, induzindo a imortalidade replicativa, angiogênese e resistência a apoptose (HOPPE-SEYLER *et al.*, 2018; HANAHAN, 2022). A oncogênese ocorre pela persistência da infecção a longo prazo, devido a seu poder de escape das respostas do sistema imunológico e pela desregulação da expressão gênica da célula hospedeira, ocasionada pela interação e comportamento do genoma viral em seu núcleo (CRICCA *et al.*, 2009; DELLA FERA *et al.*, 2021). Em geral, 90% dos pacientes possuem HPV restrita à camada intraepitelial da mucosa e não progridem para um câncer, tendo eliminação inata e humoral em poucos meses após a infecção. Porém, 10% ainda dispõem de infecção persistente e

consequentemente um possível desenvolvimento cancerígeno em 1% desses indivíduos (WANG, R. *et al.*, 2020).

Entre os tipos de câncer, o CC é o mais associado ao HPV, sendo que 95% dos casos ocorrem em pacientes HPV positivo, principalmente aquelas infectadas por HPV16 e HPV18, que são responsáveis por cerca de 70% dos CC mundialmente, sendo 50% e 20% respectivamente (WILLIAMSON, 2023; MONTEIRO *et al.*, 2021). A partir do momento que o vírus infiltra nas células epiteliais, o mesmo começa a produzir E6 e E7, que são oncoproteínas responsáveis pela degradação e inativação de supressores tumorais p53 e pRb, levando a proliferação celular irregular e resistência à apoptose. Por conta disso, há notável superexpressão dessas proteínas no processo de carcinogênese relacionado ao HPV, principalmente o HPV16/18 (MAHMOODI *et al.*, 2019). Uma questão importante que faz o HPV18 ser o segundo tipo mais comum deve-se pelo fato de ser dificilmente detectado em lesões pré-cancerosas, com incidência de aproximadamente 5%. Isso ocorre por suas características biológicas, sendo prevalente em tipos de CC menos comuns como adenocarcinomas e carcinomas de pequenas células, além de outros mecanismos únicos envolvidos na carcinogênese do HPV18 (KUSAKABE *et al.*, 2023). Por outro lado, o HPV16 está altamente associado ao carcinoma de células escamosas, sendo o tipo mais frequentemente encontrado em casos de CC HPV positivo (TORNESELLO *et al.*, 2011). Também foi demonstrado que tumores com HPV16 têm maiores chances de espalharem para os gânglios linfáticos e parametriaux em relação ao tumores HPV16 negativos (ZAMPRONHA *et al.*, 2013)

1.4. Vacinação Contra o HPV

Após a infecção, o HPV consegue burlar o sistema imune através de vários mecanismos por conta da lenta resposta imune natural, que induz baixos níveis de síntese de imunoglobulinas (Ig) (WANG, R. *et al.*, 2020). Com isso, os anticorpos produzidos pela resposta natural não são suficientes para prevenir uma reinfecção subsequente de HPV, além de ser muito menor quando comparada a alta soro-resposta obtida após a vacinação. Assim, para manter a proteção ao longo da vida sexual ativa, são necessários níveis maiores e sustentados de Ig que podem ser induzidos através da vacinação (WANG *et al.*, 2020; DE SANJOSÉ *et al.*, 2018).

Os estudos com vacinas para HPV começaram em meados de 1980, após a descoberta do HPV como principal fator de risco do câncer cervical (MARKOWITZ; SCHILLER, 2021). Atualmente, existem 3 tipos de vacinas profiláticas contra o HPV licenciadas e disponíveis no mercado: as de primeira geração, Gardasil e Cervarix, e a de segunda geração, Gardasil-9 (DILLEY *et al.* 2020). Todas as três foram produzidas por partículas semelhantes ao vírus (VLPs) da proteína L1 e feita por tecnologia de DNA recombinante, o que as torna completamente não infecciosas e não oncogênicas, visto que não possuem o DNA viral (BARRA *et al.*, 2019). A Gardasil, também conhecida como vacina quadrivalente (4vHPV), foi produzida pela empresa Merck & Co nos EUA e aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2006 (CASTLE; MAZA, 2016). Esta foi feita a partir de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, além de 225µg de sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo (AAHS) como adjuvante e contém os VLPs dos HPVs 6/11/16/18, que são diretamente ligados ao desenvolvimento de verrugas genitais (YOUSEFI *et al.*, 2022). A Cervarix foi desenvolvida pela GlaxoSmithKline (GSK), na Bélgica, através de células *Trichoplusia ni* infectadas com Baculovírus e 50µg ASO4 como adjuvante (ASO4 é constituído de hidróxido de alumínio e 3-O-desacil-4' monofosforil lipídio A) (SZAREWSKI,2010). Esta vacina contém os VLPs de alto risco dos HPVs 16 e 18 e foi aprovada pela FDA em 2010 (CASTLE; MAZA, 2016). Além dessas duas vacinas citadas, viu-se necessário a produção de uma terceira vacina que fosse eficiente contra outros 5 tipos de HPVs prevalentes na carcinogênese. Com isso, a Merck & Co desenvolveu a Gardasil-9, vacina nonavalente (9vHPV) que contém proteção contra os HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52/58, a qual foi licenciada em 2014 (YOUSEFI *et al.*, 2022).

Todas as vacinas são mais efetivas em homens e mulheres que ainda não foram expostos ao vírus, sendo assim, a intenção é que sejam aplicadas antes de qualquer atividade sexual, tendo como alvo principal os grupos de crianças e adolescentes de 9 a 14 anos (VILLA; RICHTMANN, 2023). Inicialmente, o programa de imunização continha a recomendação de três doses para as vacinas 4vHPV e 2vHPV, num intervalo de 0, 1-2 e 6 meses (WHO, 2014). Porém, alguns estudos de imunogenicidade analisaram que a aplicação de duas doses demonstra resposta de anticorpos não inferior em jovens adolescentes quando comparada com mulheres jovens adultas que receberam 3 doses (MARKOWITZ *et al.*, 2022). Desse modo, a partir de 2016 a recomendação passou a ser de duas doses para meninos e meninas de 9 a 14 anos, num período de 0-6 meses, valendo para todas as vacinas. Indivíduos

com idade ≥ 15 anos devem tomar as três doses num intervalo de 0, 1-2, 6-12 meses (WHO, 2017).

Atualmente, a eficácia de uma dose única das vacinas vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisadores, com o intuito de simplificar a implementação do programa de vacinação e aumentar o encorajamento da população em relação à vacinação (VILLA; RICHTMANN, 2023). Após avaliação de resultados em relação a dose única contra o HPV, a WHO *Strategic Advisory Group of Experts on Immunization* (SAGE) advertiu que esta oferece proteção sólida e comparável ao esquema de duas doses. Com isso, a organização sugere uma nova atualização no esquema de dosagem, em que garotas de 9-14 anos sejam vacinadas com uma ou duas doses, assim como jovens mulheres entre 15-20 anos. Para mulheres maiores de 21 anos, a recomendação passa a ser de apenas duas doses, com um intervalo de 6 meses. Segundo a organização, esse planejamento com dose única tem o potencial de agilizar o objetivo de vacinar 90% das meninas de até 15 anos até 2030 (WHO, 2022).

Uma alternativa encontrada para avançar nas pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento ou de novas vacinas para a prevenção de diferentes tipos de câncer é a utilização de ferramentas e banco de dados online para predição de biomarcadores, pois estes auxiliam na detecção da doença, assim como na melhoria do prognóstico e tratamento (FONG; WINTER, 2012). Os biomarcadores, principalmente na área oncológica, englobam várias classes de biomoléculas como genes, fragmentos de RNA, proteínas entre outros, que podem ser identificados em diversas etapas da carcinogênese (VOLKOVA *et al.*, 2021).

1.5. Análises computacionais e sequenciamento de RNA de célula única nos estudos sobre o câncer

O aumento no número de pesquisas científicas na área de predição de biomarcadores no câncer nos últimos anos veio acompanhado de um grande avanço no uso de ferramentas de bioinformática e em bancos de dados de pacientes para estudos de personalização de tratamentos oncológicos. Esses bancos armazenam dados ômicos (oriundos do genoma, transcriptoma, miRnoma, proteoma etc.) que tornam esta prática bastante acessível, rápida e com alto grau de confiabilidade (XIE *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020).

A primeira técnica de sequenciamento de RNA ocorreu em 1975, abrindo novas oportunidades para os estudos com genética. Em 1995 foi descoberto uma técnica de quantificação dos níveis de expressão gênica usando um micro chip, conhecido por *microarray*. Com o avanço da tecnologia, foi-se desenvolvendo novos métodos que proporcionam menos custos e tempo necessários para geração de dados de expressão com ainda mais qualidade. Conseqüentemente, os conjuntos de dados gerados por sequenciamento são extensos e por isso houve a necessidade da introdução da bioinformática no meio científico, pois através de ferramentas computacionais é possível investigar o significado biológico dos dados gerados (GONDANE; ITKONEN, 2023).

Uma das tecnologias tradicionais mais utilizadas para análise de expressão é o sequenciamento de RNA em massa (*Bulk RNA-seq*). Esta técnica permite determinar a média do tecido estudado, especificando a média de células normais e cancerosas presentes na amostra. Entretanto, ela ignora os traços fenotípicos e funcionais específicos de cada célula presente nos tumores, informação importante principalmente para estudos com predição de drogas para tratamento do câncer (LI *et al.*, 2021).

Com isso, um novo método conhecido como sequenciamento de RNA de células única (scRNA-seq) foi desenvolvido. O primeiro método de célula única foi publicado por Tang *et al.*, 2009 e desde então essa técnica vem sendo cada vez mais aprimorada. Com ela, é possível caracterizar o estado molecular de cada célula tumoral individualmente, analisando a heterogeneidade do tumor e a composição do tipo celular do microambiente tumoral, podendo determinar o resultado da interferência de células anormais em uma infecção, em recidiva do câncer e principalmente na resistência a quimioterápicos e outros medicamentos (DAVIS-MARCISAK *et al.*, 2019; SALIBA *et al.*, 2014).

Para o desenvolvimento da técnica, o primeiro passo é obter uma suspensão de células isoladas de um tecido de interesse e realizar o isolamento de uma célula individual através de diluição limitante, micromanipulação, seleção de células ativadas por fluxo (FACS), microdissecção de captura a laser (LCM) e microfluídica. O protocolo ainda varia de acordo com a pesquisa em questão, porém, devido à alta quantidade de ruído, todos os sequenciamentos devem passar por uma série de procedimentos de controle de qualidade afim de eliminar dados de células de baixa qualidade (células mortas, danificadas ou *multiplets*, que são células que não foram individualizadas corretamente) pois estas possuem pequeno número de leituras e podem causar resultados incertos (CHEN *et al.*, 2019).

Por este método permitir o entendimento sobre a heterogeneidade das células tumorais, progresso do desenvolvimento do tumor, comunicação e interação entre células normais e malignas, entre outros aspectos, a pesquisa com scRNA-seq tem aumentado gradativamente nos últimos anos, tendo um impacto positivo na precisão da detecção e na diminuição dos custos gerados, tornando-se uma importante ferramenta na pesquisa de diversos cânceres (ZHANG *et al.*, 2021). ZHANG e colaboradores (2021) realizaram uma análise transcriptômica de célula única no CC e identificaram fibroblastos associados ao câncer (CAFs) que podem promover progressão tumoral, criando novas perspectivas no prognóstico e tratamento desse câncer. Peng e colaboradores (2019) demonstraram através de análise da trajetória celular que elementos de diversas vias associadas ao tumor de pâncreas e fatores de transcrição foram expressos diferencialmente ao longo do desenvolvimento do câncer, disponibilizando novos possíveis marcadores para predição da resposta imune antitumoral. Obradovic *et al.*, 2021 descobriram uma subpopulação de macrófagos específica do tumor pela regulação positiva de *TREM2*, *APOE* e *CIQ* que podem servir como potenciais biomarcadores prognósticos e terapêuticos para a recorrência de carcinoma renal de células claras. Dessa forma, com uma abordagem científica atualizada e inovadora, o método de scRNA-seq pode trazer contribuições inéditas com foco no melhor entendimento do microambiente tumoral e no delineamento de novas abordagens terapêuticas para diferentes tipos de câncer.

