

Marcela Nunes Rosa

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE EXTRATOS
NATURAIS DE PLANTAS E TERAPIAS-ALVO EM LINHAGENS TUMORAIS DE COLO
UTERINO COMERCIAIS E PRIMÁRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2020

Marcela Nunes Rosa

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE EXTRATOS
NATURAIS DE PLANTAS E TERAPIAS-ALVO EM LINHAGENS TUMORAIS DE COLO
UTERINO COMERCIAIS E PRIMÁRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2020

R788c Rosa, Marcela Nunes.

Caracterização in vitro do potencial antineoplásico de extratos naturais de plantas e terapias-alvo em linhagens tumorais de colo uterino comerciais e primárias. / Marcela Nunes Rosa. - Barretos, SP 2020.

169 f. : il.

Orientador: Rui Manuel Reis.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

1. Câncer de colo uterino. 2. Cultura primária. 3. Compostos bioativos de plantas. 4. Terapia alvo molecular. 5. Testes de toxicidade. 6. Ensaio pré-clínico. I. Autor. II. Reis, Rui Manuel. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FINEP (MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT-01/2013 - FPXII- BIOPLAT - Processo número 01.13.0469.00), e concessão de bolsas sob os números 384088/2014-7 e 380434/2015-6.

Também recebeu apoio do Programa CAPES/DFATD, processo número 88887.137279/2017-00.

“Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos”.

*Dedico este trabalho a minha família,
especialmente ao pequeno Raul.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Rui e à pesquisadora Dra. Viviane Aline pela oportunidade de fazer parte do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), lá em 2012. De lá para cá foram aprendizados sem tamanho, superação de muitos obstáculos, muitas angústias, mas também imensas alegrias. Estar aqui me possibilitou evoluir em tantos aspectos, que me sinto muito afortunada por ter sabido, a meu modo, abraçar e estar aberta a cada nova situação ou desafio. Espero que eu tenha contribuído positivamente com algum aspecto da jornada de vocês também.

A cada uma dessas pessoas que contribuíram nas etapas desta tese: Dra. Adriane Feijó Evangelista (pela análise do exoma), Dra. Ana Carolina Laus (pelo protocolo de expressão do Nanostring), Msc. Anna Luiza S. A. Vicente e Dr. Matias Melendez (pelo protocolo do meio de cultura das primárias), Dra. Carla Carolina Munari (pelas discussões e execução de protocolos de estabelecimento de cultura primária), Dra. Cristina Mendes de Oliveira (pelas análises envolvendo HPV), Débora Sant'Anna de Andrade e Silva (pela análise de ancestralidade), Msc. Fernanda Franco Munari (pela PCR para detecção de HPV da HCB-514), Msc. Izabela Natália Faria Gomes (pelas discussões sobre as combi-moléculas), Dra. Letícia Ferro Leal (pela análise de CNV do Nanostring), Dra. Luciane Sussuchi da Silva (pela análise de expressão do Nanostring), Msc. Rhafaela Lima Causin (pelas alíquotas de RNA da HaCat e HCB-514), Dra. Viviane Aline Oliveira Silva (pelo protocolo do array-RTK).

Ao Biotério, pelas discussões e auxílio na parte *in vivo*: Dra. Sílvia Aparecida Teixeira, Mayara Cássia Luzzi, Msc Mônica de Oliveira Leal e Natalia Schueroff Girardi

Ao Núcleo de Apoio ao Pesquisador, pela aplicação dos termos de consentimento às pacientes: Lígia Zampieri de Britto e Msc. Júlio César de Souza.

Ao Diagnóstico Molecular: Dra. Flávia de Paula (pela análise de STR) e Msc. Gabriela Fernandes (pelo sequenciamento de Sanger).

À Citogenética, pela técnica de FISH: Msc. Maicon Zanon.

Aos Departamentos envolvidos: Ginecologia Oncológica, Patologia, Pós-Graduação, Eventos, Biobanco, Bioinformática.

À Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJDR), por fornecer os extratos naturais testados: Dra. Rosy I. M. de A. Ribeiro.

À Universidade canadense McGill, por fornecer as moléculas sintetizadas e pela experiência do doutorado sanduíche: Dr. Bertrand Jean-Claude, Dra. Julie Smith e Msc. Elliot Goodfellow.

Aos biólogos de ontem e hoje do CPOM, pelo esclarecimento de dúvidas sobre alguns protocolos, pelo suporte na rotina do laboratório e pelos testes de micoplasma: Adriana, André, Carolina, Letícia, Karina e Renato.

Aos peculiares amigos do CPOM, mesmo os de passagem, de ontem e hoje. Pelas conversas filosóficas, piadas, desabafos, ajudas, comemorações e passeios: Aline Rocha, Aline Taissa, Ana Laura, Ana Rúbia, Ângela, Ariane, Bruna, Carla, Cíntia, Elisa, Fernanda Cury, Fernanda Munari, Giovanna, Guilherme, Izabela (também pela companhia e apoio durante o doutorado sanduíche), Karen, Karina, Larissa, Lucas, Maraísa, Marina, Murilo, Patrik, Nathália Campacci, Paula Felício (também pela companhia e apoio durante o doutorado sanduíche), Renan, Rhafaela, Viviane, Weder e Yollanda.

À minha mãe Isabel e ao meu pai Paulo, pelo dom da vida. À minha mãe, novamente, por ser meu exemplo de garra, superação e alegria, por me apoiar nas minhas escolhas e pelo amor incondicional.

À minha irmã Juliana, meu sobrinho Raul e meu irmão Igor, pelo amor, carinho e atenção ao longo destes anos.

Aos meus demais familiares e amigos. Me sinto muito feliz de ter crescido no meio de vocês.

A Deus, pela minha saúde, pelas coisas boas em meu caminho e por me dar forças nos momentos difíceis.

*"Somos poeira das estrelas, nada além
Frutos do acaso, soltos no tempo como nuvens
Luzes que cortam horizontes quando surgem
Ciclos que fecham, sabe, assim como tu vens."*

(Adaptado da música Mantra, de Rubel)

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer de colo uterino	
1.2. HPV e o câncer de colo uterino	3
1.3. Evolução da doença	5
1.4. Tratamento de acordo com o estadiamento	7
1.5. Terapia a alvos moleculares	8
1.6. Terapias alvo-combinadas	9
1.7. Produtos naturais como fonte de novos fármacos	10
1.8. Plantas como fonte de compostos antineoplásicos no Brasil	11
1.9. Modelo in vitro com linhagens tumorais humanas	12
	14
2. JUSTIFICATIVA	
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
3.2.1. Estabelecer e caracterizar novas linhagens tumorais de colo uterino provenientes de amostras de pacientes brasileiras	15
3.2.2. Avaliar o potencial antineoplásico de extratos naturais com origem no cerrado brasileiro, em linhagens tumorais de colo uterino	15
3.2.3. Investigar a atividade antineoplásica de combi-moléculas, com dupla função (inibidora de EGFR/HER2 e alquilante do DNA), em linhagens tumorais de colo uterino.	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Estabelecimento e caracterização de linhagens tumorais de colo uterino	16
4.1.1. Cultivo de linhagens primárias	16
4.1.2. Caracterização imunofenotípica de culturas primárias	17
4.1.3. Isolamento do DNA	19
4.1.4. Avaliação do vírus do papiloma humano (HPV)	19
4.1.5. Análise do sequenciamento total do exoma (WES)	20
4.1.6. Sequenciamento por Sanger do gene BRCA2	21
4.1.7. Análise da variação do número de cópias (CNV)	22
4.2. Cultivo de linhagens comerciais	22
4.3. Avaliação do potencial antitumoral de extratos naturais e de combi-moléculas	23

4.3.1. Origem dos extratos naturais	23
4.3.1.1. Procedimentos realizados na UFSJ para obtenção de extratos brutos, partições e frações	23
4.3.2. Origem das combi-moléculas	24
4.4. Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC50	25
4.5. Análise da migração e invasão celular	26
4.6. Análise do potencial clonogênico celular	26
4.7. Análise da viabilidade celular na cultura em 3 dimensões	27
4.8. Análise das vias de sinalização celular	27
4.9. Análise do ciclo celular	29
4.10. Análise da morte celular	29
4.11. Hibridização fluorescente in situ	30
4.12. Análise do crescimento tumoral em camundongos	31
4.12.1. Procedimentos para a linhagem HCB-514	31
4.13. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Estabelecimento e caracterização de uma nova linhagem tumoral de colo uterino proveniente da amostra de uma paciente brasileira	33
5.1.1. Estabelecimento e cultivo de células primárias	33
5.1.2. Caracterização imunofenotípica da linhagem	33
5.1.3. Status e genotipagem do HPV na linhagem	37
5.1.4. Identificação da linhagem	38
5.1.5. Avaliação do perfil mutacional da linhagem	38
5.1.6. Avaliação da variação do número de cópias (CNV) dos genes da linhagem	49
5.1.7. Avaliação da expressão gênica na linhagem HCB-514	52
5.1.8. Integração entre CNA e expressão gênica na linhagem HCB-514	54
5.1.9. Avaliação do potencial tumorigênico da linhagem em camundongos	54
5.1.9.1 Avaliação histopatológica e imunoistoquímica dos tumores xenográficos da HCB-514	56
5.2. Avaliação do potencial antineoplásico de extratos naturais em linhagens de colo uterino	58
5.2.1. Triagem inicial com extratos brutos obtidos de diferentes espécies de plantas	58
5.2.2. Triagem com partições obtidas da planta <i>Annona crassiflora</i>	60
5.2.3. Triagem com frações obtidas da planta <i>Annona crassiflora</i>	61
5.2.4. Identificação de grupos de compostos e prováveis moléculas na espécie <i>A. crassiflora</i>	64

5.2.3.1. Modulação de vias de sinalização por 7C24 de <i>Annona crassiflora</i>	70
5.2.3.2. Avaliação do ciclo celular com a fração 7C24 de <i>Annona crassiflora</i>	70
5.3. Investigação da atividade antineoplásica de combi-moléculas, com dupla função (inibidora de EGFR/HER2 e alquilante do DNA), em linhagens de colo uterino	72
5.3.1 Avaliação da viabilidade celular	72
5.3.2. Efeito das combi-moléculas no potencial de migração celular	76
5.3.3. Efeito das combi-moléculas no potencial de invasão celular	78
5.3.4. Atividade das combi-moléculas na formação de colônia (potencial clonogênico)	80
5.3.5. Avaliação da viabilidade na cultura em 3D	82
5.3.6. Avaliação do efeito dos tratamentos no ciclo celular	85
5.3.6.1. Distribuição nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo	85
5.3.6.2. Expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular	90
5.3.7. Avaliação do efeito dos tratamentos nos processos de morte celular	91
5.3.7.1. Análise da externalização de fosfatidilserina e integridade da membrana plasmática por citometria de fluxo	91
5.3.7.2. Expressão de proteínas envolvidas na morte celular	95
5.3.7.3. Efeito de ZR2002 na linhagem CaSki após 6, 12 h de tratamento	98
5.3.8. Avaliação das proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização	101
5.3.9. Avaliação do status de <i>EGFR</i> na linhagem C4-I	103
6. DISCUSSÃO	104
6.1. Estabelecimento e caracterização de uma nova linhagem tumoral de colo uterino proveniente de paciente brasileira	105
6.2. Avaliação do potencial antineoplásico de extratos naturais em linhagens de colo uterino	108
6.3. Investigação da atividade antineoplásica de combi-moléculas, com dupla função (inibidora de EGFR e alquilante do DNA), em linhagens de colo uterino	110
7. CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS	117
ANEXOS	126

Anexo A - Parecer de aprovação do CEP	127
Anexo B - Parecer de aprovação do CEUAP	128
Anexo C - Artigo publicado	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características do câncer.	2
Figura 2 -	Mortalidade em mulheres por câncer no mundo (à esquerda) e no Brasil (à direita) em 2018.	3
Figura 3 -	Representação da carcinogênese do colo uterino e a relação com o status do HPV.	6
Figura 4 -	Estrutura química de ZR2002	25
Figura 5 -	Fotomicrografia de cultura primária após coloração HE e imunocitoquímica.	35
Figura 6 -	Imagens representativas das imunoistoquímicas de cortes de cell block da HCB-514 (cima) e do tecido tumoral da paciente (baixo).	36
Figura 7 -	Avaliação da expressão da molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) na HCB-514.	36
Figura 8 -	Detecção de HPV GP5+ / GP6+ após PCR por eletroforese em gel de agarose (A) e teste de proteína OncoE6 (B).	37
Figura 9 -	Imagem do IGV dos resultados de NGS do exoma do gene BRCA2.	39
Figura 10 -	Heatmap dos mRNA diferencialmente expressos na HCB-514 em comparação à HaCat.	53
Figura 11 -	Imagens dos animais antes da inoculação (Dia 0) e ao longo do crescimento tumoral após inoculação.	55
Figura 12 -	Imagem do animal 03 injetado com 5×10^6 células HCB-514, 29 dias após inoculação e o tumor após excisão.	55
Figura 13 -	A) Imagens dos tumores após excisão. Gráficos contendo B) volume tumoral e C) peso de cada animal ao longo das medições	56
Figura 14 -	Imagens representativas das imunoistoquímicas dos tumores retirados.	57

Figura 15 -	Efeito dos extratos de diferentes espécies de plantas nas linhagens tumorais de colo uterino.	59
Figura 16 -	Efeito das partições hidroalcoólica (A), hexânica (B), clorofórmica (C) e acetato de etila (D) e de <i>A. crassiflora</i> nas linhagens tumorais de colo uterino.	61
Figura 17 -	Efeito das diferentes frações da partição clorofórmica de <i>A. crassiflora</i> nas linhagens tumorais de colo uterino.	62
Figura 18 -	Efeito das diferentes frações da partição acetato de etila de <i>A. crassiflora</i> nas linhagens tumorais de colo uterino.	63
Figura 19 –	Dados sobre espectrometria de massas da partição 7C de <i>A. crassiflora</i>	66
Figura 20 –	Dados sobre espectrometria de massas da partição 7C24 de <i>A. crassiflora</i>	68
Figura 21 -.	Avaliação do efeito de 7C24 em proteínas envolvidas em processos celulares nas linhagens SiHa e HeLa	70
Figura 22 -	Representação dos resultados do ciclo celular na SiHa, 24 h após tratamento com 7C24.	71
Figura 23 -	Curvas dose-resposta das combi-moléculas testadas em linhagens tumorais de colo uterino, na NIH3T3 e na HaCaT.	74
Figura 23 -	Efeito das combimoléculas em linhagens tumorais de colo uterino.	75
Figura 24 -	Imagens representativas do ensaio de migração por inserto.	77
Figura 25 -	Avaliação do efeito das moléculas na migração celular a partir da quantificação das imagens.	78
Figura 26 -	Imagens representativas do ensaio de invasão por inserto.	79
Figura 27 -	Avaliação do efeito das moléculas na invasão celular a partir da quantificação das imagens.	80
Figura 28 -	Ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem 14 dias após tratamento.	82

Figura 29 -	Imagem aumentada do ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem 14 dias após tratamento.	82
Figura 30 -	Quantificação do ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem 14 dias após o tratamento com as doses de 2 e 20 μ M.	82
Figura 31 -	Imagens representativas dos esferoides da linhagem SiHa 10 dias após os tratamentos (total de 14 dias em cultura)	84
Figura 32 -	Gráfico representativo da viabilidade celular da linhagem SiHa, 10 dias após tratamento	85
Figura 33 -	Efeito das combimoléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na distribuição do ciclo celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical CaSki	86
Figura 34 -	Efeito das combimoléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na distribuição do ciclo celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical HCB514	88
Figura 35-	Efeito das combimoléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na distribuição do ciclo celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical SiHa.	89
Figura 36-	Expressão da proteína p21 na linhagem CaSki após tratamento com ZR2002 ao longo de 6, 12 e 24 h	90
Figura 37-	Expressão das proteínas p21 e p27 na linhagem SiHa após 24 h de tratamento com ZR2002, JS84 e demais drogas	91
Figura 38-	Efeito das combimoléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na morte celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical CaSki	92
Figura 39-	Efeito das combimoléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na morte celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical HCB514	93
Figura 40 -	Efeito das combimoléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na morte celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical SiHa.	94