2. Justificativa e Hipótese

Como citado anteriormente, o HPV é o maior fator de risco relacionado ao CC e mesmo com a prevenção contra o vírus através da vacinação, a incidência desse tipo de tumor ainda prevalece alto. Além disso, o microambiente tumoral do CC apresenta resistência ao tratamento com o quimioterápico cisplatina, priorizando o desenvolvimento de novos estudos relacionados com a predição de possíveis drogas para tratamento do CC e possibilitando melhora na qualidade de vida e sobrevida das pacientes.

Neste sentido, a biologia computacional vem ganhando espaço no meio científico, principalmente pelo uso de dados de scRNA-seq e pela oportunidade de explorar questões biológicas da heterogeneidade das células em estudos oncológicos. Com a disponibilização de bancos de dados *online*, é possível analisar outros cenários utilizando os diversos *softwares* e plataformas disponíveis para análise deste tipo de dados. Esse método pode ser considerado complementar aos testes *in vitro* e *in vivo* por sua função de auxílio e validação de resultados, porém se adequando ao princípio dos 3Rs de Russel e Burch (RUSSEL; BURCH, 1992).

Diante disso, espera-se identificar possíveis drogas para tratamento personalizado de CC com influência de HPV, através de biomarcadores biológicos advindos de dados de scRNA-seq disponibilizados em bancos de dados *online* e ferramentas de análise computacional.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Realizar a predição de fármacos para o tratamento de câncer cervical com influência do vírus HPV através do sequenciamento de célula única e de ferramentas da biologia computacional.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar amostras de sequenciamento de RNA de célula única de colo de útero normal e de câncer cervical;
- Integrar e preparar as amostras selecionadas anteriormente para análise de agrupamento celulares;
- Fazer o agrupamento por pares e realizar a diferenciação de expressão gênica nos grupos de células formados;
- Identificar e anotar os tipos celulares definidos através de genes marcadores canônicos;
- Diferenciar células malignas e não malignas dentro do *cluster* de células epiteliais e verificar genes diferencialmente expressos (DEGs) nos subgrupos de células epiteliais malignas;
- Visualizar e denotar os DEGs compartilhados entre os subgrupos de células epiteliais malignas (grupos pré lesão e lesão);
- Submeter a lista de genes *up* expressos na ferramenta L1000FWD para identificação de assinaturas de drogas relacionadas a estes genes específicos;
- Realizar o enriquecimento funcional da lista de genes com alta expressão associados com cada droga específica selecionada;
- Analisar cinco principais vias e ontologias para cada droga, a fim de visualizar eventos biológicos envolvidos no desenvolvimento da carcinogênese e progressão viral;

4. Artigo Científico

Identificação de fármacos para o tratamento do câncer cervical HPV positivo a partir da reanálise do sequenciamento de célula única

**Laíza Brugnerotto¹, Victória Larissa Schimidt Camargo¹, Gabriel Henrique Caxali¹,
Miriam Carolini Esgoti Aal¹, Sarah Santiloni Cury¹, Robson Francisco Carvalho¹,
Flávia Karina Delella¹**

¹Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Botucatu, São Paulo, Brasil

Corresponding Author:

Flávia Karina Delella

250 Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin St, Botucatu, SP, Brazil. 18618-689

Phone: +55 14 3880 0500

e-mail: flavia.delella@unesp.br

Resumo

O câncer de colo de útero, também conhecido como câncer cervical (CC), é o quarto tipo mais comum entre mulheres e é predominantemente estabelecido em países pouco ou subdesenvolvidos. O CC tem como seu maior fator de risco a infecção por papilomavírus humano (HPV) de alto risco, principalmente HPV16 e HPV18. Como tratamento, a cirurgia é indicada para estágios iniciais da doença e a quimiorradioterapia concomitante à base de cisplatina é considerada tratamento padrão para estágios mais avançados de CC. Ainda assim, alguns pacientes demonstram intolerância e/ou resistência à cisplatina e as taxas de cura para recidivas e metástases ainda permanecem baixas, ressaltando a necessidade de estudos para identificação de novos fármacos para combinação ou substituição da droga utilizada. Com isso, a tecnologia computacional vem sendo bastante explorada na área da oncologia, especialmente na identificação de biomarcadores, investigação de características, interações tumorais e predição de fármacos. Neste cenário, nosso trabalho utilizou ferramentas da biologia computacional e dados de sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq) depositados em repositórios *online*, com o objetivo de identificar potenciais alvos para tratamento e prevenção do CC. Em vista disso, conseguimos detectar os compostos amsacrinae AG-18 como possíveis drogas para serem investigadas como tratamento personalizado para pacientes com CC HPV positivo, além de inferir dois compostos naturais, retinol e pterostilbeno, como potenciais alvos preventivos em caso de pacientes com pré-lesões cervicais influenciados pelo vírus HPV.

Palavras-chave: câncer colo de útero; papilomavírus humano; scRNA-seq; biologia computacional; predição de fármacos.

Introdução

O câncer de colo de útero, também denominado como câncer cervical (CC), é a 4ª doença maligna mais frequente no gênero feminino (COHEN *et al.*, 2019). Em 2023, o CC foi indiciado como o terceiro tipo de câncer mais incidente em mulheres brasileiras segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), com estimativa de 17.010 novos casos anuais no triênio 2023-2025 (INCA, 2022). A incidência e mortalidade do CC varia de acordo com a localidade, porém cerca de 85% dos casos ocorrem em países pobres ou subdesenvolvidos em comparação a regiões desenvolvidas (LIN. *et al.*, 2021). O CC é classificado em dois tipos histológicos principais, carcinoma espinocelular e adenocarcinoma, com porcentagem de casos de 72,6% e 21,8%, respectivamente (KUSAKABE *et al.*, 2023).

O tratamento para CC varia de acordo com o estágio da doença. Para estágios iniciais, são utilizadas cirurgias menos invasivas e preservadoras da fertilidade, enquanto para estágios localmente avançados a quimiorradioterapia concomitante à base de cisplatina e braquiterapia têm sido consideradas tratamentos padrão para CC (FLEISCHMANN *et al.*, 2021; GHEORGHE *et al.*, 2022). Outros quimioterápicos, como paclitaxel e docetaxel também são comumente utilizados em combinação com a cisplatina (MITRA; ELANGO VAN, 2021). Devido a não inferioridade da combinação de carboplatina/paclitaxel em comparação com cisplatina/paclitaxel, esta também foi adicionada às diretrizes como agenteradiossensibilizante para pacientes com resistência/intolerância à cisplatina (KOH *et al.*, 2019; LIONTOS *et al.*, 2019). Mesmo com os avanços na melhoria do tratamento quimioterápico, o CC ainda apresenta baixas taxas de cura, sustentando a importância de novos estudos sobre possíveis alvos para tratamento de precisão em pacientes com esse tipo tumoral específico (MANRRIQUEZ *et al.*, 2022).

O papilomavírus humano (HPV) de alto risco é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CC. A infecção e integração do genoma do vírus nas células epiteliais hospedeiras são os processos iniciais na progressão neoplásica cervical (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2019). Até o momento, 15 subtipos de HPV são considerados de alto risco, porém os HPVs 16 e 18 são os que possuem maior capacidade neoplásica e são parte de aproximadamente 70% dos casos de CC no mundo (LI; XU, 2018). As primeiras variações ocorrem através das oncoproteínas E6 e E7, que inibem as proteínas anti-tumorais p53 e pRb, causando alterações nos mecanismos de reparação do DNA e

consequentemente ajudando no processo de proliferação das células cancerígenas (LONGWORTH; LAIMINS, 2004).

Devido a isso, em 2006, foi desenvolvida a primeira vacina contra o HPV, sendo recomendada para jovens e mulheres para auxiliar na prevenção do CC. Em seguida, foram desenvolvidas mais duas vacinas com o intuito de cobrir todos os subtipos de HPV de alto risco, sendo aprovadas para distribuição pela organização *Food and Drug Administration* (KITUR *et al.*, 2022). Apenas da recomendação da vacinação para todas as regiões ao redor do mundo, a cobertura vacinal global ainda permanece baixa, por questões da não conclusão do esquema de vacinação, altos custos, pouca divulgação e até preconceito da população, dificultando o processo de combate contra o vírus e ao CC. (BERKOWITZ *et al.*, 2015; SHAPIRO, 2022; MARIANI *et al.*, 2017).

Nesse âmbito, a pesquisa na área oncológica e de medicina de precisão tem se beneficiado dos avanços na tecnologia de dados ômicos para investigar o microambiente tumoral e descobrir novas drogas anticâncer (LI *et al.*, 2020). Na última década, foram introduzidas técnicas de sequenciamento de célula única com o objetivo de compreender melhor a heterogeneidade tumoral à nível celular, para estudar processos envolvidos na recidiva do câncer e na resistência a medicamentos terapêuticos (ROSATI; GIORDANO, 2022). Com isso, nosso estudo visou analisar dados de sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq) disponíveis em *databases* online, com o intuito de investigar potenciais genes alvos e prever novos fármacos que poderão ser utilizados em tratamentos personalizados.

Material e Métodos

Escolha dos dados de scRNA-seq

A busca por dados de scRNA-seq foi realizada na plataforma *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (CLOUGH; BARRETT, 2016), onde selecionamos o estudo de Guo *et al.*, 2023 (número de acesso = GSE208653), que contém nove amostras de tecidos de colo de útero. As amostras foram processadas através do pacote Seurat (v4.0.6) (<https://satijalab.org/seurat/>) na linguagem R pela interface Rstudio (v4.2.2) (HAO *et al.*, 2021).

Preparação e controle de qualidade dos dados de scRNA-seq

Para identificar e eliminar células mortas ou gotas vazias (vesículas que não incorporaram nenhuma célula durante a sua formação), foi calculada a métrica de controle de qualidade (CQ) mitocondrial, a qual calcula a porcentagem de *counts* provenientes de um conjunto de genes. Células com menos de 200 genes ou mais de 3000 genes detectados e para as quais a expressão gênica mitocondrial total excedeu 10% foram removidas. Anormalização foi realizada através do método “*LogNormalize*” e a seleção genes com alta variação célula-célula foi realizada através da função *FindVariableFeatures* no pacote Seurat, retornando 2000 genes por amostra.

Concatenação de dados, agrupamento, visualização e identificação

Para analisar as nove amostras encontradas, foi realizado uma mescla das matrizes de contagem bruta dessas amostras através do método *merge* do Seurat, criando um novo objeto com a matriz de contagem bruta resultante (STUART *et al.*, 2019). Para identificar as variáveis principais foi realizado o método *Principal Component Analysis* (PCA) e a visualização dos resultados foi feita através do *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP). As identidades dos tipos celulares foram baseadas na expressão de genes marcadores celulares canônicos avaliados pela função *features* do pacote Seurat. Para análise específica de células epiteliais, o cluster encontrado foi dividido em subgrupos através do UMAP e funções de reagrupamento do pacote Seurat com resolução = 1. A análise da diferença de expressão entre os genes encontrados no grupo de células epiteliais tumorais comp-valor ajustado ≤ 0.01 e os genes dos grupos de células epiteliais de pré-lesão com p-valor ajustado ≤ 0.05 . Os DEGs foram estabelecidos como *up* regulados quando o valor de *Fold Change* for positivo (≥ 0) e *down* quando negativo (< 0).

Diferenciação de células malignas e não malignas

Para análise complementar, a identificação de células malignas também foi realizada através da ferramenta computacional *Copynumber Karyotyping of Tumors* (CopyKat) (<https://github.com/navinlabcode/copykat>) (GAO, R. *et al.*, 2021), que usa abordagens Bayesianas integrativas para detectar aneuploidia no genoma em células únicas para separar células tumorais de normais. A análise foi aplicada para cada amostra individualmente.

Identificação de pequenas moléculas como alvo terapêutico através de assinaturas de expressão gênica de CC

Para verificação de possíveis drogas para tratamento personalizado de CC com HPV, as listas de DEGs de tumor e pré-lesão foram submetida a plataforma L1000 fireworks display (L1000FWD) (disponível em: <https://maayanlab.cloud/l1000fwd/#>) (WANG *et al.*, 2018). Selecionamos os top 10 alvos de acordo com o score de reversão de cada tipo amostral e realizamos o enriquecimento funcional dos genes *up* expressos responsáveis pela indução de cada droga por meio da plataforma *Enrichr* (disponível em: <https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) (Chen *et al.* 2013; Kuleshov *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2021). A visualização com *heatmap* dos resultados finais foi realizada através da plataforma Morpheus (disponível em: <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

O fluxograma da metodologia utilizada está ilustrado na Figura 1.

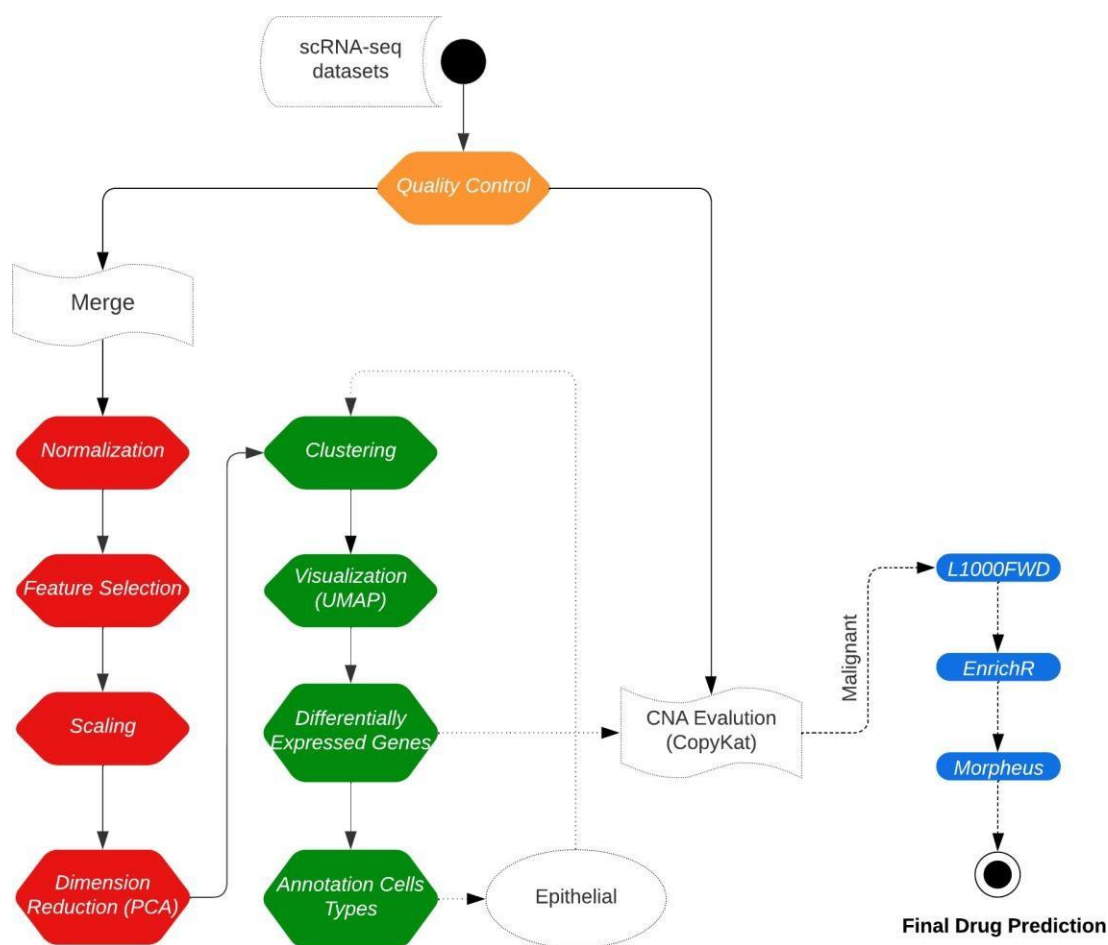


Figura 1: Fluxograma da metodologia realizada. A primeira parte envolve o controle de qualidade (laranja) das nove amostras selecionadas, seguido de dois processos independentes: análise de número de cópias e integração dos dados (branco). A partir da integração, foram realizadas as etapas de preparo dos dados (vermelho), agrupamento e anotação dos tipos celulares identificados (verde). Realizamos um reagrupamento de células epiteliais identificadas (setas tracejadas) para identificação de células epiteliais malignas. Posteriormente, submetemos a lista de DEGs *up* expressos na plataforma L1000FWD para identificação de drogas induzidas por estas assinaturas de expressão, realizamos o enriquecimento funcional dos genes com alta expressão específicos de cada droga encontrada pelo EnrichR e depositamos os resultados na plataforma Morpheus a fim de obter melhor visualização dos dados finais (azul).

Resultados

Atlas de transcriptoma de célula única de amostras de colo de útero normal, pré-lesão e câncer cervical

Para caracterizar a composição celular dos microambientes de tecidos cervicais normais e tumorais, utilizou-se nove amostras de scRNA-seq disponibilizadas no estudo GSE208653 incluindo: duas normais HPV negativo (N_NO_HPV), duas normais HPV positivo (N_HPV), duas de pré-lesão HPV positivo (HSIL_HPV) e três de câncer cervical

HPV positivo (CA_HPВ, sendo duas destas de carcinoma escamoso e uma de adenocarcinoma) (Figura 2a). Após o processo de controle de qualidade foi obtido o total de 52.726 células, sendo 13.497 células do grupo N_NO_HPВ, 15.186 células do grupo N_HPВ, 8.466 células do grupo HSIL_HPВ e 15.577 células do grupo CA_HPВ (Figura 2b). Para a anotação de quais tipos celulares estavam presentes nas amostras, realizamos o UMAP e identificamos 21 clusters de células (Figura 2c). Destes 21 clusters, foram identificadas dez células principais através de genes marcadores já conhecidos na literatura (Figura Suplementares 1), sendo elas célula T (30,23%, marcada com CD3D, CD3E e CD2), NK (18%, marcada com NKG7, GZMB e KLRD1), macrófago (14,7%, marcada com CD14, AIF1 e CD68), epitelial (12,3%, marcada com KRT19, EPCAM e KRT18), plasmócitos (5,82%, marcada com SLAMF7, CD38 e JCHAIN), fibroblasto (4,06%, marcada com LUM, DCN e COL1A1), dentrítica (2,9%, marcada com CD1C e CD207), mastócito (2,37%, marcada com CPA3, MS4A2 e TPSAB1), célula B (1,8%, marcada com MS4A1, CD79A e CD79B), endotelial (1,4%, marcada com CDH5, VWF e PECAM1). O grupo nomeado como “*unassigned*” representa as células não identificadas nas amostras, sendo 6,5% do total. (Figura 2d).

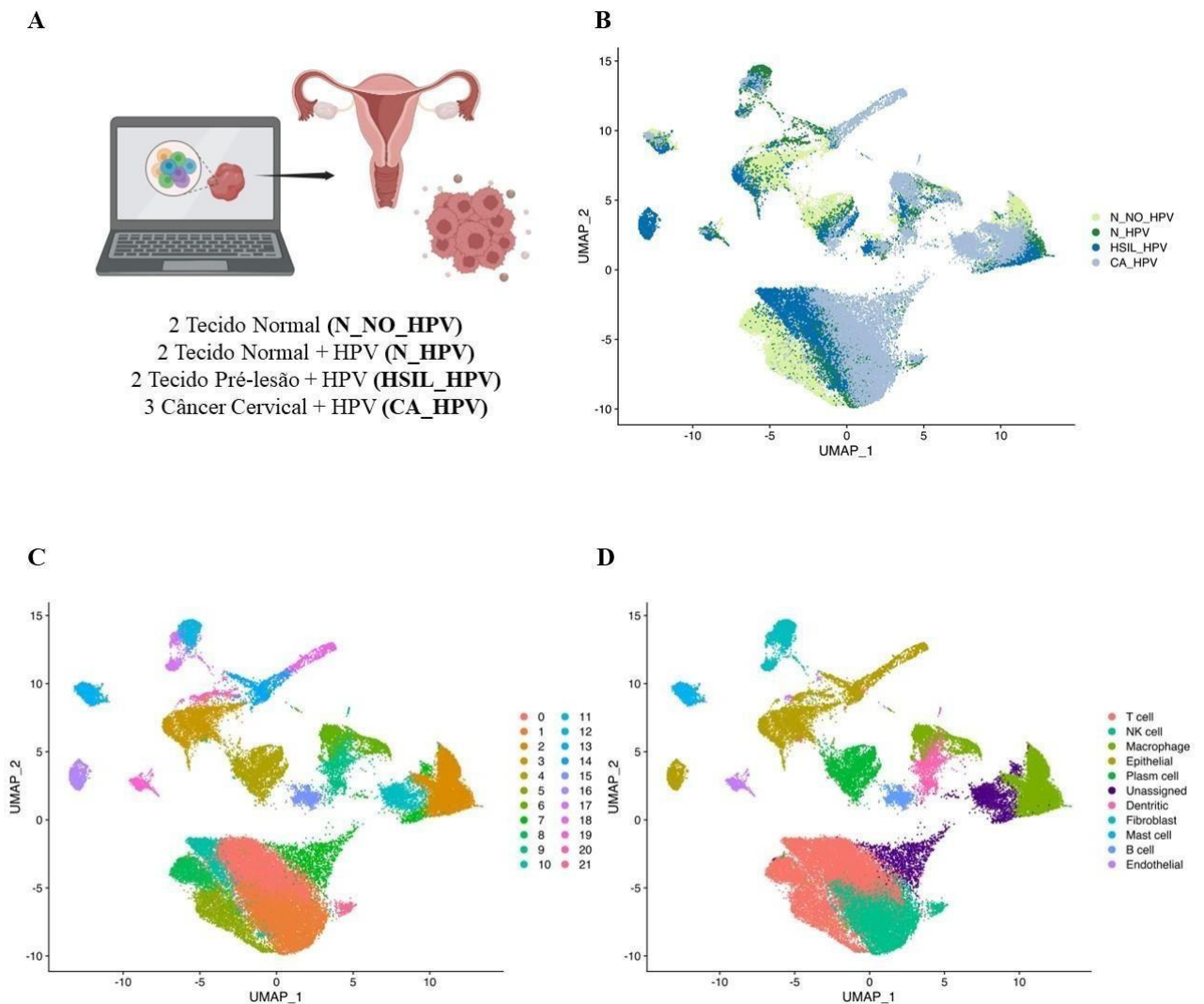


Figura 2: (a) Esquema das amostras de *single-cell* retiradas do estudo de Guo et. al. (b) UMAP plot das células agrupadas por grupo de origem. (c) UMAP plot dos 20 clusters de células identificadas das 58.857 células totais. Cada ponto no gráfico representa uma célula única identificada. (d) UMAP plot dos 10 clusters de células principais encontradas entre as células totais através de genes marcadores canônicos, incluindo célula T, NK, macrófago, epitelial, plasma, dentríticas, fibroblasto, mastócito, células B e endotelial. O grupo nomeado *unassigned* representa a população de células que não foi marcada por nenhum gene marcador conhecido.

Quando comparamos a distribuição das células nos grupos de amostras estudadas, conseguimos observar que células imunes estão predominantemente presentes no grupo de tecido normal com HPV e tecido cancerígeno com HPV. Nota-se também grande diferença no número de fibroblastos, que encontra-se em maior quantidade no tecido normal com HPV,

quando comparado aos outros grupos. No caso das epiteliais, as células estão mais distribuídas nos grupos de tecido normal, pré-lesão e câncer, diferenciando apenas no grupo normal sem influência do HPV (tabela 1).