Figura 41-	Expressão da proteína PARP em sua forma total (115 KDa) e clivada (89 KDa) nas linhagens CaSki (A), HCB514 (B) e SiHa (C) após 24 h de tratamento com ZR2002, JS84 e demais drogas indicadas na figura	96
Figura 42-	Expressão da proteína caspase 3 (prócaspase e clivada) na linhagens HCB-514 após 24 h de tratamento com ZR2002, JS84 e demais drogas indicadas na figura.	97
Figura 43-	Expressão das proteínas caspase3 clivada e caspase9 (prócaspase e clivada) na linhagem SiHa após 24 h de tratamento com ZR2002, JS84 e demais drogas indicadas na figura.	98
Figura 44-	Efeito de ZR2002 (2 e 20 μ M) na linhagem CaSki após 6, 12 e 24 h de tratamento	100
Figura 45-	Expressão do receptor de EGF nas linhagens cervicais em condições basais e após estimulação com o ligante por 15 minutos.	101
Figura 46 -	Efeito das combimoléculas e demais tratamentos na fosforilação de EGFR e de ERK, proteína envolvida na cascata de sinalização após ativação de EGFR	102
Figura 47-	Efeito das combimoléculas ZR2002 (2 e 20 μ M) e JS84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na fosforilação de H2AX, indicadora de dano ao DNA	103
Figura 48 -	Arranjo de RTK da linhagem C4I no estado basal (cima) e estimulada (baixo)	104
Figura 48 -	Imagens representativas do FISH	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Meio para queratinócitos.	17
Tabela 2 -	Solução enzimática para desagregação celular.	17
Tabela 3 -	Descrição das linhagens utilizadas.	22
Tabela 4 -	Perfil de STR da cultura primária e do sangue da paciente que a originou.	38
Tabela 5 -	Total das 93 mutações não silenciosas encontradas na linhagem HCB-514.	39
Tabela 6 -	Total das 70 mutações não silenciosas encontradas no tumor.	43
Tabela 7 -	Mutações somáticas não silenciosas comuns à HCB-514 e ao tumor primário.	47
Tabela 8 -	Regiões com amplificação no número de cópias na linhagem HCB-514.	50
Tabela 9 -	Regiões com deleção no número de cópias na linhagem HCB-514.	51
Tabela 10 -	Regiões com alteração no número de cópias no tumor.	52
Tabela 11 -	Média (\pm E.P.M.) do volume tumoral (em mm ³) em cada grupo	55
Tabela 12 -	Identificação dos extratos testados.	58
Tabela 13 -	Valores de IC ₅₀ em µg/mL (média \pm D.P.) das partições da <i>Annona crassiflora</i> nas linhagens tumorais de colo uterino	61
Tabela 14 -	Valores de IC ₅₀ das frações de <i>A. crassiflora</i> e do quimioterápico usado na prática clínica.	64
Tabela 15 -	Deteção de compostos secundários presentes nos extratos da planta <i>A. crassiflora</i> através de estudo fitoquímico.	65

Tabela 16 -	Estruturas propostas por ESI(-)FT-ICR MS para a partição 7C	67
Tabela 17 -	Estruturas propostas por ESI(-)FT-ICR MS para a fração 7C24	69
Tabela 18 -	Valores de IC50 em μM (Média \pm E.P.M.).	75
Tabela 19 -	Índice de seletividade (IS) das combi-moléculas.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B (ou PKB)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina bovina
c-MET	Receptor do fator de crescimento hepatócito (ou HGFR)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
E2F1	Fator de transcrição E2F1
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Fator de crescimento epitelial
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
ErbB2/HER2	Receptor do fator de crescimento epitelial 2
ErbB3/HER3	Receptor do fator de crescimento epitelial 3
ErbB4/HER4	Receptor do fator de crescimento epitelial 4
FDA	Food and Drug Administration
H2AX	Histone 2AX
HPV	Papiloma vírus humano
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
JAK	Proteína Janus kinase
kDa	Kilo-dalton

KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTS	3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
P/S	Solução de penicilina e estreptomicina
p16	proteína p16
p21	proteína p21
p27	Proteína 27
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Propidium Iodide
PIK3CA	Fosfoinosítídeo 3-quinase ou fosfatidilinositol 3-quinases
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RTKs	Receptores tirosine quinase
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil-sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNVs	Single nucleotide variants
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STR	Short tandem repeat

TCGA The Cancer Genome Atlas

TKI Inibidores tirosina quinase

RESUMO

Rosa MN. *Caracterização in vitro do potencial antineoplásico de extratos naturais de plantas e terapias-alvo em linhagens tumorais de colo uterino comerciais e primárias. Tese (Doutorado).* Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2020.

Introdução: O câncer de colo uterino é um importante problema de saúde pública no Brasil. Embora a cirurgia e a radioquimioterapia sejam eficazes nos casos em estágio inicial, o tratamento do câncer do colo uterino avançado continua sendo insatisfatório. Na busca por novos tratamentos, várias etapas são necessárias, incluindo ensaios pré-clínicos, onde a busca de modelos mais fidedignos é uma constante. A utilização de linhagens tumorais é amplamente disseminada, no entanto, a representação de linhagens tumorais de colo uterino disponíveis é bastante escassa. Uma das fontes mais importantes de novos e eficazes fármacos é a flora, cuja maior biodiversidade está no Brasil. Além disso, a combinação de terapias-alvo, pode contribuir para um importante avanço no tratamento do câncer do colo uterino. **Objetivos:** Neste trabalho pretendeu-se: i) estabelecer e caracterizar linhagens tumorais de colo uterino, ii) avaliar o potencial antineoplásico de extratos naturais com origem no cerrado brasileiro, em linhagens tumorais de colo uterino; e iii) investigar a atividade antineoplásica de uma nova abordagem denominada combi-moléculas (um única molécula com propriedades anti-EGFR e agente alquilante de DNA) em linhagens tumorais de colo uterino. **Metodologia e Resultados:** Dentre 35 amostras processadas, a única cuja cultura cresceu continuamente foi a HCB-514, que teve sua natureza epitelial e tumoral confirmada através das marcações de citoqueratinas, EpCAM e p16. Ela também foi positiva para o HPV-16 e sua oncoproteína viral E6. O sequenciamento completo do exoma (WES) mostrou mutações em vários genes, incluindo *BRCA2* e *TGFBR1*. A análise de variação do número de cópias (CNV) por nanostring e WES revelaram amplificação de genes relacionados principalmente às proteínas cinases envolvidas na proliferação, migração e diferenciação celular, como *EGFR*, *PIK3CA* e *MAPK7*. Além disso, foi capaz de formar tumores quando inoculadas em camundongos *NOD scid gamma* (NSG). Com relação à triagem com os extratos naturais derivados do

Cerrado Brasileiro, a espécie *Annona crassiflora* foi a que apresentou menores valores de IC₅₀ no ensaio de MTS em um total de 13 extratos analisados. O tratamento com uma de suas frações, 7C24, foi capaz de modular a expressão de proteínas envolvidas com dano ao DNA (p-H2AX), morte (PARP clivada) e ciclo celular (p21), promovendo também parada no ciclo na fase G0/G1 da linhagem SiHa, através de Western blot e citometria. Por último, o estudo das combi-moléculas, ZR2002, JS-84 e JS-61 mostrou que elas foram capazes de reduzir a viabilidade das linhagens avaliadas por MTS, sendo ZR2002 e JS-84 mais eficazes do que JS-61. Além disso, ZR2002 e JS-84 inibiram a migração de CaSki, HCB-514 e SiHa 24h após tratamento, bem como a formação de colônias em CaSki e SiHa após 14 dias de tratamento e o crescimento de esferoides de SiHa, 10 dias após tratamento. Através do ensaio de Western blot, foi confirmada a atividade inibidora de EGFR e de indução de dano ao DNA destas moléculas, com redução da fosforilação de EGFR e indução da expressão de p-H2AX, respectivamente. Além disso, principalmente para as linhagens mais sensíveis, ZR2002 e JS-84 promoveram alterações que, em conjunto, indicam morte celular pela via íntinseca da apoptose, além de parada no ciclo celular na fase G0/G1 ou G2/M.

Conclusão: A nova linhagem tumoral estabelecida poderá ser usada tanto como modelo em estudos pré-clínicos, como para a melhor compreensão sobre as características dos tumores de colo uterino. A fração 7C24 apresentou bioatividade, que pode ser atribuída a uma das moléculas presentes, o kampferol-3-O-rhamnoside. Por fim, foi demonstrado o potencial terapêutico de combinar, em uma única molécula, a inibição de um alvo específico (EGFR) com um agente alquilante em um tipo tumoral cujas terapias-alvo ainda são tão pouco exploradas ou pouco eficazes quando em monoterapia

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de colo uterino; cultura primária; Compostos bioativos de plantas; terapia alvo molecular; testes de toxicidade; ensaio pré-clínico.

ABSTRACT

Rosa MN. *In vitro* characterization of the antitumoral potential of plant natural extracts and target therapies in commercial and primary cervical cancer cell lines.

Thesis (PhD). Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2020.

Introduction: Cervical cancer is an important public health problem in Brazil. Although surgery and radiotherapy are effective in early stage cases, the treatment of advanced cervical cancer remains unsatisfactory. In the search for new treatments several steps are necessary, including pre-clinical trials, where the search for more reliable models is a constant. The use of cancer cell lines is widespread, however, the representation of available cervical cancer cells is quite scarce. One of the most important sources of new and effective drugs is found in flora, whose the greatest biodiversity is in Brazil. In addition, the combination of target therapies can contribute to an important advance in the treatment of cervical cancer. **Objectives:** The aim of this work was: i) to establish and characterize cervical tumor cell lines, ii) to evaluate the antineoplastic potential of plant natural extracts from the Brazilian cerrado, in cervical cancer cell lines; and iii) to investigate the antineoplastic activity of a new approach called combi-molecules (a single molecule with anti-EGFR properties and DNA alkylating agent) in cervical cancer cell lines. **Methodology and Results:** Among 35 samples processed, the only one whose culture grew continuously was HCB-514, which had its epithelial and tumor nature confirmed by the cytokeratine, EpCAM and p16 markers. It was also positive for HPV-16 and its viral oncoprotein E6. Whole exome sequencing (WES) showed mutations in several genes, including *BRCA2* and *TGFBR1*. The analysis of copy number variation (CNV) by nanostring and WES revealed amplification of genes related mainly to protein kinases involved in cell proliferation, migration and differentiation, such as *EGFR*, *PIK3CA* and *MAPK7*. In addition, it was able to form tumors when inoculated in NOD scid gamma (NSG) mice. Regarding the screening with the natural extracts derived from the Brazilian Cerrado, the species *Annona crassiflora* was the one with the lowest IC50 values in the MTS assay, in a total of 13 extracts analyzed. The treatment with one of its fractions, 7C24, was able to modulate the expression of proteins involved with DNA damage (p-H2AX), cell death (PARP cleaved) and cell cycle

(p21), also promoting cell cycle arrest in phase G0/G1 of SiHa cell line, by Western blot and cytometry analysis. Finally, the study of combi-molecules, ZR2002, JS-84 and JS-61 showed that they were able to reduce the viability of the strains evaluated by MTS, with ZR2002 and JS-84 being more effective than JS-61. In addition, ZR2002 and JS-84 inhibited the migration of CaSki, HCB-514 and SiHa 24h after treatment, as well as the formation of colonies in CaSki and SiHa after 14 days of treatment and the growth of SiHa spheroids, 10 days after treatment. Through the Western blot assay, the EGFR inhibitory activity and the DNA damage induction of these molecules were confirmed, with reduction of EGFR phosphorylation and induction of p-H2AX expression, respectively. In addition, mainly for the most sensitive cells (CaSki and HCB-514), ZR2002 and JS-84 promoted changes that indicate cell death through intrinsic apoptosis, in addition to cell cycle arrest in the G0/G1 or G2/M phase. **Conclusion:** The new established tumor cell can be used both as a model in preclinical studies and for a better understanding of the characteristics of cervical tumors. The 7C24 fraction showed bioactivity, which can be attributed to one of the molecules present, kampferol-3-O-rhamnoside. Finally, it was demonstrated the therapeutic potential of combining, in a single molecule, the inhibition of a specific target (EGFR) with an alkylating agent in a tumor type whose target terpias are still so little explored or ineffective when in monotherapy.

KEYWORDS: Uterine Cervical Neoplasms; primary cell culture; phytochemicals; molecular targeted therapy; toxicity tests; preclinical studies.

1. INTRODUÇÃO

Embora as doenças cardiovasculares sejam a principal causa de morte no mundo, o câncer já vem ocupando a primeira posição em países de renda alta e média alta ¹. Em 2018, foram esperados 18,1 milhões novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes em decorrência desta doença ². Os tumores que mais vêm causando mortes são: pulmão, colorretal, estômago e fígado ². No Brasil, para o ano de 2020, são esperados 625.000 novos casos de câncer ³. Os que mais vêm causando morte em homens são: pulmão, próstata e colorretal, enquanto em mulheres são: mama, pulmão e colorretal⁴.

O câncer é um termo genérico usado para um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado das células do corpo ⁵. As células tumorais apresentam alterações moleculares bastante características, relacionadas aos seguintes mecanismos: proliferação descontrolada; evasão de mecanismos supressores do crescimento celular; ativação de invasão e metástase; potencial de replicação ilimitado (imortalização); indução de angiogênese; resistência à morte celular; desregulação do metabolismo energético celular; instabilidade genômica e mutação; escape da ação supressora do sistema imune e inflamação ⁶.

A compreensão dos mecanismos relacionados a estas características é essencial para a elaboração de estratégias terapêuticas contra o câncer, principalmente de terapias personalizadas ou terapias-alvo. O conceito de terapia-alvo pode ser definido como o direcionamento de uma substância para um gene ou proteína específicos e que estão diferencialmente expressos no tumor ou no microambiente tumoral, de forma que esta substância consiga atingir especificamente estes alvos e inibir o crescimento tumoral, sem afetar as células normais ⁷. Neste sentido, as terapias a alvos moleculares têm produzido bons resultados contra diferentes tipos de tumores ⁸.



Figura 1 - Características do câncer. (Adaptado de Hanahan & Weingerg, 2011)⁶.

1.1. Câncer de colo uterino

O câncer de colo uterino é um importante problema de saúde pública no mundo, configurando-se o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, excluindo tumores de pele não melanoma (TPNM)². No ano de 2018, foram estimados cerca de 570 mil novos casos, com uma taxa de mortalidade de 311 mil pessoas no mundo todo (Figura 2)². No Brasil, a mortalidade em mulheres por este tipo de câncer acompanha as estimativas mundiais, representando a quarta causa de morte por câncer, excluindo TPNM⁹, com o número de mortes em 2017 de 6.385 mulheres. A faixa etária frequentemente acometida é de 50 a 60 anos, podendo ocorrer a partir dos 30^{4,10}.

Para o Brasil, até o final do ano de 2020 serão esperados 16.590 novos casos de câncer do colo do útero com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva³. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos^{4,10}. Uma provável explicação para as altas taxas de incidência em países em desenvolvimento seria a inexistência ou a pouca eficiência dos programas de rastreamento⁵.

Desconsiderando os TPNM, o câncer do colo do útero é o segundo mais incidente nas regiões Norte (21,20/ 100 mil), Nordeste (17,62/ 100 mil) e Centro-Oeste (15,92/ 100 mil), o quarto na região Sul (17,48/ 100 mil) e o quinto na região sudeste (12,01/ 100 mil)³.

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é considerada como principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e do câncer do colo do útero. Zur Hausen e colaboradores (2009) demonstraram que o papilomavírus humano (HPV) está presente em 99,7% dos casos desse tipo de câncer. Os subtipos de HPV de maior risco são o HPV-16 e o HPV-18, também associados a outros tipos tumorais¹¹.