Tabela 1: Proporção de células presentes nos diferentes grupos de amostras.

	N_NO_HP	N_HP	HSIL_HP	CA_HP	Total Cell Type
T cell	4681	4545	3434	3278	15938
NK cell	249	4454	930	3854	9487
Macrophage	2207	1653	886	2997	7743
Fibroblasts	333	1278	298	231	2140
Epithelial	2731	1022	1553	1168	6474
Plasm cell	1866	478	455	266	3065
Unassigned	279	277	112	2756	3424
Dentritic	267	484	173	601	1525
Mast cell	498	402	161	185	1246
B cell	149	293	315	194	951
Endothelial	237	300	149	47	733
Total Group	13497	15186	8466	15577	52726

Subtipos epiteliais e identificação de células malignas

Devido à histologia do colo de útero e do papel importante das células epiteliais no desenvolvimento do CC, estas foram divididas em 19 subgrupos (Figura 3a). Através da origem das amostras e da análise com *CopyKat*, foi possível identificar inicialmente a malignidade das células (Figura 3b). Além disso, também classificamos células epiteliais de pré-lesão (descritas como HSIL). Podemos perceber que os *clusters* 1, 4, 10, 11, 12, 13, 15, 16 e 17 estão presentes na proporção de células epiteliais não-malignas (Normal); os 2, 3, 5, 8, 9 e 18 encontram-se em pré-lesão (HSIL) e 0, 6, 7, 9 e 14 estão localizados na proporção de epiteliais malignas (Tumor). Os resultados da porção de células em cada grupo pela análise de número de cópias *CopyKat* estão inseridos na Tabela Suplementar 1.

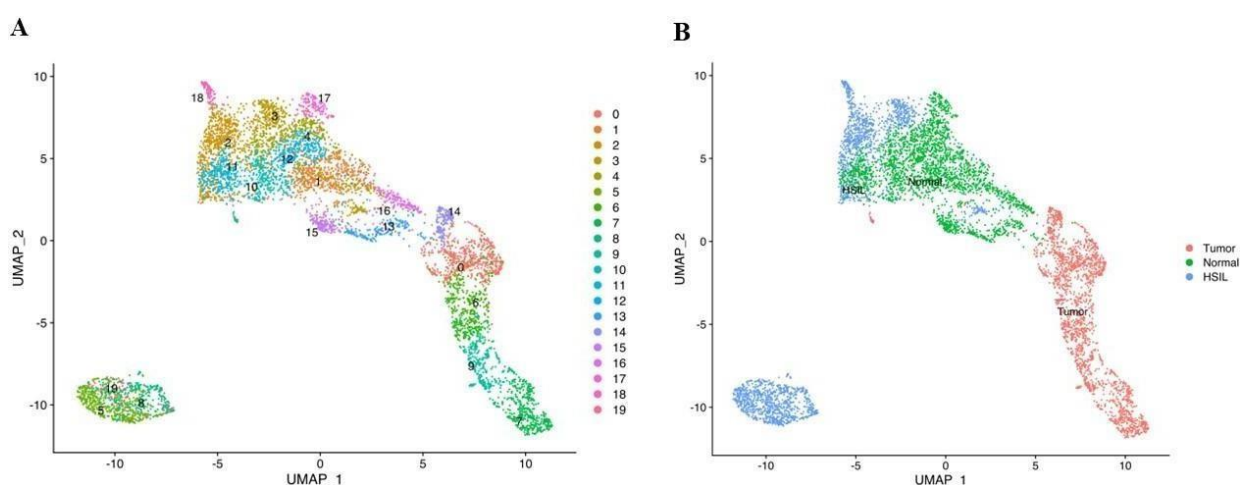


Figura 3: (a) UMAP *plot* de células epiteliais em 19 *clusters*. (b) UMAP *plot* de células epiteliais classificadas em não-malignas (Normal), malignas (Tumor) e pré-lesão (HSIL).

Identificação de pequenas moléculas como alvo terapêutico através de assinaturas de expressão gênica de CC

Após a obtenção da lista de DEGs nos grupos amostrais de tumor e pré-lesão, os genes que possuem alta expressão de cada grupo foram submetidos à plataforma L1000FWD, onde foram encontradas 50 drogas relacionadas às assinaturas de expressão genética depositadas. Desse total, separamos os 10 primeiros candidatos de acordo com o *score* de reversão de cada um (-0.08 para tumor e -0.10 para pré-lesão) (Tabelas 1 e 2; Figura Suplementar 2). Informações como mecanismos de ação, linhagem celular e principais marcadores desses alvos estão anexados no material suplementar (Tabelas Suplementares 1 e 2).

Tabela 2. Descrição das 10 primeiras drogas candidatas no grupo Tumor, de acordo com *score* de reversão.

Signature Identity	Drug	Similarity Scores	p-value	q-value	Z-score	Combined Score
CPC013_HT29_6 H:BRD-K2468147 3-004-01-4:10	YM-155	-0.076276665	1.38E-31	1.97E-31	1.73	-60.35
CPC016_HT29_6 H:BRD-A7652857 7-065-01-2:10	vincristine	-0.075630252	7.77E-37	1.66E-32	1.73	-62.38
CPC019_HT29_6 H:BRD-K6787007 0-001-01-4:10	SA-247615	-0.07498384	1.02E-34	1.09E-30	1.69	-57.39
CPC018_HT29_6 H:BRD-K4965762 8-001-02-3:10	tyrphostin-AG-18	-0.073691015	1.04E-37	4.45E-33	175.00	-64.69
CPC014_VCAP_2 4H:BRD-A110075 41-003-01-9:10	BCI-hydrochloride	-0.073691015	4.27E-33	3.05E-29	1.73	-55.84
CPC004_HA1E_6 H:BRD-K9849005 0-001-01-8:10	amsacrine	-0.07239819	2.69E-31	1.44E-27	1.82	-55.71
CPC020_MCF7_6 H:BRD-A4984818 6-003-01-2:10	BRD-A49848186	-0.071751778	1.34E-31	8.22E-28	1.67	-51.66
CPC006_SW948_6 H:BRD-A1507908 4-001-02-9:10	phorbol-12-myristate-13 -acetate	-0.070458953	1.74E-29	4.98E-26	1.79	-51.41
CPC004_HCC515 _24H:BRD-K0310 9492-001-01-4:10	NSC-663284	-0.06981254	9.88E-29	2.35E-25	1.83	-51.37
CPC012_A375_6H :BRD-K42308740- 001-01-5:10	ST-056792	-0.069166128	2.96E-28	6.21E-25	1.76	-48.41

Tabela 3. Descrição das 10 primeiras drogas candidatas no grupo HSIL (pré-lesão), de acordo com *score* de reversão.

Signature Identity	Drug	Similarity Scores	p-value	q-value	Z-score	Combined Score
CPC004_PC3_6H:BRD-K425 00029-001-01-9 :10	CGP-57380	-0.0974	2.32E-25	9.92E-21	1.83	-44.99
CPC011_VCA P_24H:BRD-K 92870997-001- 13-8:10	pterostilbene	-0.0761	2.07E-15	3.40E-12	1.71	-25.09
CPC014_HCC 515_6H:BRD- K13927029-00 1-01-9:10	retinol	-0.0715	9.62E-15	1.18E-11	1.72	-24.16
CPC018_A375_6H:BRD-K51 318897-001-07- 0:10	fenbendazole	-0.0715	9.62E-15	1.18E-11	1.68	-23.6
CPC008_A375_24H:BRD-K1 0361096-001-0 4-6:10	BRD-K10361096	-0.07	1.24E-14	1.44E-11	1.8	-24.98
CPC019_PC3_24H:BRD-K90 700939-001-01- 5:10	BRD-K90700939	-0.0685	1.71E-12	8.61E-10	1.65	-19.38
CPC008_PC3_6H:BRD-K295 06255-019-01-0 :10	BRD-K29506255	-0.067	1.67E-12	8.61E-10	1.76	-20.75
CPC009_VCAP_6H:BRD-K75 477256-001-01- 4:10	BRD-K75477256	-0.0654	7.80E-12	2.98E-09	1.72	-19.14
MUC.CP004_MCF7_24H:BR	rhamnetin	-0.0654	6.04E-12	2.42E-09	1.6	-17.92

D-K37206356-
001-02-1:0.370
4

CPC011_VCAP
_24H:BRD-K0
8547377-311-1

1-2:10 irinotecan -0.0654 2.11E-11 6.94E-09 1.7 -18.19

Desses grupos de 10 possíveis alvos terapêuticos obtidos, optamos por filtrar apenas 3 drogas que influenciam importantes vias e processos relacionados à infecção viral por HPV e desenvolvimento do câncer e que ainda não foram definidos ou abundantemente estudados como tratamento para CC ou pré-lesão cervical com influência dos HPVs 16/18. Para as amostras de tumor, as drogas que se destacaram foram SA-247615, tirfostina-AG-18 e amsacrina. No grupo de pré-lesão, os alvos definidos foram pterostilbene, retinol e BRD-K90700939.

A fim de analisar e comparar as vias e ontologias presentes em mais de um composto, realizamos um *heatmap* com os cinco primeiros termos enriquecidos dos bancos de dados *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) para vias e *GO: BIOLOGICAL PROCESS* para ontologia para cada uma das três drogas separadas em cada grupo (Figura 4).

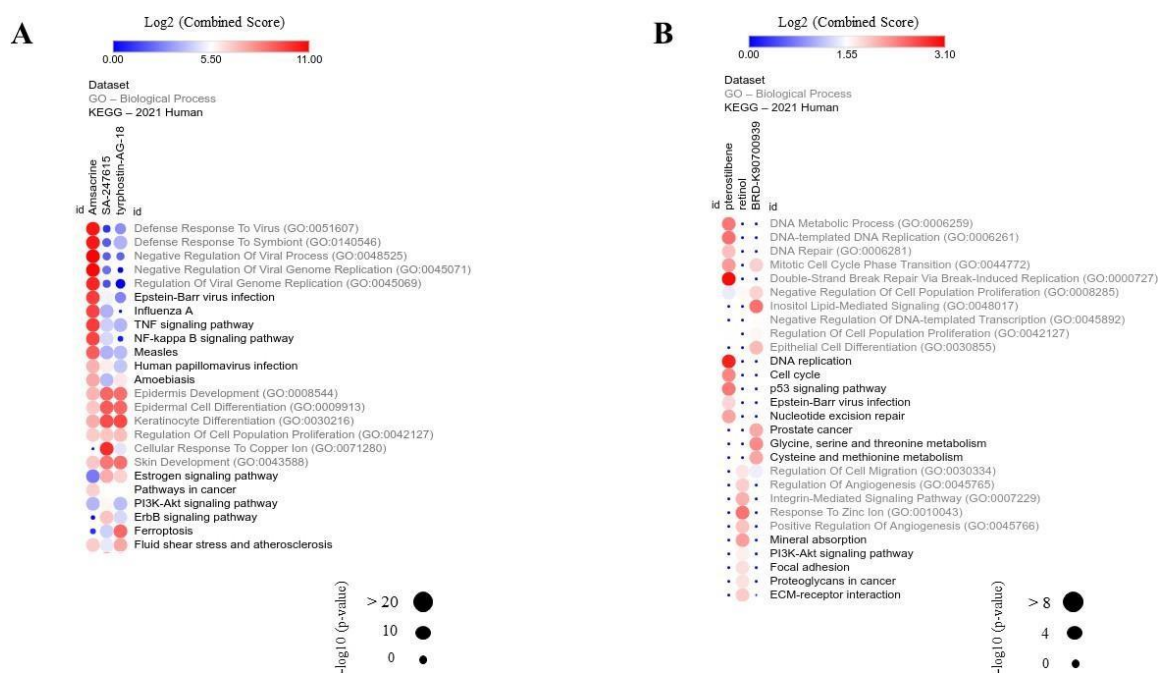


Figura 4: *Heatmap* dos termos enriquecidos de KEGG e GO: *Biological Process* dos grupos tumor e pré-lesão determinados através da plataforma EnrichR. As cinco principais classificações foram definidas através de *p-value* ajustado significativo (<0.05) para cada droga. O agrupamento das linhas e colunas foi realizado por meio da distância euclidiana dos valores de \log_2 *combined score*. (a) *Heatmap* representativo do grupo Tumor com as drogas amsacrina, SA-247615 e tirfostina-AG-18. (b) *Heatmap* representativo do grupo HSIL com as drogas pterostilbeno, retinol e BRD-K90700939.

Em relação às ontologias do grupo Tumor, a droga amsacrina apresentou maior enriquecimento em processos associados à infecção viral, como “Resposta de Defesa ao Vírus”, “Regulação Negativa do Processo Viral” e “Regulação Negativa e Positiva da Replicação do Genoma Viral”, enquanto a SA-247615 e tirfostina-AG-18 apresentaram termos relacionados a epiderme como “Desenvolvimento da Epiderme e Diferenciação de Células Epidérmica”, “Diferenciação de Queratinócitos” e “Regulação da Proliferação Populacional Celular”. Sobre as vias enriquecidas, a amsacrina apresentou termos importantes no desenvolvimento do câncer, como “Via de Sinalização TNF” e “Via de Sinalização NF-kappa B” e algumas vias virais, destacando a “Papilomavírus Humano” para nosso trabalho. SA-247615 e tirfostina-AG-18 demonstraram pouco enriquecimento em vias, sendo “Sinalização de Estrógeno e ErbB”, “Ferroptose” e “Estresse de Cisalhamento de Fluidos e Arteriosclerose” como mais significativos no grupo Tumor.

Quando observamos a ontologia do grupo HSIL, os componentes pterostilbeno, retinol e BRD-K90700939 tiveram apenas o termo “Regulação Negativa da Proliferação Populacional Celular” em comum entre os três. Outros termos em comum aparecem em BRD-K90700939 com o termo “Regulação da Migração Celular” entre retinol e “Regulação da Proliferação Populacional Celular” entre pterostilbeno. O medicamento pterostilbeno possui maior enriquecimento em processos importantes do ciclo celular, como “Processo Metabólico e Reparo do DNA”, “Replicação de DNA modelada por DNA”, “Transição de fase do ciclo celular mitótico” e “Reparo de quebra de fita dupla por meio de replicação induzida por quebra”. Enquanto isso, o retinol apresentou resultados em processos relacionadas a migração celular, como “Regulação da Migração Celular e da Angiogênese”, “Regulação Positiva da Angiogênese” e outros tal como “Via de Sinalização Mediada por Integrina” e “Resposta ao Íon Zinco”. No caso da BRD-K90700939 houve enriquecimento em termos como “Sinalização Mediada por Lipídios de Inositol”, “Regulação Negativa da Transcrição Modelada por DNA” e “Diferenciação de Células Epiteliais”. Nos resultados em

relação às vias do KEGG, nenhuma característica significativa em comum foi encontrada enriquecida entre as drogas, sendo assim cada uma destacou diferentes vias relacionadas ao câncer. No caso da pterostilbeno as principais vias foram “Replicação de DNA”, “Ciclo Celular” e “Via de Sinalização p53”, condizentes com os resultados do GO: BiologicalProcess citados acima. Para retinol, os resultados aparentes são “Absorção Mineral”, “Via de Sinalização PI3K-Akt”, “Adesão Focal”, “Proteoglicanos no Câncer” e “Interação ECM-receptor” e para BRD-K90700939, os únicos termos significativos no enriquecimento foram “Câncer de Próstata”, “Metabolismo de Glicina, Serina e Treonina” e “Metabolismo da Cisteína e Metionina”.

Discussão

Sabe-se que mesmo com os métodos de prevenção como vacinação e cobertura de triagem, os números de casos de CC continuam sendo alarmantes, estabelecendo-se entre os tipos mais comuns de câncer e tomando parte como um problema de saúde pública (WHO, 2023). Além das estratégias de combate ao HPV e CC, também é importante levar em consideração os tratamentos definidos para pacientes já afetados pelo desenvolvimento desse câncer, pois muitas vezes os indivíduos podem apresentar complicações relacionadas às drogas utilizadas, como resistência ou alteração na qualidade de vida por conta de efeitos colaterais do tratamento (BHATTACHARJEE *et al.*, 2022b).

No nosso estudo conseguimos identificar grupos de células presentes nas amostras selecionadas de tecido normal, pré-lesão e de CC. Com isso, foi possível identificar a presença de grandes agrupamentos de células inflamatórias, principalmente células T, macrófagos e NK, predominantemente em pacientes dos grupos N_HPV e CA_HPV. Estes resultados corroboram com a literatura, pois estas células apresentam papel importante na depuração viral, eliminação de células infectadas e possíveis desenvolvimentos da carcinogênese associada ao HPV (NTULI *et al.*, 2022). Devido à histologia do colo de útero, composta por epitélio escamoso e estroma, também notamos porções significativas de fibroblastos e células epiteliais em pacientes dos grupos N_HPV, HSIL_HPV e CA_HPV. Isto também coincide com a literatura, pois estudos concretos relataram que na maioria dos cânceres as alterações pré-cancerosas começam no epitélio escamoso, sendo altamente usadas para caracterizar o CC (KHAN *et al.*, 2023).

Entre as drogas alvos de CC HPV positivo encontradas no nosso trabalho, as que mais obtiveram destaque em relação aos termos enriquecidos foram a amsacrina e a tirfostina

AG-18. A amsacrina (m-AMSA), tem como principal alvo a enzima DNA topoisomerase II, atuando na instabilidade dessa enzima e na indução da quebra na fita dupla do DNA (BAGULEY *et al.*, 2021). Após diversos estudos, a amsacrina demonstrou-se eficaz no tratamento da leucemia aguda e do linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, porém seu efeito em tumores sólidos continua sendo um desafio para os pesquisadores (RUPAR *et al.*, 2020). Estudos de fase II foram realizados para melhor compreensão da atividade deste composto em carcinoma de ovário, mama e urotélio, principalmente combinado à cisplatina, porém os resultados demonstraram eficácia parcial, possibilitando novas oportunidades de pesquisa (DOMBERNOWSKY *et al.*, 1982; HILGERS *et al.*, 1983; CHANG *et al.*, 1988; POPOV *et al.*, 2001). Quando focamos na virologia, podemos encontrar estudos sobre a eficácia da amsacrina com atividade inibitória de vírus como hepatite B, febre suína africana e SARS-Cov-2, porém nenhuma evidência da relação da amsacrina com o HPV encontra-se estabelecida na literatura (CIVITICO *et al.*, 1990; COELHO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2021). Dito isso, o nosso estudo apresenta resultados inéditos de que a amsacrina pode estar associada a processos de resposta de defesa e interferência na replicação do vírus HPV, além de participar em vias de sinalização TNF e NF-kappa B, elementos importantes no desenvolvimento da carcinogênese, tornando-se uma possível candidata para tratamento personalizado de pacientes com CC HPV positivo. Assim, o nosso trabalho estabelece oportunidade para outros estudos testarem o fator de reversão dessa droga, e apresenta possíveis genes biomarcadores que possam estar envolvidos nos processos anteriormente citados.

A tirfostina-AG18, também chamada de tirfostina-AG23, pertence à classe de inibidores da fosforilação da tirosina e do fator de crescimento epidérmico (EGF), responsáveis por bloquear a atividade de proteínas tirosina quinases (PTKs) e receptores de EGF e consequentemente regular processos como a proliferação, diferenciação e outras funções envolvidas na sobrevivência celular (LEVITZKI; GAZIT, 1995; LEVITZKI, 2002). A ação antitumoral das tirfostinas foi relatada para vários tipos de câncer como bexiga, renal, próstata e rabdomiossarcoma, principalmente quando combinada com outras drogas ou compostos naturais (SION-VARDY *et al.*, 1995; TANG *et al.*, 2018; LASOTA *et al.*, 2021). Bojko *et al.* (2015) demonstraram que a tirfostina AG494 combinada com curcumina estimula a apoptose e o dano irreversível ao DNA, além de aumentar o efeito citotóxico em células de glioblastoma. Além disso, Grunt, em 2003, relatou que retinóides são capazes de aumentar a atividade antiproliferativa das tirfostina AG1517, intensificando o processo de inibição do

crescimento de células tumorais do câncer de ovário. Não foram encontrados muitos resultados sobre a tirfostina-AG18 e câncer, principalmente em relação ao CC, porém, vistoos estudos do grupo das tirfostina em combate a outros tipos de câncer e os resultados de enriquecimento em processos de desenvolvimento epidermal, queratinócito e na regulação da proliferação de células, este pode se tornar um possível alvo potencial a ser estudo para o tratamento personalizado de pacientes com CC HPV positivo.

Em relação aos compostos identificados no grupo de pré-lesão em tecidos cervicais com infecção por HPV, os principais alvos são o pterostilbeno e retinol, importantes moléculas presentes em métodos de prevenção de diversos fatores como diabetes e envelhecimento da pele, respectivamente (ZHAO *et al.*, 2021; QUAN, 2023).

O pterostilbeno (PS), também denominado como 3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno, é um composto de origem natural análogo ao resveratrol encontrado em *Pterocarpus marsupium Roxb.* (Fabaceae) e também em abundância em mirtilos e uvas (CHEN, R. J. *etal.*, 2018). O PS possui diversos mecanismos de combate, como atividades hipolipidêmicas, antioxidantes e antiinflamatórias, sendo utilizado como prevenção em diabetes, doenças cardiovasculares e do sistema nervoso central. Porém, a relevância na pesquisa sobre PS ganhou conhecimento em 2011 quando pesquisadores descobriram seus efeitos antiproliferativos em menores concentrações que o resveratrol (KOSURU *et al.*, 2016). O PS está associado a alterações em células tumorais, tais como indução de apoptose, regulação da proliferação, inibição de invasão, metástases e angiogênese, entre outros, ganhando destaque no combate de vários tipos de câncer e reafirmando seu potencial como composto antitumoral(MA *et al.*, 2019). No CC, Baguley *et al.*, 2021 demonstrou a capacidade de contenção do PS a partir da indução da apoptose, fragmentação do DNA e regulação negativa das proteínas da via-TOR PI3K/Akt em células tumorais da linhagem HeLa. Assim, em nosso trabalho, conseguimos identificar o possível comportamento do PS em amostras de tecido com pré-lesão cervical HPV positivo, com enriquecimento de importantes vias como replicação e reparação do DNA, ciclo celular e vias de sinalização p53, podendo ser discutido como um potencial alvo para prevenção do CC em pacientes diagnosticados com algum tipo de pré-lesão cervical.

O outro alvo, retinol, é um derivado da vitamina A e pertence ao grupo dos retinóides, classe que desempenha papel importante em uma gama de processos biológicos, como diferenciação, proliferação e apoptose celular, além de estar envolvido na diferenciação de vários epitélios (DOLDO *et al.*, 2015). O papel deste composto na oncologia ainda não foi

devidamente estabelecido devido a resultados controversos em relação a sua eficácia na predição, no tratamento ou até no desenvolvimento do câncer (CARAZO *et al.*, 2021). Em sua meta-análise de ensaios clínicos randomizados, Chen, S. *et al.*, 2022 demonstraram que os retinóides foram capazes de reduzir a recorrência tumoral no carcinoma de células renais, leucemia promielocítica aguda e carcinoma hepatocelular, porém a utilização desse grupo não implicou na sobrevivência global ou livre em pacientes com câncer ou pré-lesões, nem na progressão ou desenvolvimento da doença. Com relação ao CC, a vitamina A não apresentou nenhum resultado sólido com cânceres ginecológicos. Contudo, outro estudo demonstrou que a ingestão de vitamina A pode estar inversamente associada ao risco de CC (ZHU *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2012). Os nossos resultados, em associação com esses achados da literatura, inferem que o retinol pode ter um papel importante na prevenção do CC, sendo um possível alvo de tratamento para pacientes com pré-lesão cervical. A eficácia do retinol na pré-lesão com infecção por HPV, assim como sua influência em processos de angiogênese e migração celular enriquecidos no nosso estudo, devem ser pesquisados mais profundamente para melhor entendimento do composto em questão.