Além dos aspectos relacionados ao vírus, tipo e carga viral, outros fatores como tabagismo, iniciação sexual precoce, multiplicidade de parceiros sexuais, multiparidade e uso de contraceptivos orais são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de câncer do colo do útero¹².

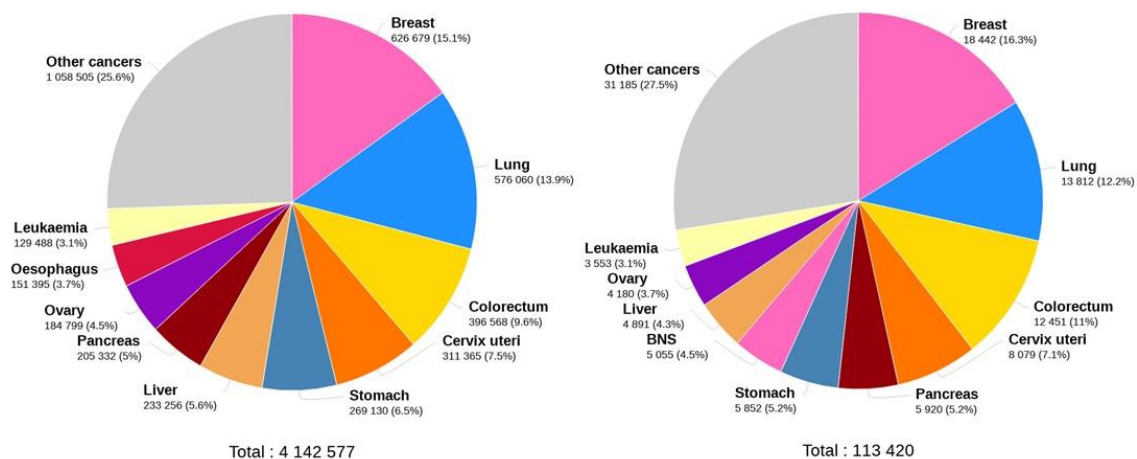


Figura 2 - Mortalidade em mulheres por câncer no mundo (à esquerda) e no Brasil (à direita) em 2018, excluindo tumores de pele não-melanoma. BNS= Sistema nervoso central (*Brain, central nervous system*). Fonte: GLOBOCAN, 2018 Gráfico gerado por: Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.fr>).

1.2. HPV e o câncer de colo uterino

A infecção pelo HPV é muito comum e, por si só, não representa uma causa suficiente para o surgimento da neoplasia. No entanto, quando a infecção é persistente, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões precursoras, denominadas de neoplasias intraepiteliais cervicais, que se não tratadas, em uma porcentagem dos

casos evoluem para o câncer ¹⁰. Na grande maioria dos casos, a infecção regride espontaneamente.

O HPV é um vírus que contém DNA dupla-fita e que infecta preferencialmente tecidos epiteliais. Cerca de 100 diferentes tipos de HPV foram identificados e, dentre eles, 40 estão associados com infecções no trato genital ¹¹.

Uma vez que o HPV se instala no hospedeiro, através de microlesões presentes no tecido epitelial, os principais alvos para eles são os queratinócitos na camada basal do epitélio escamoso. Nas células infectadas, o DNA viral geralmente é mantido como um episoma, ou seja, ele permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, mas sem ser integrado ao DNA do hospedeiro. No entanto, quando ocorre a integração com o DNA hospedeiro, a infecção pode causar uma instabilidade genômica, com subsequente imortalização celular e transformação ¹³.

O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões principais: uma região inicial (E; *early* em inglês), uma região tardia (L, *late*, em inglês) e uma região longa não codificante (RCL). A região E contém seis genes que codificam para proteínas não-estruturais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A região L codifica duas proteínas estruturais L1 e L2. As proteínas E1, E2, E4 e E5 são responsáveis pela replicação do DNA viral, enquanto E6 e E7 cooperam para transformação e imortalização das células. L1 e L2 são responsáveis pela produção de partículas virais. Uma vez que ocorre integração do DNA viral ao DNA hospedeiro, os genes E1 e E2 geralmente são suprimidos. Uma das funções das proteínas E2 é reprimir a expressão dos genes E6 e E7, sendo assim, com a perda de E2, os níveis de proteínas E6 e E7 se elevam, induzindo a transformação das células. Essa indução ocorre devido à capacidade de E6 se ligar e inativar a proteína supressora tumoral p53, enquanto E7 inativa a proteína Rb, também uma importante proteína supressora tumoral ^{13, 14}.

A inativação da proteína p53 pela E6 pode ocorrer tanto devido à degradação de p53, após ligação de E6; como também devido ao impedimento da ligação de p53 ao DNA, da localização aberrante de p53 e de modificações pós-translacionais ¹⁵. Por sua vez, a proteína p53 não se ligará aos promotores dos genes responsivos a ela, tais como CDKN1A e BAX, o que causará uma falha na inibição do ciclo celular e na indução de apoptose, respectivamente, contribuindo para um aumento da proliferação celular

A ligação da proteína E7 com Rb impede que Rb se ligue aos fatores de transcrição da família E2F, dessa forma, não ocorre repressão dos genes da fase-S controlados por E2F, resultando em constante divisão celular¹⁷.

Dessa forma, infecções com HPV de alto-risco como o 16 ou 18 podem levar à neoplasia intraepitelial cervical (NIC) em algumas mulheres. Esses mesmos tipos também estão relacionados com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço¹⁸.

1.3. Evolução da doença

O câncer do colo do útero e as lesões que antecedem seu surgimento podem ser divididos histologicamente, de acordo com o epitélio do qual se originaram. Desse modo, podem ser de origem escamosa, glandular ou mista¹². Os carcinomas de células escamosas (CCE) são o tipo mais comum, representando 75% dos casos; os adenocarcinomas (AC) representam cerca de 20%; já os carcinomas adenoescamosos, cerca de 5%^{10,19} dos números registrados para a doença. Para identificar e avaliar a extensão das alterações epiteliais precursoras do câncer do colo uterino foi introduzido o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Nesse sistema, as lesões são categorizadas da seguinte maneira: NIC 1 equivale à displasia leve; NIC 2, à displasia moderada; NIC 3, à displasia severa e carcinoma *in situ*¹². Diante da diversidade de sistemas de classificação, foi necessário que se uniformizasse a terminologia usada. Assim, o sistema de Bethesda introduziu os seguintes termos: lesão intraepitelial escamosa de baixo (LIEBG) e alto grau (LIEAG). Nas diferentes classificações, LIEBG equivale à NIC 1 e à displasia leve. Já LIEAG equivale à NIC 2 e 3, displasia moderada e severa e ao carcinoma *in situ* (Figura 3)¹².

Conforme mencionado anteriormente, as alterações nas células epiteliais ocorrem principalmente devido à integração do genoma viral com o DNA do hospedeiro, causando a inativação das proteínas supressoras tumorais p53 e Rb. Na progressão da NIC 1 para a NIC 2, ocorre a supressão do sistema imune, bem como o aumento na proliferação celular. De NIC 2 para NIC 3, observa-se um aumento de fatores relacionados com a transição estroma-epitélio e angiogênese. A transição de NIC 3 para o carcinoma invasor ainda não está completamente esclarecida, mas sabe-se que a instabilidade genômica é um fator bastante relevante²⁰.

Nesse sentido, alguns estudos sugerem que o surgimento de mutações em alguns oncogenes ou em genes supressores tumorais podem contribuir para a evolução de NIC 3 para o carcinoma. Ojesina e colaboradores (2014) reportaram a presença de mutações nos genes *PIK3CA*, *STK11*, *PTEN*, *HLA-B*, *EP300* e *NFLE2L2*, tanto nos CCEs quanto nos ACs, sendo que as três últimas mutações foram mais frequentes nos CCEs. Mutações em *FBXW7* e *MAPK1* ocorreram somente em CCEs, já as mutações em *ELF3* e *CBFB* foram exclusivas dos ACs ²¹. Em um trabalho mais recente, foi sugerido que mutações em *PIK3CA*, *STK11*, *P53* ou *MAPK1* são os eventos essenciais na progressão do CCE ²². Além disso, Wright e colaboradores propuseram a distinção entre os CCEs e os ACs baseada em uma assinatura genômica. Neste trabalho, somente os CCEs apresentaram mutações em *EGFR* e somente os ACs apresentaram mutações em *KRAS*. Ambos os tipos histológicos apresentaram mutações nos genes *PIK3CA*, *STK11* e *PTEN* ²³.

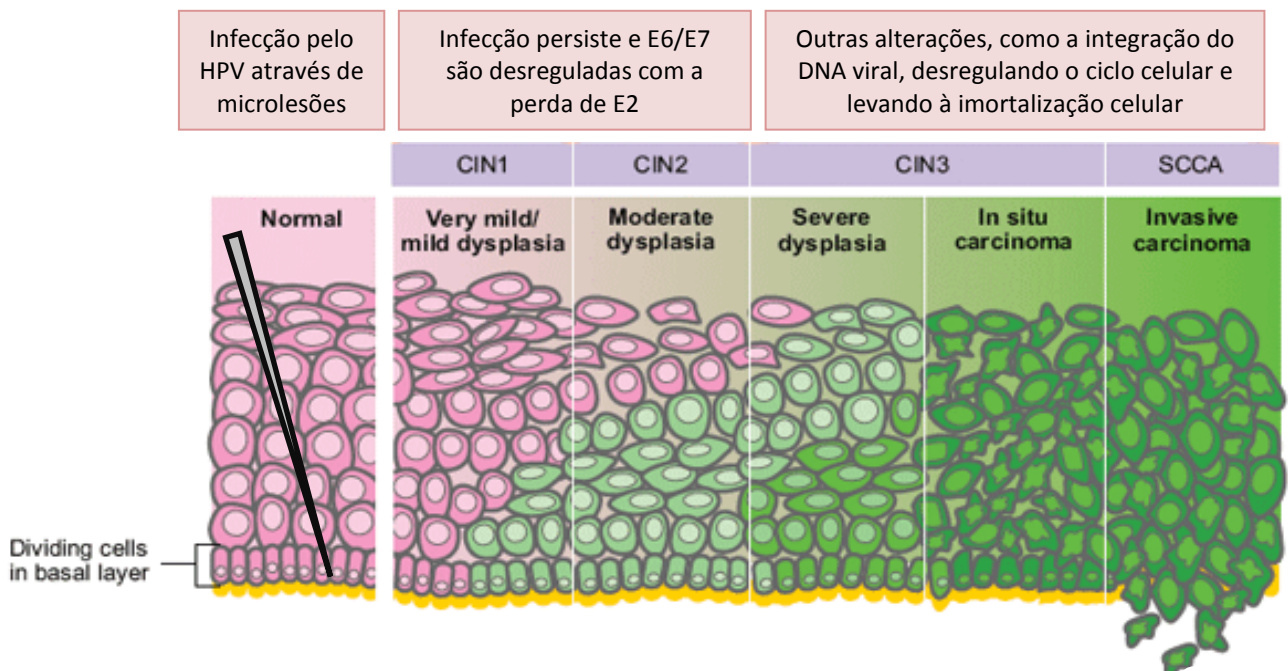


Figura 3 - Representação da carcinogênese do colo uterino e a relação com o status do HPV. (Imagem adaptada. Fonte: Center for Cancer Research Connections, Volume 2, n. 1 2008)²⁴.

1.4. Tratamento de acordo com o estadiamento

O sistema de estadiamento clínico para o câncer de colo uterino é definido pela Federação de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). O estágio I refere-se ao carcinoma estritamente limitado ao colo uterino. Quando a lesão só pode ser avaliada microscopicamente, ela se encontra no estágio IA, já as lesões macroscópicas, são consideradas como estágio IB²⁵. O estágio II refere-se ao carcinoma que se estende mais além do colo uterino, mas não invade a parede pélvica, ou que se estende até o terço superior da vagina. No estágio IIA não há comprometimento evidente do paramétrio e a invasão ocorre até os dois terços superiores da vagina. No estágio IIB há comprometimento evidente do paramétrio²⁵. O estágio III indica que o carcinoma invade a parede pélvica lateral ou que o tumor ocupa o terço inferior da vagina. No IIIA há invasão do terço inferior da vagina. No estágio IIIB ocorre extensão à parede pélvica lateral e/ou hidronefrose ou não funcionamento do rim²⁵. No estágio IIIC1 e IIC2 estão relacionados com comprometimento linfonodal²⁶. O estágio IV refere-se ao carcinoma que se estendeu além da pelve verdadeira ou invadiu (confirmado por biópsia) a mucosa da bexiga e/ou reto. No estágio IVA ocorre disseminação do tumor para órgãos pélvicos adjacentes. No estágio IVB ocorre disseminação para órgãos à distância²⁵.

Para os estágios IA1-IA2 o tratamento primário é cirúrgico, com a histerectomia radical apresentando uma alta taxa de cura. Os pacientes com tumores em estágio IB1 e alguns pacientes em estágio IIA1, podem tanto ser tratados primariamente com cirurgia, como com radioterapia. Já para os estágios IB2 e a partir do estágio IIA2 o tratamento primário cirúrgico não é indicado, uma vez que estes tumores apresentam alto risco para metástase. Sendo assim, para esses casos, em países com menor acesso à radioterapia, o tratamento é realizado com quimioterapia neoadjuvante, seguida por cirurgia radical. Nos Estados Unidos da América, o tratamento primário é realizado com tratamento padrão radioquimioterapia. Os quimioterápicos comumente utilizados são a cisplatina, a ifosfamida e o paclitaxel²⁷.

A cisplatina atua como radiosensibilizador, provavelmente por inibir o sistema de reparo do DNA. Essa combinação de radioquimioterapia pode reduzir as chances de recidiva em 30 a 50%, bem como melhorar a taxa de sobrevivência das pacientes com câncer cervical localmente avançado, em comparação com a radioterapia isolada^{25, 28}.

Embora a cisplatina seja um potente antineoplásico, esta droga está associada a inúmeros efeitos colaterais e à resistência em muitos tipos tumorais ²⁹. Tal fato tem limitado seu uso clínico e direcionado o seu uso a terapias combinatórias para reduzir a dose administrada ao paciente ³⁰. Em muitos estudos de combinações entre quimioterápicos que não contenham platina, raramente o efeito foi superior ao das combinações com a cisplatina. Sendo assim, a combinação de cisplatina com outros quimioterápicos (paclitaxel, topotecano, gencitabina ou vinorelbina) é comumente utilizada no tratamento paliativo ou em recidivas, sendo que em muitos casos, a combinação com paclitaxel é a melhor opção ³¹. Além disso, no Brasil, em 2015 foi aprovado também o uso do medicamento anti-angiogênico bevacizumabe, em combinação com cisplatina, nos casos de câncer de colo do útero metastático, persistente ou recorrente ³².

1.5. Terapia a alvos moleculares

Embora a cirurgia e a radioquimioterapia sejam eficazes em 80 até 95% dos casos de câncer de colo uterino em estágio inicial, pacientes com doença metastática ou recorrente apresentam mau prognóstico e possuem opções limitadas de tratamento paliativo ^{33,34}.

Para que este panorama seja alterado, uma importante estratégia é a utilização de medicamentos com alvos moleculares específicos. A aprovação do fármaco anti-fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bevacizumabe, para doença metastática abriu caminhos para que terapias alvo fossem melhor exploradas neste tipo tumoral ³⁵. Dentre elas, encontram-se inibidores de receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR), alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) ³⁵.

Embora a expressão de EGFR possa apresentar grande variação nos tumores de colo uterino (6 até 90%, dependendo da metodologia usada) ³⁶, já foi relatado que a super-expressão desta proteína está associada com pior prognóstico ³⁷⁻³⁹ e o impacto do tratamento com inibidores vêm sendo avaliado em estudos pré-clínicos e clínicos.