As outras duas pequenas moléculas encontradas, sendo SA-247615 para tumor e BRD-K90700939 para pré-lesão, ainda não possuem mecanismos de ação descritos por estarem em processo de investigação ou desenvolvimento. Em nosso estudo, a SA-247615 foi enriquecida em termos semelhantes a AG18, como desenvolvimento epidermal e diferenciação de queratinócitos, regulação de proliferação celular, além do envolvimento em algumas vias como sinalização de estrógeno e da proteína ErbB, processos importantes no desenvolvimento de carcinomas, principalmente do CC. A pequena molécula BRD-K90700939 também apresentou atividade em termos interessantes, especialmente na diferenciação epitelial, regulação negativa da proliferação celular e no metabolismo de importantes aminoácidos como glicina, serina, treonina, cisteína e metionina. Portanto, mesmo sem a identificação exata dos mecanismos de ação, podemos sugerir que estas possam atuar como potenciais alvos na terapia de CC HPV positivo (SA-247615) e na prevenção do câncer como tratamento para pacientes com pré-lesões cervicais, também com a presença do vírus HPV (BRD-K90700939).

5. Conclusões

Em síntese, o estudo identificou a amsacrina e AG-18 como potenciais alvos terapêuticos para pacientes com CC influenciados pelo vírus HPV, além de diferenciar o

tratamento entre câncer e pré-lesão cervical, com os compostos naturais retinol e pterostilbeno como agentes preventivos para pacientes em risco de progressão da lesão para uma carcinogênese cervical viral.

6. Referências Bibliográficas Gerais

ARANDA-RIVERA, A. K. *et al.* Regulation of autophagy by high- and low-risk human papillomaviruses. *Reviews in Medical Virology*, v. 31, n. 2, p. 1–12, 2021.

BAGULEY, B. C. *et al.* Dna-binding anticancer drugs: One target, two actions. *Molecules*, v. 26, n. 3, 2021.

BALASUBRAMANIAM, S. D. *et al.* Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina*, v. 55, n. 7, p. 384, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/medicina55070384>>.

BARRA, F. *et al.* New prophylactics human papilloma virus (HPV) vaccines against cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 39, n. 1, p. 1–10, 2019.

BEDFORD, S. Cervical cancer: physiology, risk factors, vaccination and treatment. *British journal of nursing (Mark Allen Publishing)*, v. 18, n. 2, p. 80–84, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.12968/bjon.2009.18.2.37874>>.

BERKOWITZ, Z. *et al.* Providers' beliefs about the effectiveness of the HPV vaccine in preventing cancer and their recommended age groups for vaccination: Findings from a provider survey, 2012. *Preventive medicine*, v. 81, n. 3, p. 405–11, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598805>>.

BHATLA, N. *et al.* Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 155, n. S1, p. 28–44, 2021.

BHATLA, N. *et al.* Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 143, p. 22–36, 2018.

BHATTACHARJEE, R. *et al.* Cellular landscaping of cisplatin resistance in cervical cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 153, n. July, p. 113345, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113345>>.

BHATTACHARJEE, R. *et al.* Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 174, n. April, p. 103675, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103675>>.

BOJKO, A. *et al.* Modulatory Effects of Curcumin and Tyrphostins (AG494 and AG1478) on Growth Regulation and Viability of LN229 Human Brain Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, v. 67, n. 7, p. 1170–1182, 2015.

CASTLE, P. E.; MAZA, M. Prophylactic HPV vaccination: Past, present, and future. *Epidemiology and Infection*, v. 144, n. 3, p. 449–468, 2016.

CHANG, A. Y.-C. *et al.* Pilot Study of Adriamycin and Amsacrine (m-AMSA) in Patients with Advanced Breast Cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, v. 11, n. 5, p.

535–537, out. 1988. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00000421-198810000-00005>>.

CHEN EY, *et al.*. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013; 128(14).

CHEN, G. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Frontiers in genetics*, v. 10, n. APR, p. 317, 5 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00317/full>>.

CHEN, R. J. *et al.* Apoptotic and nonapoptotic activities of pterostilbene against cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 1, p. 1–25, 2018.

CHEN, S. *et al.* Retinoids in cancer chemoprevention and therapy: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Genetics*, v. 13, n. November, p. 1–14, 2022.

CHEN, T. *et al.* A multi-modal data harmonisation approach for discovery of COVID-19 drug targets. *Briefings in Bioinformatics*, v. 22, n. 6, p. 1–15, 2021.

CIVITICO, G. *et al.* Antiviral strategies in chronic hepatitis B virus infection: II. Inhibition of duck hepatitis B Virus in vitro using conventional antiviral agents and supercoiled-DNA active compounds. *Journal of Medical Virology*, v. 31, n. 2, p. 90–97, 1990.

CLOUGH, E.; BARRETT, T. The Gene Expression Omnibus Database. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 1418, n. 301, p. 93–110, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27008011>>.

COELHO, J. *et al.* Functional characterization and inhibition of the type II DNA topoisomerase coded by African swine fever virus. *Virology*, v. 493, p. 209–216, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.023>>.

COHEN, P. A. *et al.* Cervical cancer. *The Lancet*, v. 393, n. 10167, p. 169–182, 2019. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)>.

CRICCA, M. *et al.* Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *Journal of Virological Methods*, v. 158, n. 1–2, p. 180–183, 2009.

DAVIS-MARCISAK, E. F. *et al.* Differential Variation Analysis Enables Detection of Tumor Heterogeneity Using Single-Cell RNA-Sequencing Data. *Cancer Research*, v. 79, n. 19, p. 5102–5112, 1 out. 2019. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/cancerres/article/79/19/5102/638356/Differential-Variation-Analysis-Enables-Detection>>.

DE CAMPOS FERRAZ, L. *et al.* Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos Cell cycle, HPV and cervical intraepithelial neoplasia evolution: biomarkers selection. *J Health Sci Inst*. 2012;30(2):107-11.

DE SANJOSÉ, S. *et al.* The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 47, p. 2–13, 2018.

DELLA FERA, A. N. *et al.* Persistent human papillomavirus infection. *Viruses*, v. 13, n. 2, 2021.

DEVINE, C. *et al.* Imaging and Staging of Cervical Cancer. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, v. 40, n. 4, p. 280–286, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1053/j.sult.2019.03.001>>.

DILLEY, S. *et al.* Human papillomavirus vaccination: Ongoing challenges and future directions. *Gynecologic Oncology*, v. 156, n. 2, p. 498–502, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.10.018>>.

DOLDO, E. *et al.* Vitamin A, cancer treatment and prevention: The new role of cellular retinol binding proteins. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

DOMBERNOWSKY, P. *et al.* Phase II trial of amsacrine (m-AMSA) in advanced ovarian carcinoma. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, v. 18, n. 1, p. 71–74, jan. 1982. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/027753798290027X>>.

FANG, J. *et al.* Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy. *Tumor Biology*, v. 35, n. 6, p. 5083–5093, 2014.

FLEISCHMANN, M. *et al.* Molecular Markers to Predict Prognosis and Treatment Response in Uterine Cervical Cancer. *Cancers*, v. 13, n. 22, p. 5748, 17 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/13/22/5748>>.

FONG, Z. V.; WINTER, J. M. Biomarkers in Pancreatic Cancer. *The Cancer Journal*, v. 18, n. 6, p. 530–538, 2012.

GAO, R. *et al.* Delineating copy number and clonal substructure in human tumors from single-cell transcriptomes. *Nature Biotechnology*, v. 39, n. 5, p. 599–608, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-00795-2>>.

GHEORGHE, A. S. *et al.* New Targeted Therapies and Combinations of Treatments for Cervical, Endometrial, and Ovarian Cancers: A Year in Review. *Current Oncology*, v. 29, n. 4, p. 2835–2847, 17 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1718-7729/29/4/231>>.

GONDANE, A.; ITKONEN, H. M. Revealing the History and Mystery of RNA-Seq. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 45, n. 3, p. 1860–1874, 24 fev. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1467-3045/45/3/120>>.

GRUNT, T. W. Tyrphostins and retinoids cooperate during inhibition of in vitro growth of ovarian cancer cells. *Cancer Letters*, v. 189, n. 2, p. 147–156, 2003.

GUO, C. *et al.* Spatiotemporally deciphering the mysterious mechanism of persistent HPV-induced malignant transition and immune remodelling from HPV-infected normal cervix, precancer to cervical cancer: Integrating single-cell RNA-sequencing and spatial transcriptome. *Clinical and translational medicine*, v. 13, n. 3, p. e1219, 26 mar. 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ctm2.1219>>.

HANAHAH, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HAO, Y. *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, v. 184, n. 13, p. 3573–3587.e29, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>>.

HILGERS, R. D. *et al.* m-AMSA in epithelial carcinoma of the ovary A Southwest Oncology Group study. *American Journal of Clinical Oncology*, v. 6, n. 3, p. 277–280, jun. 1983. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00000421-198306000-00004>>.

HOPPE-SEYLER, K. *et al.* The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 2, p. 158–168, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.007>>.

Instituto nacional de câncer josé alencar gomes da silva (INCA). *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. [S.l.: s.n.], 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>>.

JOHNSON, C. *et al.* Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 35, n. 2, p. 166–174, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.003>>.

KHAN, S. *et al.* Characterization of cervical tissue using Mueller matrix polarimetry. *Lasers in Medical Science*, v. 38, n. 1, p. 1–11, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-023-03712-6>>.

KITUR, H. *et al.* HPV Knowledge , Vaccine Status , and Health Literacy Among University Students. *Journal of Cancer Education*, v. 37, n. 6, p. 1606–1613, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13187-021-01997-1>>.

KOH, W.-J. *et al.* Cervical Cancer, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 17, n. 1, p. 64–84, 18 jan. 2019. Disponível em: <<https://jnccn.org/doi/10.6004/jnccn.2019.0001>>.

KOSURU, R. *et al.* Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence. *European Journal of Pharmacology*, v. 789, p. 229–243, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.046>>.

KULESHOV, MV. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*. 2016; gkw377 .

KUSAKABE, M. *et al.* Carcinogenesis and management of human papillomavirus-associated cervical cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 8, p. 965–974, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10147-023-02337-7>>.

LASOTA, M. *et al.* Small-Molecule Inhibitor-Tyrphostin Ag1296 Regulates Proliferation, Survival and Migration of Rhabdomyosarcoma Cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 72, n. 6, p. 1–13, 2021.

LAVIGNE, A. W. *et al.* Cervical cancer in low and middle income countries: Addressing barriers to radiotherapy delivery. *Gynecologic Oncology Reports*, v. 22, n. August, p. 16–20, nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gore.2017.08.004>>.

LEVITZKI, A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), v. 38 Suppl 5, 2002.

LEVITZKI, A.; GAZIT, A. Tyrosine kinase inhibition: An approach to drug development. *Science*, v. 67, n. 5205, p. 1782–1788, 1995.

LI, K. *et al.* Bioinformatics Approaches for Anti-cancer Drug Discovery. *Current drug targets*, v. 21, n. 1, p. 3–17, 20 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31549592>>.

LI, L. *et al.* What are the applications of single-cell RNA sequencing in cancer research: a

systematic review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 40, n. 1, p. 163, 11 dez. 2021. Disponível em: <<https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-021-01955-1>>.

LI, Y.; XU, C. Human Papillomavirus-Related Cancers. *Infectious Agents Associated Cancers: Epidemiology and Molecular Biology*, v. 1018, p. 23–34, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29052130/>>.

LIN, S. *et al.* Worldwide trends in cervical cancer incidence and mortality, with predictions for the next 15 years. *Cancer*, v. 127, n. 21, p. 4030–4039, 9 nov. 2021. Disponível em: <<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.33795>>.

LIONTOS, M. *et al.* Systemic therapy in cervical cancer: 30 years in review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 137, n. February, p. 9–17, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.02.009>>.

LONG, H. J. *et al.* Randomized phase III trial of cisplatin with or without topotecan in carcinoma of the uterine cervix: A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 21, p. 4626–4633, 2005.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, n. 2, p. 362–372, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15187189/>>.

MA, Z. *et al.* Pterostilbene: Mechanisms of its action as oncostatic agent in cell models and in vivo studies. *Pharmacological Research*, v. 145, n. May, p. 104265, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104265>>.

MAHMOODI, P. *et al.* Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. *BioFactors*, v. 45, n. 2, p. 101–117, 2019.

MANINI, I.; MONTOMOLI, E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunità*, v. 30, n. 4, p. 28–32, 2018.

MANRRIQUEZ, E. N. *et al.* Precision medicine for cervical cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34596094/>>.

MARIANI, L. *et al.* Overview of the benefits and potential issues of the nonavalent HPV vaccine. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, v. 136, n. 3, p. 258–265, 14 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087890>>.

MARKOWITZ, L. E. *et al.* Human papillomavirus vaccine effectiveness by number of doses: Updated systematic review of data from national immunization programs. *Vaccine*, v. 40, n. 37, p. 5413–5432, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.065>>.

MARKOWITZ, L. E.; SCHILLER, J. T. Human Papillomavirus Vaccines. *Journal of Infectious Diseases*, v. 224, n. Suppl 4, p. S367–S378, 2021.

MARQUINA, G.; MANZANO, A.; CASADO, A. Targeted Agents in Cervical Cancer: Beyond Bevacizumab. *Current Oncology Reports*, v. 20: 40, n. 5, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11912-018-0680-3%0AGYNECOLOGIC>>.

MITRA, T.; ELANGO VAN, S. Cervical cancer development, chemoresistance, and therapy: a

snapshot of involvement of microRNA. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 476, n. 12, p. 4363–4385, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11010-021-04249-4>>.

MONTEIRO, J. C. *et al.* Prevalence of High Risk HPV in HIV-Infected Women From Belém, Pará, Amazon Region of Brazil: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Public Health*, v. 9, n. April, p. 1–8, 2021.

NAGA CH, P. *et al.* The management of locally advanced cervical cancer. *Current Opinion in Oncology*, v. 30, n. 5, p. 323–329, 2018.

NTULI, L. *et al.* Role of Immunity and Vaginal Microbiome in Clearance and Persistence of Human Papillomavirus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, n. July, p. 1–10, 7 jul. 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.927131/full>>.

OBRADOVIC, A. *et al.* Single-cell protein activity analysis identifies recurrence-associated renal tumor macrophages. *Cell*, v. 184, n. 11, p. 2988–3005.e16, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.038>>.

PAL, A.; KUNDU, R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. January, p. 15, 2020.

PENG, J. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Research*, v. 29, n. 9, p. 725–738, 4 set. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41422-019-0195-y>>.

POPOV, I. *et al.* Amsacrine and cisplatin in poor prognosis patients with metastatic transitional cell carcinoma of the urothelium: A phase-II study. *European Urology*, v. 40, n. 3, p. 324–329, 2001.

PURUT, Y. E.; UÇKAN, K. Could HPV Type 33 Be More Risky Than We Thought? *International Journal of Surgical Pathology*, v. 31, n. 1, p. 4–10, 2023.

QUAN, T. Human Skin Aging and the Anti-Aging Properties of Retinol. *Biomolecules*, v. 13, n. 11, 2023.

ROSATI, D.; GIORDANO, A. Single-cell RNA sequencing and bioinformatics as tools to decipher cancer heterogeneity and mechanisms of drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, v. 195, n. July 2021, p. 114811, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114811>>.

RUPAR, J. *et al.* Synthesis and evaluation of anticancer activity of new 9-acridinyl amino acid derivatives. *RSC Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 3, p. 378–386, 2020.

RUSSELL WMS, BURCH RL. 1959. (as reprinted 1992). The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare

SALIBA, A.-E. *et al.* Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 14, p. 8845–8860, 18 ago. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gku555>>.

SCHUBERT, M. *et al.* Challenges in the Diagnosis and Individualized Treatment of Cervical Cancer. *Medicina (Lithuania)*, v. 59, n. 5, p. 1–19, 2023.

SHAPIRO, G. HPV Vaccination: An Underused Strategy for the Prevention of Cancer.

Current Oncology, v. 29, n. 5, p. 3780–3792, 23 maio 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1718-7729/29/5/303>>.

SION-VARDY, N. *et al.* Antiproliferative Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors (Tyrphostins) on Human Bladder and Renal Carcinoma Cells. *Journal of Surgical Research*, v. 59, n. 6, p. 675–680, dez. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002248048571222X>>.

SMALL, W. *et al.* Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 2017.

STUART, T. *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*, v. 177, n. 7, p. 1888–1902.e21, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031>>.

STUMBAR, S. E.; STEVENS, M.; FELD, Z. Cervical Cancer and Its Precursors: A Preventative Approach to Screening, Diagnosis, and Management. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, v. 46, n. 1, p. 117–134, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.10.011>>.

SZAREWSKI, A. Drug Evaluation HPV vaccine : Cervarix. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 10, n. 3, p. 477–487, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20132062/>>.

TANG, F. *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods*, v. 6, n. 5, p. 377–382, 6 maio 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.1315>>.

TANG, Q. *et al.* Genistein and AG1024 synergistically increase the radiosensitivity of prostate cancer cells. *Oncology Reports*, v. 40, n. 2, p. 579–588, 2018.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, v. 26, p. 13–21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.002>>.

TORNESELLO, M. L. *et al.* Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology*, v. 121, n. 1, p. 32–42, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.12.005>>.

VASHISHT, S. *et al.* Structure, Genome, Infection Cycle and Clinical Manifestations Associated with Human Papillomavirus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 20, n. 15, p. 1260–1280, 2019.

VILLA, L. L.; RICHTMANN, R. HPV vaccination programs in LMIC: is it time to optimize schedules and recommendations? *Jornal de Pediatria*, v. 99, n. Supplement 1, p. S57–S61, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2022.11.012>>.

VOLKOVA, L. V. *et al.* Cervical Carcinoma: Oncobiology and Biomarkers. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 22, p. 12571, 22 nov. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34830452>>.

WANG, R. *et al.* Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*, v. 471, n. September 2019, p. 88–102, 2020.

- WANG, Z. *et al.* L1000FWD: Fireworks visualization of drug-induced transcriptomic signatures. *Bioinformatics*, v. 34, n. 12, p. 2150–2152, 2018.
- WHO. Human papillomavirus vaccines : WHO position paper, October 2014. *Weekly Epidemiological Record*, v. 89, n. 43, p. 465–491, 2014. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/242277/WER8943_465-491.PDF>.
- WHO. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. *Weekly Epidemiological Record*, v. 92, n. 19, p. 241–68, 12 maio 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9219-241-268>>.
- WHO. Weekly epidemiological record: Human papillomavirus vaccines: WHO position paper (2022 Update). *Weekly epidemiological record*, v. 97, n. 50, p. 645672, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9750-645-672>>.
- WHO. *Who Cervical Cancer Elimination Initiative: From Call To Action To Global Movement*. (2023) Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/who-cervical-cancer-elimination-initiative--from-c-all-to-action-to-global-movement>>.
- WILLIAMSON, A.-L. Recent Developments in Human Papillomavirus (HPV) Vaccinology. *Viruses*, v. 15, n. 7, p. 1440, 2023.
- XIE, L. *et al.* Editorial: Bioinformatics Tools (and Web Server) for Cancer Biomarker Development. *Frontiers in Oncology*, v. 10, n. October, p. 1–3, 2020.
- Xie, Z. *et al.* Gene set knowledge discovery with Enrichr. *Current Protocols*, 1, e90. 2021. doi: 10.1002/cpz1.90
- YOUSEFI, Z. *et al.* An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. January, p. 1–11, 2022.
- ZAMPRONHA, R. de A. C. *et al.* Human papillomavirus types 16 and 18 and the prognosis of patients with stage I cervical cancer. *Clinics*, v. 68, n. 6, p. 809–814, 2013.
- ZHANG, X. *et al.* Vitamin A and risk of cervical cancer: A meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, v. 124, n. 2, p. 366–373, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.10.012>>.
- ZHANG, Y. *et al.* Single-cell RNA sequencing in cancer research. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, v. 40, n. 1, p. 81, 1 mar. 2021. Disponível em: <<https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-021-01874-1>>.
- ZHAO, X. *et al.* Nanoparticles prepared from pterostilbene reduce blood glucose and improve diabetes complications. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 19, n. 1, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-021-00928-y>>.
- ZHENG, H. *et al.* Comprehensive Review of Web Servers and Bioinformatics Tools for Cancer Prognosis Analysis. *Frontiers in Oncology*, v. 10, n. February, 5 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00068/full>>.
- ZHU, G. *et al.* Associations of Dietary Intakes with Gynecological Cancers: Findings from a Cross-Sectional Study. *Nutrients*, v. 14, n. 23, p. 5026, 25 nov. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/14/23/5026>>.

7. Apêndice: Histórico escolar e atividades complementares desenvolvidas

7.1. Histórico escolar

Aluno: BGA220061 - Laíza Brugnerotto | Biologia Geral e Aplicada - Mestrado Acadêmico

Disciplinas Cursadas no Programa	Calendário	Conceito	Frequência	Créditos	Carga Horária	Sigla Programa	Situação
Biologia Celular	1º / 2022	J	***	3	45.0	BGA	Cancelado
Noções básicas e aplicações da bioinformática	1º / 2022	A	100%	3	45.0	BGA	Aprovado
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada	1º / 2022	A	100%	2	30.0	BGA	Aprovado
Análises Estatística no R e suas Aplicações nas Diversas Áreas de Conhecimento	2º / 2022	B	96,7%	4	60.0	BGA	Aprovado
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Saúde Mental na Pós-Graduação: Espaço de Reconhecimento e Troca	2º / 2022	A	100%	1	15.0	BGA	Aprovado
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Isótopos Estáveis	1º / 2023	A	93,3%	4	60.0	BGA	Aprovado
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Plataforma do Currículo Lattes/CNPq – Atualização	1º / 2023	A	100%	1	15.0	BGA	Aprovado
Disciplinas Aproveitadas	Calendário	Conceito	Frequência	Créditos	Carga Horária	Sigla Programa	Situação
Tópicos Especiais em Biometria: Introdução à Bioestatística no Programa R	2 / 2021	A	100%	2	30.0	***	Cursada em outro programa da UNESP anteriormente à matrícula
Total de Créditos Cumpridos : 17.0				Total de Créditos Matriculados : 0.0			

7.2. PAADES na disciplina de Física das Radiações no curso de Física Médica



CERTIFICADO

Certificamos que o(a) discente Laíza Brugnerotto, CPF nº 42544269847, participou do Programa de Atividades e Aperfeiçoamento em Docência no Ensino Superior - PAADES, na disciplina Física das Radiações de responsabilidade do Departamento de Biofísica e Farmacologia do Câmpus de Botucatu, no período de 07/08/2023 à 13/12/2023 com a carga horária de 48h em atividades de apoio à docência e 12h em atividades de docência.



Maria Valnice Boldri
Pró-reitora de Pós Graduação
PROPG/UNESP



Celia Maria Giacheti
Pró-reitora de Graduação
PROGRAD/UNESP

7.3. Publicação de artigo com fator de impacto superior a 3.0

DOI: 10.21873/cgp.20400

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 20: 487-499 (2023)
doi:10.21873/cgp.20400

Identification of Biomarkers Related to the Efficacy of Radiotherapy in Pancreatic Cancer

GABRIEL HENRIQUE CAXALI^{1*}, LAÍZA BRUGNEROTTO^{1*}, MIRIAN CAROLINI ESGOTI AAL¹, CAMILA FERREIRA BANNWART CASTRO² and FLÁVIA KARINA DELELLA¹

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil;

²Molecular Genetics and Bioinformatics Laboratory - Experimental Research Unit, School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

Abstract. Background/Aim: Pancreatic cancer (PC) has one of the highest mortality rates, with an overall five-year survival rate of only 7%. When diagnosed, PC is limited to the pancreas in only 20% of patients, whereas in 50% it has already metastasized. This is due to its late diagnosis, which makes the treatments used, such as radiotherapy, difficult,

progression and other processes that contribute to the development of the disease. Conclusion: Radiotherapy treatment demonstrated greater efficacy when used in conjunction with other forms of therapy since it decreased the expression of essential genes involved in several inflammatory pathways linked to tumor progression.