Uma das maneiras de inibir EGFR é através do uso de anticorpos monoclonais, os quais se ligam no domínio extracelular do receptor, competindo com seu ligante endógeno. Os estudos clínicos com Cetuximabe sozinho ou em combinação mostraram

melhoras na sobrevida global das pacientes, com uma baixa toxicidade ³⁵. Os anticorpos anti-EGFR, Matuzumabe e Nimotuzumabe mantiveram a doença estável ³⁵. Outra maneira de promover a inibição de EGFR é bloqueando o domínio tirosina-quinase intracelular. Dentre as pequenas moléculas inibidoras de EGFR encontram-se o Gefitinibe e o Erlotinibe, cujos estudos clínicos mostraram toxicidade reduzida. Quando combinado com cisplatina, Erlotinibe apresentou melhoras em relação à resposta completa das pacientes ³⁵.

Além disso, estudo pré-clínico recente de nosso grupo, demonstrou um efeito promissor no tratamento das células tumorais de colo uterino que expressam HER. Observamos importante efeito da combinação entre o Lapatinibe (anti-EGFR e anti-HER2) e o inibidor da via glicolítica, 2-deoxi-D-glicose, através da redução do número e do tamanho de vasos sanguíneos e da inibição do aumento de HIF-1 α ⁴⁰. Neste mesmo trabalho, foi observado que a super-expressão do receptor HER2 em tecidos tumorais de colo uterino está associada com uma pior sobrevida das pacientes (Martinho *et al.*, 2017).

1.6. Terapias alvo-combinadas

As recentes descobertas a respeito das características moleculares do tumor de colo uterino, revelando os genes mais frequentemente mutados, ou com número de cópias alterado, têm aberto um caminho para que novos alvos moleculares sejam explorados ⁴¹. Para outros tipos tumorais estes alvos não apenas já estão melhor estabelecidos como já foi demonstrado que, em muitos casos, o bloqueio exclusivo de um alvo não é suficiente para erradicar o tumor, uma vez que vias compensatórias de sinalização passam a ter maior ativação ao longo do tratamento ⁴²⁻⁴⁴.

Neste sentido, uma abordagem ainda pouco explorada e que visa aumentar a eficácia dos tratamentos contra o câncer e subjugar seus eventos adversos, é o uso de moléculas híbridas, ou combi-moléculas ⁴⁵. Uma combi-molécula pode agir em múltiplos alvos, tendo, por exemplo, um motivo que inibe o crescimento celular e outro que promove dano ao DNA ⁴⁶. Desta forma, ao invés de serem utilizadas duas drogas em combinação, uma única molécula já contém ambas as atividades. Tais moléculas têm demonstrado seu potencial na redução da viabilidade de células tumorais *in vitro* e do crescimento tumoral *in vivo*, como é o exemplo de JDF12, capaz

de alvejar EGFR e DNA e induzir apoptose em linhagens prostáticas, sendo ainda mais eficiente do que o inibidor gefitinibe sozinho, utilizado nos tumores prostáticos não respondedores à hormonioterapia ^{47, 48}.

Dentre os grupos que trabalham na síntese de combi-moléculas voltadas para o tratamento de câncer, a equipe de pesquisa liderada pelo Dr. Jean-Claude, na universidade canadense McGill apresenta uma contribuição pioneira e relevante na área, possuindo expertise no aspecto químico do desenvolvimento de novas drogas. Em 2017, foi iniciada uma colaboração no âmbito do projeto bilateral (DFATD/CAPES) entre a equipe canadense e o HCB, possibilitando o intercâmbio de pesquisadores e cooperação na avaliação pré-clínica destas combi-moléculas em tumores de colo uterino.

1.7. Produtos naturais como fonte de novos fármacos

Produtos naturais, incluindo plantas, animais e minerais, têm sido a base para o tratamento de grande parte das doenças humanas ⁴⁹. A partir do século 20, com a descoberta de que os efeitos de determinadas drogas no corpo humano são mediados por interações específicas com macromoléculas biológicas (proteínas ou ácidos nucleicos), a utilização de extratos crus e semi-purificados foi sendo substituída pelo uso de moléculas mais puras, que seriam as responsáveis pelo efeito desejado ⁴⁹. Nesse sentido, muitos compostos bioativos, responsáveis pelos efeitos do extrato bruto e relevantes para a área médica, tiveram sua estrutura química determinada. Como exemplo, podemos citar a morfina, obtida através da planta *Papaver somniferum*, e a digoxina, um estimulante cardíaco, purificada a partir *Digitalis lanata* ⁴⁹.

Muitos agentes antineoplásicos também foram obtidos de fontes naturais. No início de 1950, a vincristina e a vimblastina foram desenvolvidas a partir de alcaloides presentes na planta Vinca (*Catharanthus roseus*). Entre 1960 e 1970, o etoposido, um quimioterápico semi-sintético, foi desenvolvido a partir de raízes de espécies de *Podophyllum* ⁵⁰. Além destes, os compostos conhecidos como taxanos foram obtidos da casca da planta *Taxus brevifolia*. A camptotecina, isolada da planta ornamental chinesa *Camptotheca acuminata*, deu origem aos quimioterápicos irinotecano e topotecano ⁵⁰. De 1940 até 2014, de 175 pequenas moléculas aprovadas para o

tratamento de câncer, 131 (75%) são de origem não sintética; dentre elas, 85 (49%) são produtos naturais ou seus derivados⁵¹.

No final de 2013, cerca de 21 estudos clínicos estavam sendo realizados com moléculas derivadas de plantas, tais como as moléculas curcumina (fases I e II), genisteína (fases I e II), resveratrol (fases I e II) e roitucina (fases I e II)⁵². Considerando o histórico da descoberta de novos quimioterápicos, podemos perceber o quão importante é a flora na pesquisa de tratamentos contra o câncer. Uma vez que este reino abriga aproximadamente 352.000 espécies conhecidas, é um grande desafio a busca de plantas com compostos de atividade biológica relevante ao tratamento de doenças⁵³.

1.8. Plantas como fonte de compostos antineoplásicos no Brasil

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo, distribuída ao longo de seus seis biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal⁵⁴. No entanto, menos de 10% das espécies foram estudadas com relação à sua atividade biológica e menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos aprofundados⁵⁵.

No país, muitas espécies de plantas são usadas popularmente como analgésicos, como antimicrobianos, como anti-inflamatórios e até mesmo como agentes antitumorais⁵⁶. Essas informações, a partir de estudos etnobotânicos sobre o uso terapêutico de plantas, contribuem para a descoberta de novas drogas, uma vez que proporcionam a base para futuras pesquisas que revelem os compostos ativos presentes⁵⁷. Estudos brasileiros têm demonstrado que os extratos de uma variedade de plantas apresentam efeitos citotóxicos em linhagens tumorais humanas⁵⁸⁻⁶¹. Da Silva e colaboradores (2016) testaram 55 extratos obtidos de 18 espécies de plantas encontradas no nordeste brasileiro. Após uma seleção inicial, aqueles extratos que apresentaram potencial antitumoral foram testados em várias concentrações nas linhagens tumorais B16-F10, HepG2, K562 e HL-60, para determinação dos valores da concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀). Neste trabalho, as substâncias quercetina T, obtida de frações solúveis clorofórmicas das flores de *Duranta repens*, e uma mistura de α - e β -amirina, isolada do extrato hexânico das flores de *Ixora coccinea* tiveram seu potencial antitumoral avaliado, entretanto somente a quercetina demonstrou tal efeito. Além disso, extratos das espécies *B. sericea*, *D. repens*, *H.*

bracteatus, *I. purga*, *I. coccinea*, *M. piriri*, *O. longifolia* e *P. capitata* mostraram atividade citotóxica promissora ⁶¹.

Em 2000, um levantamento sobre as moléculas com atividade biológica obtidas de plantas encontradas em região de Mata Atlântica brasileira mostrou efeito citotóxico da espécie *Maytenus ilicifolia* ⁶². Ao longo dos anos, foram identificadas outras moléculas que também apresentaram potencial antitumoral através da indução de citotoxicidade (compostos triterpenoides: friedelina e friedelol), através da inibição da proliferação celular (taninos epigalocatequina e epigalocatequina-3-galato), através da indução de apoptose (pristimerina), através de parada do ciclo celular (epigalocatequina-3-galato), dentre outras ⁶³.

Também com potencial antineoplásico, os compostos benzopiranos obtidos da espécie *Hypericum caprifoliatum* ⁶³, bem como o dímero acil-filicílico e fluoroglucinol obtido de *Hypericum polyanthemum*, apresentaram capacidade de induzir apoptose *in vitro* ⁶². Nestes trabalhos, ainda são descritos o potencial do gênero *Tabebuia* ⁶² e das espécies *Euphorbia tirucalli*, *Euterpe oleracea* e *Vitis labrusca* ⁶³. Em um trabalho com plantas encontradas no cerrado brasileiro, Mesquita e colaboradores (2009) testaram 412 extratos de 21 famílias de plantas em linhagens tumorais cerebrais, de mama e de cólon. Dentre as famílias que apresentaram efeito citotóxico estão: Anacardiaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Flacourtiaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Simaroubaceae e Zingiberaceae ⁵⁸.

1.9. Modelo *in vitro* com linhagens tumorais humanas

Para tornar a busca por novos agentes antineoplásicos um pouco mais tangível, muitos centros de pesquisa realizam triagens com diversos compostos obtidos de plantas, utilizando como modelo experimental o cultivo de células ⁶⁴. No estudo do câncer, tais testes são comumente realizados em células tumorais humanas, que podem ser adquiridas comercialmente ou diretamente a partir da amostra do tumor de uma paciente.

No entanto, com relação às células adquiridas comercialmente, o painel de linhagens tumorais humanas de colo uterino é composto por um número ainda reduzido de representantes, quando comparado aos painéis de linhagens de mama, por exemplo

(http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Human/Tumor_Cell_Panels/Panels_by_Tissue_Type.aspx). Isso restringe a análise da ampla heterogeneidade biológica do colo uterino ⁴¹, sendo uma importante limitação na avaliação de eficácia e selectividade de novos potenciais compostos.

O cultivo celular, juntamente com outras ferramentas para ensaios *in vitro*, permitem avaliar a citotoxicidade de novos antineoplásicos, elucidar o mecanismo de ação dos mesmos, estudar as alterações envolvidas na resistência a fármacos, dentre outros. No entanto, ao longo do tempo em cultivo, as linhagens tendem a perder características moleculares iniciais ou até mesmo a adquirir novas ^{65, 66}. Uma opção para os ensaios *in vitro* é o estabelecimento de linhagem primária, a partir de tumores retirados de pacientes. As células da cultura primária retêm as características genômicas dos tumores de origem, portanto as respostas obtidas com este modelo podem melhor mimetizar aquelas que seriam encontradas no tumor ⁶⁵.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da abundante biodiversidade brasileira e da vasta gama de moléculas bioativas contidas em suas espécies, o potencial antitumoral destes organismos está pouco explorado.

Além disso, novas abordagens, como a combinação de terapias visando mais de um alvo molecular ainda são estratégias pouco investigadas para o tratamento de câncer de colo uterino.

Adicionalmente, a ausência de modelos mais fidedignos, como linhagens primárias constitui uma barreira para a melhor compreensão da biologia tumoral e para a descoberta de novos e mais eficazes fármacos para pacientes com câncer de colo uterino.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o potencial antineoplásico *in vitro* e *in vivo* de extratos naturais de plantas e seus derivados, bem como de terapias-alvos em linhagens tumorais de colo uterino comerciais e primárias

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Estabelecer e caracterizar novas linhagens tumorais de colo uterino provenientes de amostras de pacientes brasileiras

- Avaliar o perfil fenotípico e molecular das linhagens primárias
- Avaliar o potencial tumorigênico das linhagens *in vivo*, em camundongos imunocomprometidos.

3.2.2. Avaliar o potencial antineoplásico de extratos naturais com origem no cerrado brasileiro, em linhagens tumorais de colo uterino

- Analisar os efeitos biológicos *in vitro* (viabilidade, ciclo celular e vias de sinalização) do extrato em linhagens tumorais comerciais de colo uterino

3.2.3. Investigar a atividade antineoplásica de combi-moléculas, com dupla função (inibidora de EGFR/HER2 e alquilante do DNA), em linhagens tumorais de colo uterino.

- Analisar os efeitos biológicos *in vitro* (viabilidade, ciclo celular, morte celular, vias de sinalização, migração e invasão, clonogenicidade e cultura em 3 dimensões) das terapias-alvos em linhagens tumorais de colo uterino comerciais e primárias

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Estabelecimento e caracterização de linhagens tumorais de colo uterino

4.1.1. Cultivo de linhagens primárias

O cultivo de linhagens primárias foi realizado a partir de biópsias no ambulatório do departamento de ginecologia do Hospital de Câncer de Barretos. As amostras foram coletadas prospectivamente e as pacientes incluídas foram somente aquelas com suspeita de câncer de colo do útero (estádio I ao IV). A confirmação do diagnóstico, bem como o estágio da doença foram verificados no sistema do Hospital de Câncer de Barretos. As amostras coletadas foram mantidas em tampão PBS no refrigerador até o processamento. Os processamentos ocorreram no máximo 24 horas após coleta. Primeiramente, as amostras foram alocadas em uma placa de petri e fragmentadas com o auxílio de bisturis. Nas etapas seguintes, três protocolos diferentes foram testados.

Nos primeiros tumores foi adicionada tripsina e os mesmos foram mantidos na estufa por 10 minutos. Em seguida, essa mistura foi recolhida em tubo cônico tipo Falcon de 15 mL e foi adicionado 2 mL de meio RPMI suplementado com 1% Penicilina/estreptomicina (P/S) e 10% soro fetal bovino (SFB), para inativar a enzima. A mistura foi centrifugada por 5 min a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células formado foi ressuspensionado em meio para queratinócito, cujo conteúdo está descrito na Tabela 1. As células foram mantidas em frascos para cultivo com superfície de 25 cm² em uma incubadora a 37°C, 5% CO₂. A garrafa só foi manuseada a partir da semana seguinte a este processo.

Outro conjunto de tumores foi processado conforme descrito a seguir. Após serem fragmentados, os mesmos foram mantidos em um tubo falcon de 15 mL, contendo 5mL de uma solução enzimática (descrição na Tabela 2), em rotação constante, *overnight* a 4°C (adaptado de SANTIN *et al.*, 1999). No dia seguinte, foi adicionado 2 mL de meio RPMI 1%P/S e 10% SFB e foi realizado o mesmo procedimento usado nos primeiros tumores (centrifugação e adição de meio para queratinócito).

Por último foi realizada uma adaptação a este segundo protocolo. Neste caso, ao invés de deixar os tumores overnight a 4°C, eles foram mantidos a 37°C durante 30 a 60 minutos.

Uma semana após o processamento, o meio foi trocado e o crescimento das células foi acompanhado. A substituição do meio de cultura foi feita semanalmente. Após o crescimento e confluência das células, elas foram submetidas à caracterização molecular e ensaios de resposta terapêutica. Além disso, elas foram congeladas em nitrogênio líquido, para armazenamento. Além da amostra de tecido tumoral, também foi coletado sangue periférico das pacientes, fundamental para comparação do perfil mutacional. Este procedimento se encontra aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) (985/2015 - 1.252.699).

Tabela 1 - Meio para queratinócitos.

Quantidade para volume de 400 mL de DMEM:HAM's	Reagente
300 mL	meio DMEM 1%P/S 10% SFB
100 mL	meio Ham's F12
3,2 mL	Hidrocortisona (50 µg/mL)
500 µL	Insulina
40 µL	Transferrina (50 mg/mL)
3,36 µL	Toxina Colérica
260 µL	Liotironina (20 µg/mL)
2 µg/mL	Anfotericina B (1%)

Tabela 2 - Solução enzimática para desagregação celular.

Volume	Reagente
5 mL	RPMI 1%P/S
0,5 µL	DNase (5mg/mL)
7 µL	Colagenase (10mg/mL)

4.1.2. Caracterização imunofenotípica da cultura primária

Para confirmar se as células em crescimento seriam de origem epitelial, foi realizada uma imunocitoquímica com anticorpos contra vimentina (negativa para célula epitelial e positiva para fibroblasto) e citoqueratina (positiva para célula epitelial e negativa para fibroblasto). As células foram plaqueadas em placa de 24 poços (5 x

10⁵) e, ao atingirem 80% de confluência, foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min, lavadas 3 vezes com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 (0,1% em água) por 4 min e lavadas conforme descrito. A peroxidases endógena foi inibida por 10 min com H₂O₂ 3X diluído em metanol Para bloquear marcações não-específicas, foi utilizado uma gota do reagente Ultra V Block (kit de detecção da Thermo Scientific) por 10 min e, após lavagens, adicionou-se o anticorpo primário AE1/AE3 (Thermo Scientific) ou vimentina (Thermo Scientific). Após incubação por 60 min e lavagens, foi adicionado o anticorpo polivalente biotilado de cabra. Após incubação por 10 min e lavagens, foi adicionado estreptavidina-peroxidase e, ao final de 10 min e lavagens, o cromógeno DAB foi utilizado para revelação, também por 10 min. Por fim, foi feita contra-coloração com hematoxilina e as células foram fotografadas com a utilização de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio. A linhagem imortalizada SiHa, um carcinoma de células escamosas grau II, positiva para HPV-16, foi usada como controle positivo para a citoqueratina, enquanto a linhagem HCB-535 foi usada como controle positivo para a vimentina.

Os marcadores p40 (Biocare Medical, diluição 1: 100) e p16 (Roche, Ventana Systems, pronto para uso), comumente utilizados na patologia para determinação da histologia do câncer de colo uterino ⁶⁷, foram avaliados por imunistoquímica no *cell block* da nova linhagem tumoral de colo uterino estabelecida neste trabalho e no tecido tumoral embebido em parafina (FFPE) fixado em formalina da paciente.

Além disso, a expressão da molécula de adesão epitelial (EpCAM) (anti-CD326, BD Biosciences) ⁶⁸, outro marcador de células de carcinoma cervical, foi analisada na linhagem celular HCB-514 por citometria de fluxo. Resumidamente, 5 x 10⁵ células foram coletadas e lavadas duas vezes em BSA 0,2% em DPBS (a centrifugação entre as lavagens foi de 1500 rpm por 5 minutos), depois foram adicionados 10 µL de EpCAM conjugado com PE e as células permaneceram incubadas durante 20 min. Em seguida, as células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo (Accuri BD). A linhagem SiHa foi usada como controle positivo para expressão de EpCAM e a linhagem HCB-535 foi usada como controle negativo.

4.1.3. Isolamento do DNA

Para caracterização molecular, o DNA foi isolado a partir do pellet de 1×10^6 células tumorais na sexta passagem utilizando coluna de sílica do kit de extração Biopur Mini Spin Plus 250 (Biopur), conforme descrito pelo fabricante. O DNA total do sangue foi automaticamente isolado da camada leucoplaquetária do paciente por meio do Mini Kit DNA e Qiasymphony (ambos da Qiagen) no Departamento Biobanco do HCB, de acordo com o fabricante. Esta tecnologia combina extração baseada em sílica com purificação de partículas magnéticas. Utilizou-se o protocolo Blood 200 com um volume de eluição de 50 μ l. O DNA tumoral foi isolado de uma amostra de biópsia obtida do paciente através do instrumento Mini Kit DNA e Qiasymphony (QIAGEN). Para o DNA isolado tumoral, a macrodissecção foi realizada por um patologista experiente e até 25 ng da amostra contendo pelo menos 60% de área tumoral e até 20% de área de necrose foram fragmentados e submetidos a procedimentos de digestão e homogeneização, de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se o protocolo Tissue 200 com um volume de eluição de 50 μ L.

Todas as amostras de DNA foram quantificadas pelo NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) e foram então armazenadas a -20 °C para posterior análise genética. O DNA do sangue foi usado como referência para distinguir mutações somáticas de germinativas.

4.1.4. Avaliação do vírus do papiloma humano (HPV)

A presença de HPV na linhagem celular HCB-514 foi avaliada por PCR in house utilizando os primers GP5 + e GP6 +, capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 142pb da região conservada L1 HPV ⁶⁹. Para isso, foram utilizados 5 μ L de DNA extraído da HCB-514, 20 mM de tampão de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl 50, 1,25 U de Platinum Taq polimerase, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mix de dNTP, 0,6 μ M de cada iniciador (GP5+ e GP6+). As amplificações foram realizadas no equipamento Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) e o ciclo foi conforme descrição: 94°C por 4 min seguido por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 40°C e 1min30seg a 72°C. Depois, um ciclo de 72°C durante 7 min e os produtos de PCR foram armazenados a 4°C antes da eletroforese no gel de agarose a 2%. O DNA

HPV positivo foi usado como controle positivo e a água foi usada como controle negativo. Os reagentes de PCR foram adquiridos da Invitrogen.

Além disso, o sistema COBAS® 4800 HPV (Roche) foi utilizado para a genotipagem do HPV, de acordo com as instruções do fabricante. Este ensaio utiliza amplificação de DNA-alvo através de PCR em tempo real para detectar 14 HPVs de alto risco em único ensaio. Ele realiza genotipagem dos HPVs 16 e 18 e, simultaneamente, detecta outros tipos de alto risco não-16 e 18 (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) em casos de infecção⁷⁰.

Além disso, uma vez que a oncoproteína E6 está relacionada com a transformação oncogênica de células epiteliais de colo uterino infectado com o HPV e que os tipos de HPV de alto risco mais comuns são o 16 e o 18, a presença da sua oncoproteína E6 foi avaliada através de um teste imuno-cromatográfico, utilizando o Teste OncoE6™ Cervical (Arbor Vita), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o lisado de 1×10^6 células da HCB-514 foi incubado com anticorpos monoclonais para a oncoproteína E6 dos HPVs 16 e 18 conjugados com fosfatase alcalina. Então, usando uma tira de nitrocelulose do teste, foi permitido que esta mistura migrasse ao longo da fita, por capilaridade, e, se proteína estivesse presente, seria possível observar uma linha púrpura nesta tira. A posição em que a linha aparece, identifica se se trata de E6 de HPV-16 ou de HPV-18.

4.1.5. Análise do sequenciamento total do exoma (WES)

O DNA da linhagem celular HCB-514, do tumor primário da paciente e do sangue pareado foram usados para o WES, com input de 50 ng no sistema Illumina HiSeq 2500™, por uma empresa comercial (Mendelics, São Paulo, Brasil). O pré-processamento de dados foi realizado utilizando a ferramenta fastqc (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para controle de qualidade dos arquivos raw (no formato FASTQ) e alinhamento com o genoma de referência hg19 utilizando o Burrows-Wheeler (bwa-mem) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>), transformado em formato de arquivo binário de extensão BAM para posterior análise.

As variantes de nucleotídeos únicos (SNV) foram avaliadas usando uma estratégia comparativa entre os dados de sequenciamento de linhagem celular com os

dados germinativos (DNA do sangue), através de um modelo que avalia se a ausência da variante de referência e a presença no tumor não ocorreram devido a erros de sequenciamento, calculando o log odd score (LOD) entre a fração de leituras sequenciadas em pares ⁷¹.

A identificação das variações do número de cópias (CNV) foi realizada por meio de uma correção inicial dos erros sistemáticos associados ao mapeamento e conteúdo de GC⁵, seguida da identificação das regiões de perda e ganho usando o algoritmo de Segmentação Binária Circular (CBS) que divide o genoma em segmentos iguais e realiza permutações de acordo com uma referência (amostra normal) ⁷², seguida por identificação das regiões mais frequentes de perdas e ganhos entre pacientes usando o software Nexus Copy Number (<http://www.biodiscovery.com/nexus-copy-number/>).

A avaliação da integração do DNA viral do HPV no genoma humano foi realizada através do modo de integração do programa HPVDetector, conforme descrito anteriormente ⁷³.

A análise filogenética da sequência do HPV foi realizada usando as sequências de consenso fasta do HPV-16 (uma da amostra tumoral e outra da cultura celular) obtidas de sequenciamento profundo e um grupo de sequências genômicas completas do HPV-16 recuperadas do GenBank, alinhadas com o programa Muscle ⁷⁴ e editadas com Se-Alv2.0a11 (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/sea/>). As reconstruções filogenéticas foram realizadas pelo critério de máxima verossimilhança (ML) utilizando o RAxML versão 8.0.0 33. O modelo de melhor ajuste utilizado para a reconstrução ML foi o modelo GTR+ Γ sem partições. O processo de bootstrap foi de 1.000 ciclos.

4.1.6. Sequenciamento por Sanger do gene *BRCA2*

Para validar a mutação identificada no WES em *BRCA2*, a nova célula tumoral de colo uterino e os DNAs da paciente foram submetidos à amplificação por PCR do éxon 20 de *BRCA2*, utilizando a enzima Hot Start Taq (Qiagen), como descrito por ⁷⁵. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com a enzima ExoSap (USB Affymetrix) e submetidos ao protocolo de sequenciamento usando o kit de ciclo de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado no equipamento 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), conforme descrito previamente ⁷⁶.

4.1.7. Análise da variação do número de cópias (CNV)

As alterações cromossômicas da nova linhagem de colo uterino também foram analisadas pela plataforma de Nanostring, utilizando o painel nCounter® v2 Cancer CN Assay (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA). Este painel quantifica a CNV de 87 genes comumente amplificados ou deletados em vários tipos de câncer (www.nanostring.com/products/CNV) ⁷⁷. Como controle, foi utilizado o DNA genômico do sangue periférico da paciente. O input de DNA foi de 600 ng para linhagem e 473 ng para o sangue periférico.

Os dados brutos foram capturados pelo programa nSolverAnalysis Software v3.0® (NanoString Technologies). Para a normalização dos resultados, 54 sondas foram usadas para regiões do genoma que não costumam apresentar CNV. Após a normalização dos dados, foi calculada a média das contagens das 3 sondas por cada gene e foi calculado o número de cópias por gene, conforme descrito anteriormente ^{78, 79}.

4.2. Cultivo de linhagens comerciais

Foram utilizadas 4 linhagens humanas tumorais de colo uterino (HeLa, CaSki, SiHa, C4-I) e 1 linhagem de queratinócito normal (HaCaT), gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Luísa Lina Villa, além de uma linhagem normal de fibroblasto murino, NIH-3T3, obtida comercialmente. As linhagens foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂.

Tabela 3 - Descrição das linhagens utilizadas.

Linhagem celular	Histologia	Idade	HPV	Amplificação de EGFR
CaSki	Carcinoma de células escamosas	40	16 e 18	Sim
SiHa	Carcinoma de células escamosas	55	16	Não
HeLa	Adenocarcinoma	31	18	Não
C4-I	Carcinoma de células escamosas	41	16	Não*
NIH-3T3	Fibroblasto murino	-	Ausente	Não
HaCaT	Queratinócito normal	62	Ausente	Não

* Informação avaliada neste trabalho.

4.3 Avaliação do potencial antitumoral de extratos naturais e de combimoléculas

4.3.1. Origem dos extratos naturais

Para avaliar o potencial antineoplásico de novos compostos, foram testados extratos naturais e seus derivados, obtidos de plantas típicas da flora brasileira. A obtenção deles foi feita em colaboração com a Universidade Federal de São João del-Rey, Minas Gerais, com a Professora Dra. Rosy I. M. de A. Ribeiro.

4.3.1.1. Procedimentos realizados na UFSJ para obtenção de extratos brutos, partições e frações

De maneira geral, o processo de obtenção dos extratos que vieram da UFSJ foi realizado do seguinte modo: as folhas das espécies foram coletadas em Ituiutaba, MG (Latitude S 18°58'08" e Longitude W 49°27'54") em novembro de 2007 e de 2008. Em seguida elas foram identificadas e uma parte foi armazenada em um herbário fiel depositário (BHCB-UFMG) sob registro número 143400. O restante do material foi macerado durante vários dias com álcool 70%, até que fosse extraída grande quantidade de compostos. Os extratos foram então filtrados, liofilizados e enviados ao HCB.

Para continuação do trabalho, foi feito o particionamento do extrato bruto que apresentou melhor atividade contra as células tumorais. Para isso, o extrato foi diluído em solvente hidroalcoólico e submetido a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes, visando uma semi-purificação das substâncias. Os solventes utilizados foram: hexano (resultando na partição identificada como "B"), clorofórmio (partição identificada como "C"), acetato de etila (partição identificada como "D") e o remanescente hidroalcoólico (partição identificada como "A"). Em seguida, estas partições foram enviadas ao HCB, para a realização de novos ensaios de citotoxicidade. Os ensaios realizados nesta tese foram com as partições A, C e D, uma vez que os ensaios com a partição B foram inseridos em um projeto à parte de nosso grupo, que já se encontra publicado ⁸⁰.

Duas das partições que apresentaram melhores resultados foram submetidas ao processo de fracionamento. Para isso, utilizou-se uma coluna cromatográfica clássica para extrair várias frações a partir da passagem de solventes de polaridades crescentes pela coluna contendo a partição de interesse.

Tanto para o extrato bruto, como para as partições, foram feitos estudos fitoquímicos para identificar, de maneira qualitativa, os compostos secundários presentes. Além disso, foi realizada a técnica de espectrometria de massas de ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourier com ionização por electro spray negativa [ESI (-) FT-ICR] (MS, modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics Bremen) para identificar as possíveis moléculas presentes, conforme descrito previamente por nosso grupo⁸⁰.

4.3.2. Origem das moléculas híbridas

ZR2002 (6-(2-cloroetilamino)-4-anilinoquinazolina) (Figura 4), JS-61 e JS-84 são moléculas desenvolvidas pra atuarem em alvos específicos, alvejando tanto o EGFR e também promovendo o dano ao DNA genômico. Elas foram sintetizadas no *Cancer Drug Research Laboratory, Department of Medicine, Division of Medical Oncology, McGill University Health Center/Glen Hospital* pela equipe liderada por Dr. Bertrand J. Jean-Claude. Ambas contêm uma mesma região quinazolina, responsável pela inibição de EGFR. No caso de ZR2002, também há uma parcela de inibição em receptores HER2. A diferença entre estas três moléculas está na função alquilante de DNA, que é desempenhada por um único grupo cloroetil nas moléculas ZR2002 e JS-84 (incorporado em regiões diferentes de cada uma delas) e por dois grupos cloroetil na molécula JS-61. Esta estrutura da região alquilante nas moléculas equivale à metade da estrutura de uma mostarda nitrogenada.



Figura 4 - Estrutura química de ZR2002. Em destaque está a região com função alquilante. A estrutura de JS-84 e JS-61 ainda não pode ser divulgada publicamente.

Para comparar o efeito das combi-moléculas, foram utilizados tratamentos com: I) Gefitinibe (Gef) sozinho, um inibidor de EGFR; II) Clorambucil (Clor) sozinho, um agente alquilante do DNA que tem uma estrutura de mostarda nitrogenada completa, sendo o fármaco mais próximo à região alquilante das moléculas híbridas testadas neste trabalho; III) Gefitinibe mais clorambucil (Gef+Clor) combinados e IV) Cisplatina (Cis), um agente alquilante do DNA usado na prática clínica. As concentrações testadas variaram de 0.00625 nM até 200 μ M. As drogas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO), exceto a Cisplatina, diluída em NaCl 0,9%. Para os tratamentos com DMSO, sua concentração no meio de cultura não ultrapassou 1%.

4.4. Avaliação da viabilidade celular e determinação da IC₅₀

Para os experimentos com as terapias alvo e os extratos, foram semeadas 5×10^3 células, em 100 μ L de meio DMEM 1% P/S e 10% SFB, em placas de 96 poços de fundo plano. No dia seguinte, este meio foi trocado por um meio com quantidade reduzida de soro (0,5% SFB), para possibilitar a sincronização do ciclo celular. No terceiro dia foi realizado o tratamento, adicionando-se o meio 0,5% SFB com os extratos diluídos. As células foram expostas às diferentes concentrações dos mesmos por 72 horas.