7.4. Participações em eventos científicos

- 2 resumos em congressos:
 - Menção Honrosa para o trabalho “Detecção de potenciais biomarcadores sobre a eficácia da no câncer de pâncreas: análise *in silico*.” de Brugnerotto, L.; Caxali, G.H; Aal, M.C.E; Delella, F.K no ENBM.
- 8 participações em eventos científicos:
 - 25º Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM) (2022);
 - XX Workshop de Genética (2022)
 - Brunch da internacionalização (2022/2023);
 - Single-Cell RNA-seq Seminar (2023);
 - VIII Workshop de Biotecnologia (2023);
 - Simpósio das Ligas (2023)
 - XII Congrebio (2023)

7.5. Cursos ou Minicursos Assistidos

- Curso de imunologia pelo Centro Educacional Sete de Setembro com carga horária de 40 horas;
- Minicurso “Proteômica: Metodologias e aplicações” no VIII Workshop de Biotecnologia, carga horária de 2 horas;

- Minicurso - Epiinformatics: uso de bioinformática estrutural para encontrar inibidores para a maquinaria epigenética no XX Workshop de Genética, com carga horária de 3 horas;
- Minicurso “Explorando a Inteligência Artificial e Big Data em Biologia Computacional” no XII Congrebio, com carga horária de 4 horas.

7.6. Outras atividades

Atuação como professora de robótica para alunos de ensino fundamental pela “L&L ROBOTICS DESENVOLVIMENTO PROFISSIONAL LTDA ME” em escolas particulares de Botucatu (Santa Marcelina, La Salle, Estrelinha e Magna), no período de Março a Dezembro de 2022.

Neste período realizei atividades como:

- Planejamento, preparação e ministração de aulas relacionadas à tecnologia e robótica;
- Gestão de sala de aula;
- Organização e participação em feiras, oficinas e torneios;
- Criação de robôs;
- Apoio pedagógico;
- Trabalho com crianças e familiares.

8. Material Suplementar

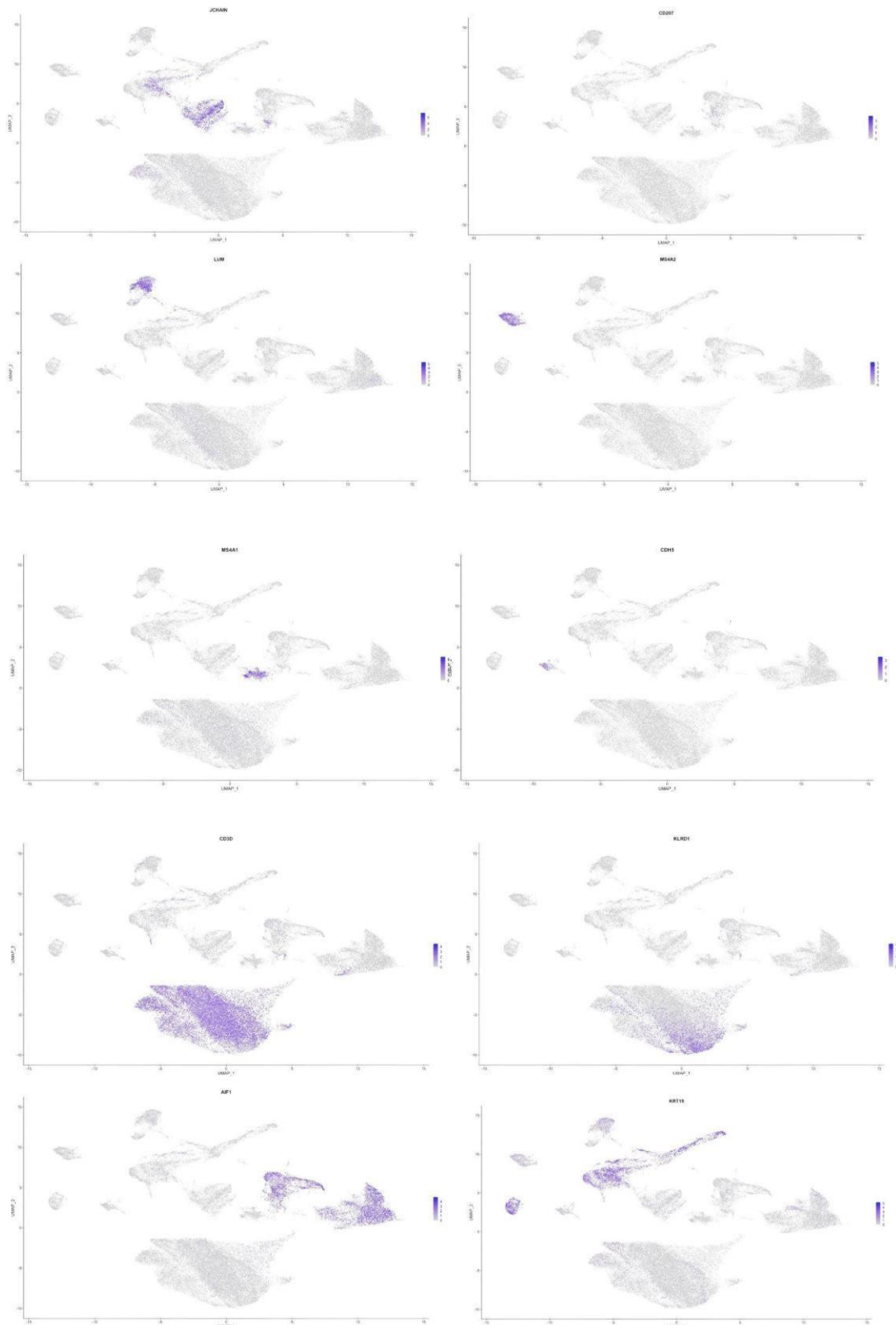


Figura Suplementar 1: Gráfico de *Features* com marcação dos genes canônicos nos clusters para identificação de cada tipo celular.

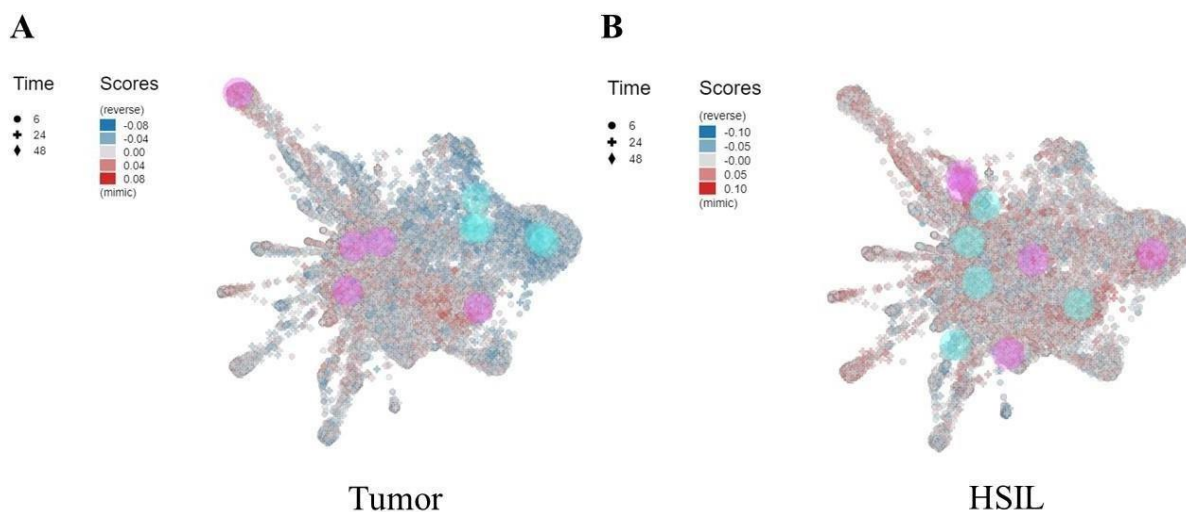


Figura Suplementar 2: Mapa interativo gerado com a ferramenta L1000FWD, onde cada ponto representa uma página inicial de assinatura. À esquerda das duas imagens contém a informação sobre o *score* de similaridade de cada grupo analisado, sendo (a) para Tumor com *score* de 0.08 à -0.08 e (b) para HSIL com *score* de 0.10 à -0.10. Os círculos em azul contidos na imagem representam a localização das pequenas moléculas com maiores índices de reversão e os círculos em rosa os de similaridade.

Tabela Suplementar 1. Porção de aneuploidia e diploidia das células epiteliais pela análise complementar de número de cópias (*CopyKat*).

	Aneuploid	Diploidy	Undertified	Total
Cluster 0	314	149	108	571
Cluster 1	1	537	5	543
Cluster 2	259	67	184	510
Cluster 3	57	89	333	479
Cluster 4	15	327	118	460

Cluster 5	445	2	0	447
Cluster 6	16	242	154	412
Cluster 7	6	356	39	401
Cluster 8	356	5	0	361
Cluster 9	20	230	104	354
Cluster 10	31	289	0	320
Cluster 11	275	40	3	318
Cluster 12	1	288	0	289
Cluster 13	149	40	3	192
Cluster 14	128	44	4	176
Cluster 15	40	122	7	169
Cluster 16	8	88	71	167
Cluster 17	11	102	21	134
Cluster 18	51	36	10	97
Cluster 19	20	11	43	74
Total	2203	3064	1207	6474

Tabela Suplementar 2. Informações adicionais dos dez principais alvos terapêuticos para o grupo Tumor.

Drug	Cell Line	Main Targets	MOA
YM-155	HT29	BIRC5	survivin inhibitor
vincristine	HT29	TUBA4A, TUBB	tubulin polymerization inhibitor
SA-247615	HT29	Unknown	Unknown
tyrphostin-AG-18	HT29	EGFR	EGFR inhibitor, tyrosine kinase inhibitor
BCI-hydrochloride	VCAP	Unknown	Unknown
amsacrine	HA1E	KCNH2, TOP2A	topoisomerase inhibitor
BRD-A49848186	MCF7	Unknown	Unknown
phorbol-12-myristate-13-acetate	SW948	Unknown	Unknown
NSC-663284	HCC515	CDC25A, CDC25B, CDC25C	CDC inhibitor
ST-056792	A375	Unknown	Unknown

Tabela Suplementar 3. Informações adicionais dos dez principais alvos terapêuticos para o grupo HSIL.

Drug	Cell Line	Main Targets	MOA
CGP-57380	PC3	AURKB, LCK, MKNK1, MKNK2, SGK1	MAP kinase inhibitor
pterostilbene	VCAP	PTGS2	cyclooxygenase inhibitor, PPAR receptor agonist
retinol	HCC515	ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, DHRS3, DHRS4, LRAT, NR2C2, RBP1, RBP3, RDH11, RDH12, RDH13, RDH14, RDH5, RDH8, RETSAT, RHO, RLBP1, RXRA, RXRB, RXRG	retinoid receptor ligand
fenbendazole	A375	TUBB	tubulin polymerization inhibitor
BRD-K10361096	A375	Unknown	Unknown
BRD-K90700939	PC3	Unknown	Unknown
BRD-K29506255	PC3	Unknown	Unknown
BRD-K75477256	VCAP	Unknown	Unknown
rhamnetin	MCF7	Unknown	Unknown
irinotecan	VCAP	TOP1, TOP1MT	topoisomerase inhibitor