Após este período, para avaliar a viabilidade celular, foi realizado um ensaio colorimétrico, utilizando o reagente Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS- Promega), conforme descrito pelo fabricante. Neste ensaio, as células viáveis metabolizam o tetrazólio do reagente em formazan, tornando o meio de cultura mais escuro. O MTS foi adicionado a cada poço, após a remoção do meio anterior, e a placa foi incubada por 2 horas a 37°C, protegida da luz direta. A absorbância foi medida em leitor de placa de ELISA, a 490 nm, e foi convertida em

porcentagem de viabilidade celular. Para isso, as células que receberam o veículo (DMSO) foram utilizadas como controle, correspondendo a 100% de sobrevivência. Foi realizada uma análise de regressão não-linear pelo programa Graphpad Prism resultando em uma equação usada para calcular a concentração de substância necessária para produzir 50% de redução de viabilidade celular (IC_{50}). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

4.5. Análise da migração e invasão celular

Para avaliar os efeitos das terapias alvo no potencial de invasão celular, foi utilizado o ensaio com inserto contendo matrigel. Esse ensaio consiste na avaliação do número de células capazes de ultrapassar a camada de matrigel e atingir a membrana na parte externa do inserto, seguindo um estímulo quimioatrativo. Para esse experimento, as células CaSki, HCB-514 e SiHa foram plaqueadas sobre o matrigel no interior do inserto, em meio sem soro contendo os seguintes tratamentos: 0,2% de DMSO, 20 μ M de ZR2002, 20 μ M de JS-84, 20 μ M de Gef+Clor, 20 μ M de Cis. A dose de 20 μ M e as linhagens cervicais foram selecionadas a partir dos resultados de viabilidade celular, com maiores detalhes na seção de resultados. Este inserto foi mantido por 24 horas em um poço de uma placa de 24 poços contendo meio suplementado com 10% SFB. Após esse período, o inserto foi retirado do poço, o matrigel foi removido e a membrana fixada e corada com HE. Em seguida, ela foi cortada do inserto, montada em lâmina e fotografada, permitindo a contagem de células que invadiram o matrigel. Para avaliar o efeito das terapias alvo no potencial de migração celular foram utilizados os mesmos procedimentos para invasão celular, porém os insertos utilizados não continham matrigel. Para quantificação de ambos os ensaios, foi utilizado o software ImageJ. Após a quantificação, foi realizado o teste ANOVA comparando os tratamentos com o controle.

4.6. Análise do potencial clonogênico celular

Para avaliar a capacidade das terapias alvo de inibir a replicação das linhagens, foi realizado o ensaio de formação de colônia ancoragem-dependente. Para isto, 2 x 10³ células (SiHa e CaSki) foram semeadas em meio DMEM 10%SFB 1%P/S, placas de 6 poços, de forma que, ao aderirem à placa, elas se mantivessem individualizadas e

distantes umas das outras. No dia seguinte, o meio foi substituído por meio DMEM 0,5% SBF 1% P/S contendo os seguintes tratamentos: 0,2% de DMSO, 2 e 20 μM de ZR2002, 2 e 20 μM de JS-84, 2 e 20 μM de Gef+Clor, 2 e 20 μM de Gef, 0,2% de NaCl 0,9%, 2 e 20 μM de Cis. Após 14 dias em cultura, as colônias foram coradas com cristal violeta e os poços foram fotografados. Para quantificação, primeiramente o cristal violeta foi dissolvido com 1 mL de ácido acético 10% em água destilada e, após ser observado a descoloração das colônias, 100 μL desta solução foi lida a 590 nm no leitor de placa de ELISA (*Varioskan Flash -Thermo Scientific*). Estes valores foram usados para os cálculos estatísticos.

4.7. Análise da viabilidade celular na cultura em 3 dimensões

Para cultivo em 3 dimensões, foram semeadas 5×10^3 células SiHa, em 100 μL de meio, em placas de 96 poços de baixa aderência e de fundo oval (*Corning® Ultra-Low Attachment Surface*). Após 3 dias, as células que formaram uma estrutura esferoide, constituída pelo agregado celular, receberam o tratamento com doses crescentes, 0,06 até 100 μM , de ZR2002, JS-84 e Gef+Clor, bem como com doses de 1 até 60 μM de Cis. O tratamento ocorreu da seguinte maneira: foram retirados 50 μL do meio usado no plaqueamento, para que fosse substituído por 50 μL de meio novo mais as moléculas diluídas. Após 10 dias, o reagente *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay* (Promega) foi adicionado a cada poço contendo os esferoides, sem que o meio fosse retirado dos poços e a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C, protegida da luz direta. A luminescência foi medida em leitor de placa de ELISA (*Varioskan Flash -Thermo Scientific*). Os experimentos foram realizados em duplicatas biológicas.

4.8. Análise das vias de sinalização celular por immunoblotting

Uma vez que as moléculas híbridas atuam na proteína EGFR, a expressão deste e de outros receptores tirosina quinase (RTK) foi avaliada nas linhagens HCB-514 e C4-I. Para SiHa, CaSki e HeLa, esta caracterização já foi descrita por nosso grupo⁴⁰. Para isto, foi utilizado um kit de arranjo de proteínas RTK fosforiladas (*Human Phospho-RTK Array Kit - R&D*), de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram avaliadas tanto a nível basal, como após estimulação com o fator de crescimento epidérmico (EGF). Resumidamente, as células foram cultivadas em dois frascos T75 até

a confluência. Para a estimulação de EGFR, o EGF diluído em 10 mL de meio livre de soro (concentração final de 10 ng / mL) foi primeiramente adicionado a um dos frascos e as células foram incubadas por 15 min. Ao segundo frasco foi adicionado somente o meio, sem EGF. Em seguida, as proteínas foram coletadas, quantificadas e incubadas nas membranas do kit. Para validação por *Western blotting*, os lisados proteicos foram separados em gel de SDS-PAGE a 8%, transferidos, incubados em anticorpo primário fosfo-EGFR^{Y1068} (1: 1000), EGFR (1: 1000) ou α -tubulina (1: 2000) e revelados como detalhado por Silva-Oliveira et al.¹². Os anticorpos foram obtidos pela empresa Cell Signaling.

Para confirmar se as moléculas híbridas eram realmente capazes de inibir o receptor de EGF, foi realizado um ensaio que consiste na estimulação deste receptor pelo seu ligante (EGF), induzindo a ativação de EGFR. Para este ensaio, 8×10^5 células CaSki, HCB-514 e SiHa foram plaqueadas em placa de 6 poços e, no dia seguinte, foram mantidas em meio DMEM 1% P/S 0% SFB por 2h. Em seguida, o meio foi substituído pelos por meio DMEM 1% P/S 0% SFB contendo os tratamentos: 0,2% de DMSO, 2 e 20 μ M de ZR2002, 2 e 20 μ M de JS-84, 2 e 20 μ M de Gef+Clor e 2 e 20 μ M de Gef. Após 2h, para estimulação do receptor, o meio foi substituído por 50 ng/mL de EGF diluídos em DMEM 1% P/S 0% SFB por 15 minutos. Apenas um dos poços não recebeu EGF, sendo este um controle para saber se a estimulação ocorreu. Em seguida, o lisado proteico foi extraído para *Western blot*. As proteínas avaliadas foram: p-EGFR, t-EGFR, α -tubulina, p-ERK e t-ERK.

Além disso, para confirmar se a função de dano ao DNA estava presente nas moléculas híbridas, a presença da proteína p-H2AX foi avaliada. A fosforilação desta variante da histona H2A ocorre de forma abundante e rápida em resposta à quebra de dupla fita do DNA e, uma vez presente, indica o local do DNA que deverá ser reparado⁸¹. Para isto, 8×10^5 células CaSki, HCB-514 e SiHa foram plaqueadas em placas de 6 poços e, no dia seguinte, o meio foi substituído por meio DMEM 1% P/S 0,5% SFB contendo os tratamentos: 0,2% de DMSO, 2 e 20 μ M de ZR2002, 2 e 20 μ M de JS-84, 2 e 20 μ M de Gef+Clor, 2 e 20 μ M de Gef, 0,2% de NaCl 0,9%, 2 e 20 μ M de Cis. Após 24h, o lisado proteico foi extraído para *Western blot*.

Além disso, deste mesmo lisado também foram avaliadas proteínas da sinalização de morte celular por apoptose e do ciclo celular para alguns dos

tratamentos, conforme indicado na seção de resultados. Os anticorpos primários utilizados foram PARP, caspase-9, caspase-3, caspase 3 clivada, p21 e p27, todos na concentração de 1:1000 e obtidos da empresa Cell Signaling. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase e reveladas pelo método de quimiluminescência ECL. A detecção do sinal quimiluminescente foi realizada no sistema de fotodocumentação *Image Quant LAS 4000 mini*.

Para os extratos naturais, as linhagens SiHa e HeLa foram plaquedadas e, no dia seguinte, tratadas com DMSO, cisplatina e uma fração obtida da planta *Annona crassiflora*, a 7C24. As doses foram o valor de IC₅₀ de cada um dos tratamentos para cada uma das linhagens. Após 24 h as proteínas foram obtidas para *Western blot* e os anticorpos utilizados foram: PARP, p-H2AX, p21 e α -tubulina.

4.9. Análise do ciclo celular

Para a avaliação do ciclo celular, 8×10^5 células CaSki, HCB-514 e SiHa foram semeadas em placas de 6 poços em meio DMEM 1%P/S 10%SFB. No dia seguinte, foi adicionado meio DMEM 1% P/S 0,5% SFB contendo os tratamentos: 0,2% de DMSO, 2 e 20 μ M de ZR2002, 2 e 20 μ M de JS-84, 2 e 20 μ M de Gef+Clor, 2 e 20 μ M de Gef, 2 e 20 μ M de Clor, 0,2% de NaCl 0,9%, 2 e 20 μ M de Cis. Depois de 24 h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, lavadas em PBS e submetidas ao protocolo para adição de iodeto de propídeo (PI) [*Cell Cycle Test Kit* (BD Biosciences)] para marcação do material genético. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e os mesmos foram analisados no programa BD Accuri C6 Software (BD Biosciences).

Para os extratos naturais, a linhagem SiHa foi tratada com 1% DMSO e IC₅₀ e 7C24, e foi analisada 24 h após, conforme descrito acima.

4.10. Análise da morte celular

Para a avaliação de morte celular, 8×10^5 células CaSki, HCB-514 e SiHa foram semeadas em placas de 6 poços em meio DMEM 1%P/S 10%SFB. No dia seguinte, foi adicionado meio DMEM 1% P/S 0,5% SFB contendo os tratamentos: 0,2% de DMSO, 2 e 20 μ M de ZR2002, 2 e 20 μ M de JS-84, 2 e 20 μ M de Gef+Clor, 2 e 20 μ M de Gef, 2 e

20 μM de Clor, 0,2% de NaCl 0,9%, 2 e 20 μM de Cis. Após 24 h de tratamento, para avaliação no citômetro, as células foram dissociadas com Accutase[®], centrifugadas, lavadas em PBS e foram adicionados a anexina V e o 7-AAD [*Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences)] para a marcação de fosfatidilserinas expostas na face externa da membrana plasmática e para a marcação do núcleo, respectivamente. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e os mesmos foram analisados no programa BD Accuri C6 Software (BD Biosciences).

4.11. Hibridização fluorescente *in situ*

Para verificar se a C4-I apresentava alterações do número de cópias do gene *EGFR*, foi realizada a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization*), utilizando a sonda comercial EGFR ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe (ZytoVision). Esta técnica foi realizada no setor de Citogenética do HCB. Para este ensaio, além da C4-I, foram utilizadas a CaSki (controle positivo para amplificação) e a SiHa (controle negativo para amplificação). Resumidamente, as células foram mantidas em uma T25 até atingirem 85% de confluência, quando foram desagregadas com Accutase[®] (Accutase[®] Cell Dissociation Reagent – Gibco) por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram homogenizadas em solução hipotônica de KCl, fixadas em solução de 3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético e montadas em lâminas para microscopia. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em solução tampão de cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) 2X por 20 minutos e foi feita a etapa de digestão com NaOH por 15 segundos. Posteriormente, foi feita a desidratação (etanol 70, 85 e 100%) e, após secagem, as lâminas foram preparadas para hibridização com as sondas no equipamento Dako StatSpin, de acordo com instruções do fabricante. No dia seguinte, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência para determinação da razão entre EGFR/CEN7, após contagem em 100 núcleos. Razões maiores ou iguais a 2, foram classificadas como amplificadas, conforme descrito previamente⁸².

4.12. Análise do crescimento tumoral em camundongos

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem *NOD scid gamma*. (NSG - Jackson Laboratory). Estes animais imunodeficientes não apresentam células T e B maduras, nem células natural killer, além de possuírem deficiência na imunidade inata e em sinalizações de citocinas. Elas tinham 8 semanas de vida, pesando aproximadamente 25 g, provenientes do Biotério do CPOM (HCB), onde também foram mantidas ao longo do experimento, em ambiente livre de patógenos especificados. Os animais pertencentes a cada grupo experimental foram alojados em uma mesma caixa de polietileno em ambiente com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura 21°C e umidade 55% controladas, com disponibilidade de alimentação e água *ad libitum*. Para inoculação das células tumorais, os camundongos foram anestesiados com agente inalatório isoflurano 1,5%.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CEUA_CPOM) em encontra-se aprovado.

Este trabalho foi executado de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de experimentação animal (CONCEA).

4.12.1 Procedimentos para a linhagem HCB-514

Para a avaliação da capacidade tumorigênica das células HCB-514, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Grupo I: animais (n=3) inoculados com 5×10^6 células e Grupo II: animais (n=3) inoculados com 1×10^7 células. Para isso, as células foram cultivadas em seu meio de cultura específico em frascos T150 até confluência. Posteriormente, cinco ou dez milhões de células diluídas em 100 uL de HBSS e homogenizadas com mais 100 uL de matrigel, totalizando volume de 200 uL, foram injetadas na região subcutânea do flanco direito de cada camundongo. Os animais foram observados diariamente e pesados uma vez por semana até que fosse detectado o início da formação de nódulo tumoral. A partir de então, os animais foram pesados e o nódulo medido com paquímetro 2-3 vezes por semana..

O experimento seria interrompido se fossem observados sintomas como dificuldade para se alimentar, locomover, ou perda de peso superior a 20% do peso corpóreo. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose

excessiva de tiopental 60 mg/kg. i.p e foi realizada excisão dos tumores para realização de técnicas histológicas. As carcaças foram armazenadas em freezer -20°C e encaminhadas para incineração. O volume tumoral foi calculado para avaliar se houve crescimento tumoral, a partir da seguinte fórmula: $V = (L/2) \times (W/2)^2 \times 4/3 \times \pi$, onde V, volume (mm³); L, comprimento (mm); and W, largura (mm).

4.13. Análise estatística

Para o experimento com os diferentes protocolos de cultivo de linhagem primária não foram realizados testes estatísticos. Para os demais experimentos, foi utilizado o teste estatístico t (controle versus fração 7C24), e o teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni (controle versus moléculas híbridas e demais fármacos).

5. RESULTADOS

Os resultados foram divididos em três seções, para permitir respostas aos objetivos específicos descritos no item 3.2 desta tese.

5.1. Estabelecimento e caracterização de uma nova linhagem tumoral de colo uterino proveniente da amostra de uma paciente brasileira

(Parte dos resultados deste objetivo específico já se encontra publicado. Referência: Rosa, M. N. *et al.*, *Scientific Reports* (2019) 9:1913 - Anexo B)

5.1.1. Estabelecimento e cultivo de células primárias

O estabelecimento de cultura primária foi realizado de março de 2016 até abril de 2017. Foram processadas 35 amostras de tumores do colo uterino (Figura 5). Ao longo dos processamentos, diferentes protocolos foram testados, conforme foi descrito em materiais e métodos. Das 13 amostras processadas com tripsina, 4 cresceram suficientemente para caracterização: HCB-483, HCB-486, HCB-491 e HCB-492. Das 8 amostras processadas com DNase + Colagenase (18h a 4°C), uma foi caracterizada, HCB-499. Das 14 amostras processados com DNase + Colagenase (30min ou 60min a 37°C), uma foi caracterizada, HCB-514.

Uma das seis células caracterizadas, a HCB-514, foi positiva para citoqueratina, representando 2,9% do total das 35 amostras processadas (Figura 5). Sendo assim, esta foi a primeira cultura a seguir para as demais caracterizações moleculares, conforme descritas nas próximas seções.

5.1.2. Caracterização imunofenotípica da linhagem

Através da técnica de imunocitoquímica das 7 culturas em crescimento, foi verificado que 6 delas apresentaram marcação somente de vimentina, indicando serem uma cultura de fibroblastos de colo uterino, e não uma célula tumoral. São elas: HCB-583, HCB-486, HCB-491, HCB-492, HCB-499 e HCB-506. Uma única linhagem, a HCB-514, apresentou marcação de citoqueratina (Figura 5).

Além disso, a imuno-histoquímica do cell block da HCB-514 foi semelhante ao padrão de expressão do tecido tumoral FFPE do paciente. Tanto o tecido tumoral de HCB-514 quanto de FFPE foram positivos para p40, um marcador para células

escamosas, e p16, um marcador de tumores de colo uterino (Figura 6), confirmando sua origem celular escamosa. Ainda, a análise por citometria de fluxo mostrou alta expressão de EpCAM na HCB-514, com coloração em 100% das células. A expressão de EpCAM foi positiva em 92% das células SiHa, enquanto foi positiva em 19% da linhagem celular de fibroblastos (Figura 7).

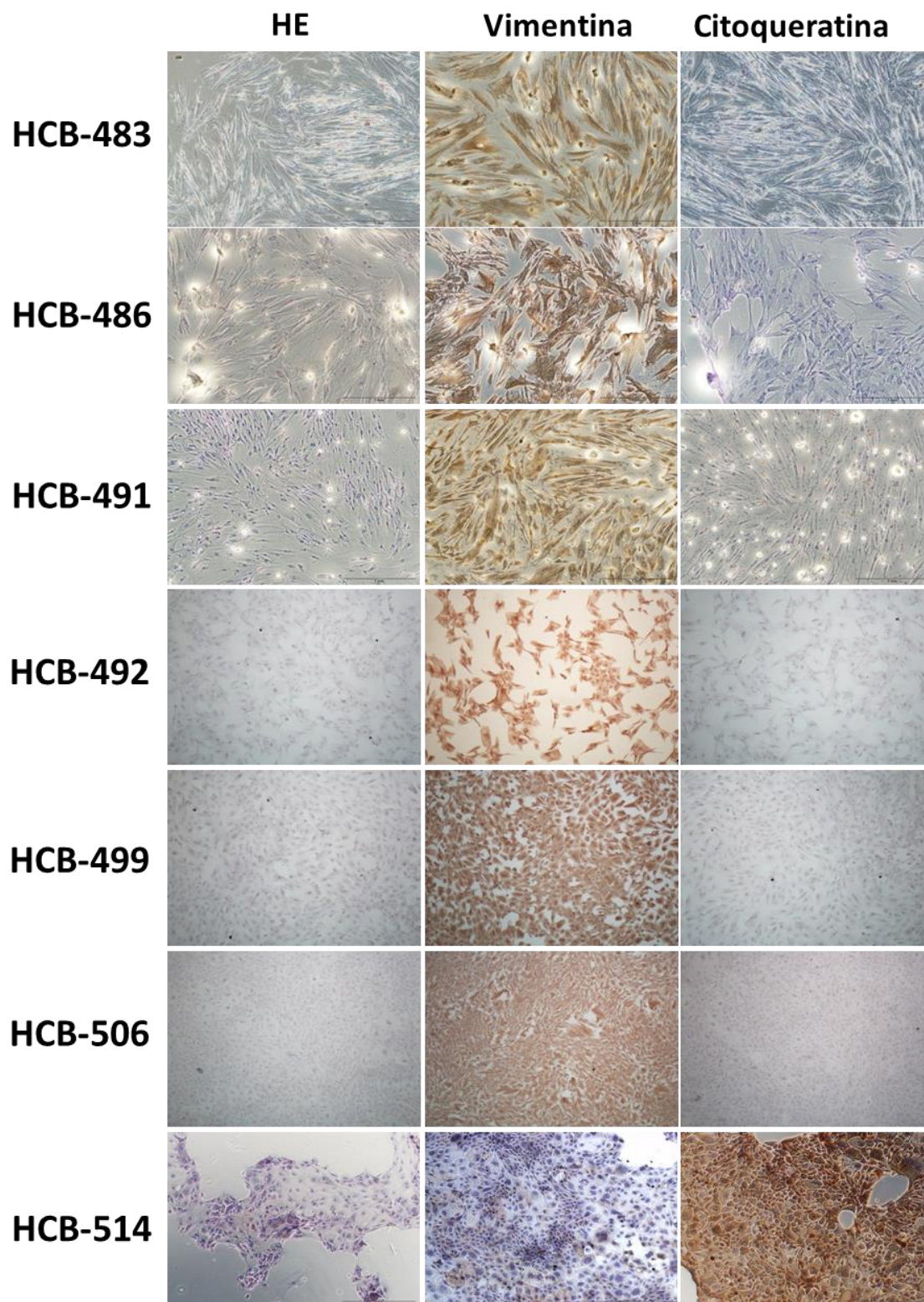


Figura 5 - Fotomicrografia de cultura primária após coloração HE e imunocitoquímica. Aumento de 100 (até HCB-492) e 50 vezes (a partir da HCB-499).

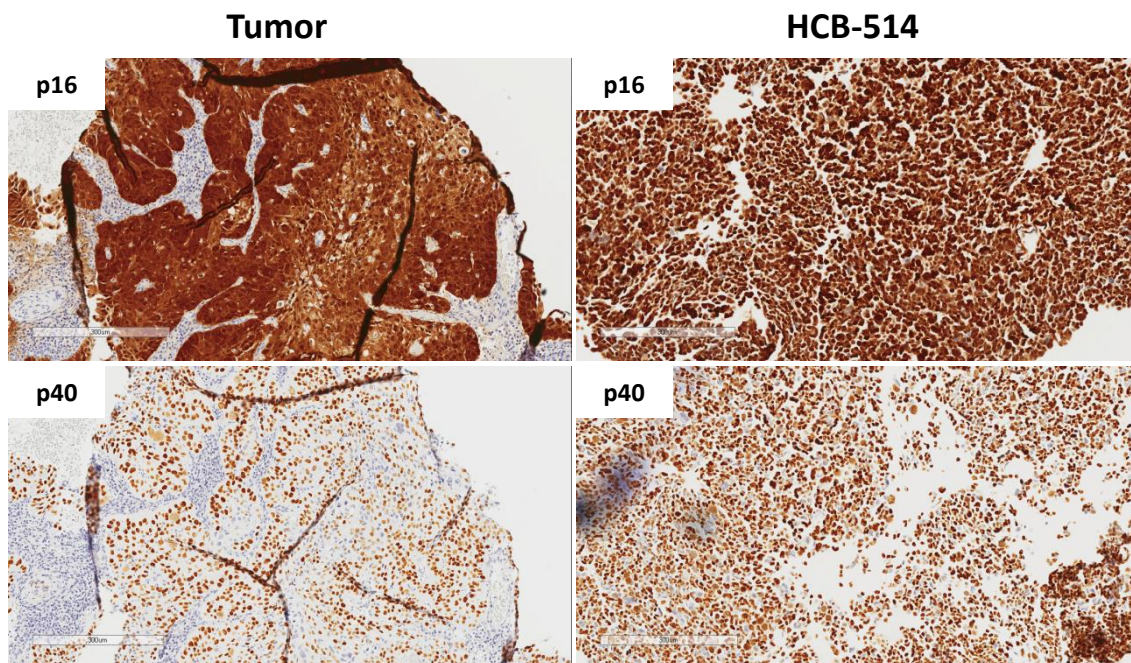


Figura 6 - Imagens representativas das imunohistoquímicas de cortes de cell block da HCB-514 (direita) e do tecido tumoral da paciente (esquerda) para avaliar a presença de p16 (marcador de câncer cervical) e p40 (marcador de carcinoma de células escamosas)..

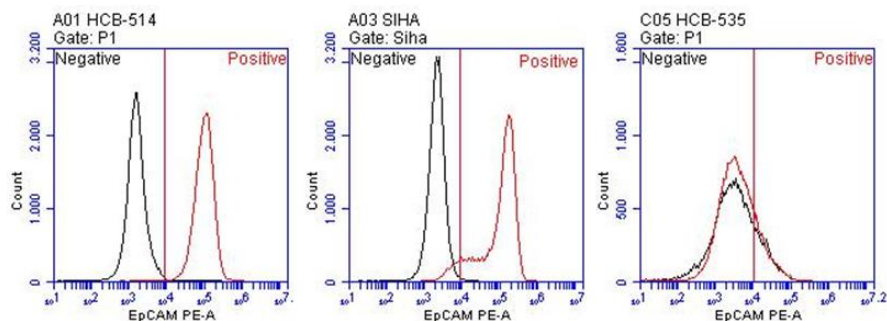


Figura 7 - Avaliação da expressão da molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) na HCB-514. As linhagens celulares HCB-514 (esquerda), SiHa (centro) e HCB-535 (direita) foram coradas com anticorpo anti-EpCAM e avaliadas em citômetro de fluxo. A linhagem SiHa e a linhagem celular de fibroblastos, HCB-535, foram usadas como controles positivos e negativos, respectivamente. Os gráficos pretos representam as células não marcadas; os gráficos vermelhos representam células marcadas.

5.1.3. Status e genotipagem do HPV na linhagem

Uma vez que o HPV está presente em quase todos os tumores de colo uterino, a amplificação da região altamente conservada do gene L1 de HPV foi avaliada por PCR, usando primers GP5+ / GP6+. A banda correspondente a esta região foi encontrada amplificada no HCB-514, confirmando a presença do HPV (Figura 8A). Para identificar qual tipo de HPV de alto risco estava presente, foi realizado o teste de genotipagem, através do ensaio COBAS® HPV, confirmando o HPV tipo 16. Além disso, para confirmar a ocorrência da infecção pelo HPV16, avaliamos e confirmamos a presença da oncoproteína E6, importante proteína responsável pela oncogenicidade do HPV (Figura 8B).

Ainda, o WES permitiu a análise da integração do genoma do HPV no DNA genômico da HCB-514 e no tumor primário. Foram encontrados dois sítios de integração, um no gene *MICU2* e outro no genes *CDH13*, sendo o último também encontrado no tumor primário.

Além disso, é hipotetizado que as variações genéticas do HPV e sua co-evolução com hospedeiros de certos grupos étnicos infecciosos influenciam o desenvolvimento da doença e o desfecho (30). Nesse sentido, para identificar a variante do HPV na HCB-514 e no tumor primário, foi realizada a análise filogenética. Os resultados da linhagem celular HCB-514 e do tumor primário da paciente mostraram a presença da sub-linhagem HPV16 A1 em ambos (Figura 9).

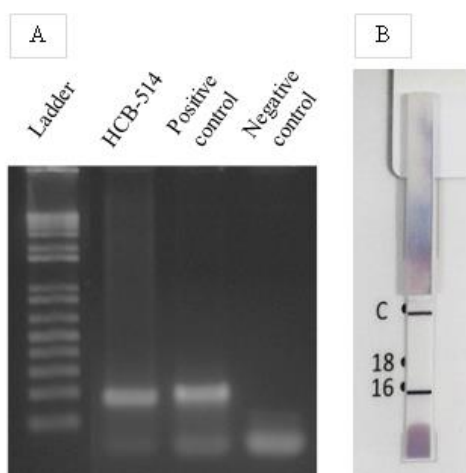


Figura 8 - Detecção de HPV GP5+ / GP6+ após PCR por eletroforese em gel de agarose (A) e teste de proteína OncoE6 (B). Na imagem A, as bandas da amostra positiva e da HCB-514 mostram produtos de PCR na posição referente a 150 pb.

5.1.4. Identificação da linhagem

A reação para avaliar o perfil de sequências curtas repetidas em tandem ("*short tandem repeat*" - STR) a partir do DNA tanto da cultura primária, como do sangue da paciente mostrou correspondência de 80%, confirmando a identidade da linhagem.

Tabela 4 - Perfil de STR da cultura primária e do sangue da paciente que a originou.

Regiões	Sangue	Cultura primária HCB-514
Amelogenina	X	X
CSF1PO	10,12	12
D13S317	9,11	9,11
D16S539	9	9
D5S818	10,12	10
D7S820	11,13	13
THO1	7,9	7,9
TPOX	8,12	8,12
vWA	16	16

5.1.5. Avaliação do perfil mutacional da linhagem

A análise de WES pareada de linhagem celular / sangue revelou 520 mutações somáticas. A análise das mutações não silenciosas mais significativas identificou 93 genes mutados (Tabela 5), tais como *HPS-3*, *IRX2*, *XPO5*, *CBWD1*, *TGFBR1*, *CUBN*, *TRHDE*, *BRCA2*, *THBS1*, *TGM5*, *CCDC22*, que já foram descritas anteriormente como patogênicas, ou provavelmente patogênicas em tumores sólidos. Com relação à análise pareada do tumor primário / sangue, 863 mutações foram encontradas, com 70 não silenciosas identificadas (Tabela 6). Entre elas, 18 mutações foram compartilhadas com a HCB-514 (Tabela 7), incluindo mutações nos genes *BRCA2*, *TGFBR1* e *CCDC22*.

A mutação identificada no gene *BRCA2* (p.W2830 *) foi, ainda, confirmada pelo sequenciamento de Sanger (Figura 9).

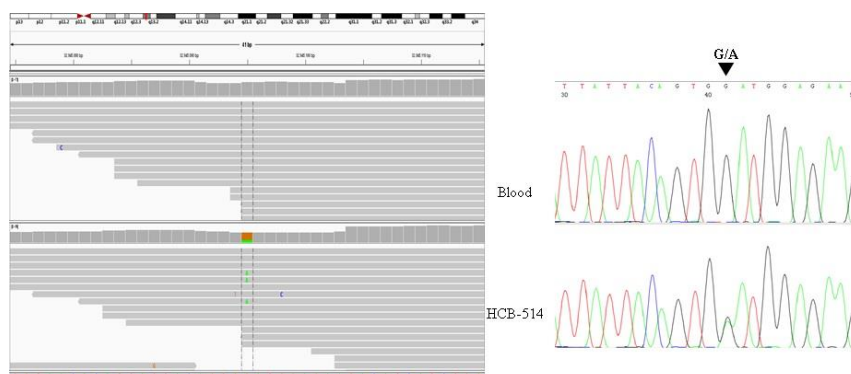


Figura 9 - Imagem do IGV dos resultados de NGS do exoma do gene *BRCA2* (esquerda) e parte do eletroferograma do sequenciamento por Sanger do éxon 20 do gene *BRCA2* que contém a mutação (G→A) (direita).

Tabela 5 - Total das 93 mutações não silenciosas encontradas na linhagem HCB-514.

Cromossomo	Posição	Gene	Alelo referências	Alelo variante	Aminoácido
1	17185537	<i>RP11-108M9.2</i>	G	T	-
1	17930009	<i>ARHGEF10L</i>	G	C	p.R119P
1	72058537	<i>NEGR1</i>	G	T	p.N301K
1	109560148	<i>WDR47</i>	G	T	p.D78E
1	145818808	<i>GPR89A</i>	C	A	p.G21W
1	225328450	<i>DNAH14</i>	A	T	p.N1395I
1	228335177	<i>GUK1</i>	C	T	p.R129W
2	43817966	<i>THADA</i>	G	T	p.A100E
2	69049563	<i>ARHGAP25</i>	G	A	p.G431E
2	96521280	<i>ANKRD36C</i>	T	G	p.I1577L
3	21706378	<i>ZNF385D</i>	C	T	p.A55A
3	27763616	<i>EOMES</i>	C	T	p.G57D
3	77657079	<i>ROBO2</i>	C	A	p.H1105Q
3	124420944	<i>KALRN</i>	G	A	p.E989K
3	125032193	<i>ZNF148</i>	C	T	p.E98K
3	148875136	<i>HPS3</i>	G	T	p.X504_splice
3	167000256	<i>ZBBX</i>	G	C	p.A675G
3	193039604	<i>ATP13A5</i>	G	C	p.T594S

3	197249504	<i>BDH1</i>	G	A	-
5	2751384	<i>IRX2</i>	G	T	p.Y48*
5	5489376	<i>KIAA0947</i>	G	C	p.S2245T
5	14713075	<i>ANKH</i>	C	A	p.G425C
5	35010154	<i>AGXT2</i>	T	G	p.D430A
5	36136508	<i>LMBRD2</i>	G	T	p.A217E
5	140793112	<i>PCDHGA10</i>	G	A	p.E124K
6	26501990	<i>BTN1A1</i>	A	T	p.E84D
6	43528041	<i>XPO5</i>	C	A	p.X366_splice
6	159660971	<i>FNDC1</i>	G	A	p.E1535K
7	33945363	<i>BMPER</i>	G	T	-
7	77408339	<i>RSBN1L</i>	A	C	p.K799Q
8	120594668	<i>ENPP2</i>	A	G	p.V625A
8	142367558	<i>GPR20</i>	C	T	p.E156K
8	144809668	<i>FAM83H</i>	C	T	p.E655K
9	156528	<i>CBWD1</i>	C	A	p.X177_splice
9	101900171	<i>TGFBR1</i>	C	T	p.A202V
10	93694	<i>TUBB8</i>	T	C	p.K213R
10	16867082	<i>CUBN</i>	C	A	p.X3589_splice
10	19620301	<i>MALRD1</i>	G	T	p.V540F
10	51130414	<i>PARG</i>	G	A	p.L59F
10	61844594	<i>ANK3</i>	C	A	
10	102058330	<i>PKD2L1</i>	G	C	p.F240L
10	121432151	<i>BAG3</i>	G	A	p.V298M
11	28057764	<i>KIF18A</i>	C	T	p.R799Q
11	108384207	<i>EXPH5</i>	C	T	p.S676N
12	49087267	<i>CCNT1</i>	G	A	p.S577F
12	72956810	<i>TRHDE</i>	C	T	p.Q633*
12	99194813	<i>ANKS1B</i>	C	G	p.E1053Q
12	109201563	<i>SSH1</i>	G	A	p.R193W

13	32945095	<i>BRCA2</i>	G	A	p.W2830*
14	22447320	<i>TRAV8-6</i>	C	T	p.H101Y
14	22447320	<i>TRAV8-6</i>	C	T	p.H101Y
14	75618762	<i>TMED10</i>	T	C	p.M104V
15	23406819	<i>RP11-467N20.5</i>	T	C	p.K673E
15	39874463	<i>THBS1</i>	G	A	p.R46H
15	43545745	<i>TGM5</i>	G	A	p.R215W
15	74710316	<i>SEMA7A</i>	C	T	-
16	24942731	<i>ARHGAP17</i>	C	A	-
16	71212844	<i>HYDIN</i>	C	A	p.R123M
16	72162648	<i>PMFBP1</i>	G	A	p.R666*
16	89347621	<i>ANKRD11</i>	G	A	p.Q1777*
17	1559700	<i>PRPF8</i>	T	C	p.I1927V
17	19289664	<i>MFAP4</i>	G	A	p.P91S
17	19702886	<i>ULK2</i>	C	A	p.G482C
17	26729306	<i>SLC46A1</i>	G	A	p.T372I
17	36894999	<i>PCGF2</i>	G	A	-
17	72352995	<i>BTBD17</i>	A	G	p.V413A
17	74622837	<i>ST6GALNAC1</i>	C	T	p.D403N
18	21042924	<i>RIOK3</i>	A	T	-
18	48255712	<i>MAPK4</i>	C	T	p.R418C
19	1880950	<i>ABHD17A</i>	T	C	p.K144E
19	13259847	<i>STX10</i>	C	T	p.R120K
19	14910434	<i>OR7C1</i>	A	C	p.M172R
19	15852363	<i>OR10H3</i>	G	A	p.R54H
19	41084418	<i>SHKBP1</i>	G	A	p.V124I
19	50412217	<i>NUP62</i>	C	G	p.S283T
19	50463982	<i>SIGLEC11</i>	T	G	p.E96A
19	52327351	<i>FPR3</i>	C	T	p.T117I

19	55570646	<i>RDH13</i>	G	C	-
20	4163484	<i>SMOX</i>	G	A	p.R453H
20	23066708	<i>CD93</i>	G	A	p.S41L
21	47421214	<i>COL6A1</i>	G	C	p.E624Q
22	17590484	<i>IL17RA</i>	C	G	p.S792C
22	19213831	<i>CLTCL1</i>	C	T	p.A620T
22	25573381	<i>KIAA1671</i>	C	T	p.R1656W
22	45574274	<i>NUP50</i>	T	A	p.S166T
X	8138258	<i>VCX2</i>	G	T	p.Q79K
X	11793095	<i>MSL3</i>	C	T	-
X	31187708	<i>DMD</i>	G	T	p.H3469N
X	49105196	<i>CCDC22</i>	G	T	p.X477_splice
X	71788696	<i>HDAC8</i>	G	A	p.A68V
X	100653041	<i>GLA</i>	C	A	p.W349L
X	111698846	<i>ZCCHC16</i>	G	T	p.R297L
X	123556182	<i>TENM1</i>	T	A	p.I1471F
X	123556192	<i>TENM1</i>	C	A	p.E1467D
22	25573381	<i>KIAA1671</i>	T	C	p.M104V
22	45574274	<i>NUP50</i>	T	C	p.K673E
X	8138258	<i>VCX2</i>	G	A	p.R46H
X	11793095	<i>MSL3</i>	G	A	p.R215W
X	31187708	<i>DMD</i>	C	T	-
X	49105196	<i>CCDC22</i>	C	A	-
X	71788696	<i>HDAC8</i>	C	A	p.R123M
X	100653041	<i>GLA</i>	G	A	p.R666*
X	111698846	<i>ZCCHC16</i>	G	A	p.Q1777*
X	123556182	<i>TENM1</i>	T	A	p.I1471F
X	123556192	<i>TENM1</i>	C	A	p.E1467D

Tabela 6 - Total das 70 mutações não silenciosas encontradas no tumor.

Chromosome	Position	Gene	Reference allele	Variant allele	Aminoacid
1	108679461	<i>SLC25A24</i>	T	A	p.X417_splice
1	219385056	<i>LYPLAL1</i>	G	A	p.E234K
1	225328450	<i>DNAH14</i>	A	T	p.N1395I
1	226075708	<i>LEFTY1</i>	A	G	p.L92S
1	228335177	<i>GUK1</i>	C	T	p.R129W
2	69049563	<i>ARHGAP25</i>	G	A	p.G431E
2	89399780	<i>IGKV1-16</i>	A	C	p.C16W
2	96688755	<i>GPAT2</i>	C	G	p.E722D
2	96688768	<i>GPAT2</i>	A	G	p.L718S
2	99785851	<i>MITD1</i>	G	T	p.T246K
2	99785855	<i>MITD1</i>	G	T	p.H245N
2	160303343	<i>BAZ2B</i>	G	T	p.Q216K
3	27763616	<i>EOMES</i>	C	T	p.G57D
3	37366231	<i>GOLGA4</i>	C	A	p.Q974K
3	57389107	<i>DNAH12</i>	C	T	p.A2274T
3	99569454	<i>FILIP1L</i>	C	T	p.E356K
3	99569459	<i>FILIP1L</i>	A	T	p.I354K
3	124420944	<i>KALRN</i>	G	A	p.E989K
3	133894464	<i>RYK</i>	C	T	p.A523T
3	135721101	<i>PPP2R3A</i>	T	A	p.I254K
3	169555405	<i>LRRIQ4</i>	G	A	p.G557R
4	17585225	<i>LAP3</i>	C	A	p.Q167K
4	23826133	<i>PPARGC1A</i>	T	A	p.X253_splice
4	114823502	<i>ARSJ</i>	G	T	p.S576R
4	146025639	<i>ABCE1</i>	C	A	p.C25*
5	35010154	<i>AGXT2</i>	T	G	p.D430A
5	78328665	<i>DMGDH</i>	T	A	p.X455_splice
5	140793112	<i>PCDHGA10</i>	G	A	p.E124K

5	177580506	<i>NHP2</i>	G	T	p.N72K
7	77408339	<i>RSBN1L</i>	A	C	p.K799Q
8	11659373	<i>RP11-297N6.4</i>	G	T	p.T75K
8	49831529	<i>SNAI2</i>	C	A	p.C215F
8	142367558	<i>GPR20</i>	C	T	p.E156K
9	101900171	<i>TGFBR1</i>	C	T	p.A202V
10	51130414	<i>PARG</i>	G	A	p.L59F
11	14889253	<i>PDE3B</i>	G	A	p.G1030S
11	64112607	<i>CCDC88B</i>	G	A	p.R865Q
12	38714080	<i>ALG10B</i>	G	T	p.A163S
12	49087267	<i>CCNT1</i>	G	A	p.S577F
12	65462685	<i>WIF1</i>	C	A	p.X133_splice
12	99194813	<i>ANKS1B</i>	C	G	p.E1053Q
12	109201563	<i>SSH1</i>	G	A	p.R193W
13	32945095	<i>BRCA2</i>	G	A	p.W2830*
13	41650357	<i>WBP4</i>	C	A	p.P247Q
15	39874463	<i>THBS1</i>	G	A	p.R46H
15	43545745	<i>TGM5</i>	G	A	p.R215W
16	15457676	<i>NPIPA5</i>	A	G	p.L298P
16	67237736	<i>ELMO3</i>	A	C	p.T760P
16	72162648	<i>PMFBP1</i>	G	A	p.R666*
17	26729306	<i>SLC46A1</i>	G	A	p.T372I
17	56565403	<i>HSF5</i>	G	A	p.T78I
17	72352995	<i>BTBD17</i>	A	G	p.V413A
19	12575478	<i>ZNF709</i>	G	A	p.H420Y
19	14910434	<i>OR7C1</i>	A	C	p.M172R
19	41084418	<i>SHKBP1</i>	G	A	p.V124I
19	52327351	<i>FPR3</i>	C	T	p.T117I
19	53855879	<i>ZNF845</i>	C	G	p.Q651E

20	4163484	<i>SMOX</i>	G	A	p.R453H
20	9546947	<i>PAK7</i>	G	A	p.Q359*
20	23066708	<i>CD93</i>	G	A	p.S41L
21	47421214	<i>COL6A1</i>	G	C	p.E624Q
22	17590484	<i>IL17RA</i>	C	G	p.S792C
22	19213831	<i>CLTCL1</i>	C	T	p.A620T
X	3228653	<i>MXRA5</i>	G	C	p.L2531V
X	7811671	<i>VCX</i>	C	A	p.Q79K
X	18824609	<i>PPEF1</i>	G	A	p.R447Q
X	49105196	<i>CCDC22</i>	G	T	p.X477_splice
X	118975172	<i>UPF3B</i>	C	T	p.R225K

Tabela 7 - Mutações somáticas não silenciosas comuns à HCB-514 e ao tumor primário.

Chromosome	Position	Gene	Reference allele	Variant allele	Aminoacid	Zygoty
1	228335177	<i>GUK1</i>	C	T	p.R129W	Heterozygous
2	69049563	<i>ARHGAP25</i>	G	A	p.G431E	Heterozygous
5	140793112	<i>PCDHGA10</i>	G	A	p.E124K	Heterozygous
7	77408339	<i>RSBN1L</i>	A	C	p.K799Q	Heterozygous
9	101900171	<i>TGFBR1</i>	C	T	p.A202V	Heterozygous
10	51130414	<i>PARG</i>	G	A	p.L59F	Heterozygous
12	99194813	<i>ANKS1B</i>	C	G	p.E1053Q	Heterozygous
12	109201563	<i>SSH1</i>	G	A	p.R193W	Heterozygous
13	32945095	<i>BRCA2</i>	G	A	p.W2830*	Heterozygous
15	39874463	<i>THBS1</i>	G	A	p.R46H	Heterozygous
15	43545745	<i>TGM5</i>	G	A	p.R215W	Heterozygous
19	41084418	<i>SHKBP1</i>	G	A	p.R129W	Heterozygous
20	4163484	<i>SMOX</i>	G	A	p.G431E	Heterozygous

20	23066708	<i>CD93</i>	G	A	p.E124K	Heterozygous
21	47421214	<i>COL6A1</i>	G	C	p.K799Q	Heterozygous
22	17590484	<i>IL17RA</i>	C	G	p.A202V	Heterozygous
22	19213831	<i>CLTCL1</i>	C	T	p.L59F	Heterozygous
X	49105196	<i>CCDC22</i>	G	T	p.E1053Q	Heterozygous

5.1.6. Avaliação da variação do número de cópias (CNV) dos genes da linhagem

A análise do Nanostring para CNV foi realizada para a linhagem celular e o DNA constitutivo. Dentre todos os genes avaliados, foram encontradas 43 alterações somáticas, incluindo 30 regiões com amplificação, contendo genes como *MYC*, *TP53*, *EGFR*, *TERT*, *AKT3*, *MAPK7*, *BIRC2*, *YAP1* e 14 perdas, contendo genes como *KIT*, *RB1*, *BRCA2* e *APC* (Tabelas 8 e 9).

Para expandir a análise para além dos 87 genes do painel NanoString, a CNV também foi investigada a partir dos dados do WES. O WES mostrou 79 regiões cromossômicas abrigando um grande número de genes com CNV. Foram encontradas 35 regiões de amplificação, com 9 delas apresentando alta amplificação, abrigando genes como *MYNC*, *ALK*, *PIK3CA*, *BIRC3*, *ERCC4* e *PALB2* (Tabela 8). Deleções foram encontradas em 44 regiões, abrigando genes como *MLH1*, *PDGFRA*, *APC*, *MET* e *RB1* e deleções homozigóticas foram encontradas em 8 regiões (Tabela 9). Muitos dos genes amplificados estão relacionados com as vias de sinalização PI3K-AKT e MAPK. Outras regiões alteradas abrigam genes relacionados principalmente com o processo de reparo do DNA, apoptose e fatores transcricionais. Além disso, a linhagem celular apresentou alterações nos receptores tirosina-quinase, como amplificação de *EGFR* e *ALK* e deleção de *PDGFRA* e *MET*.

Em relação à CNV presente no tumor primário, o número de CNV foi reduzido em comparação com a linhagem celular HCB-514, com 4 regiões de amplificação e 10 regiões de deleção. Mais uma vez, tanto o tumor primário como a linhagem celular compartilhavam de algumas destas alterações, tais como amplificação de *MYCN* e *ALK* e deleção de *PDGFRA*, *KIT*, *IL2*, *FBXW7*, *MET* e *ATM* (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Regiões com amplificação no número de cópias na linhagem HCB-514.

Chromosome Region	CNV	Cytoband	Cancer genes
chr1	Amplification	p36.33; q32.1	
chr1	High amplification	q32.1 - q43	<i>H3F3A, FH</i>
chr1	Amplification	q43; q43 - q44	
chr2	High amplification	p25.3 - p22.3	<i>MYCN, C2orf44, NCOA1, DNMT3A, ALK</i>
chr2	High amplification	p22.3 - p21	<i>EML4</i>
chr2	Amplification	p21 - q33.1	<i>MSH2, MSH6, FBXO11, BCL11A, REL, XPO1, IGL@, TTL, PAX8, ERCC3, CHN1, HOXD13, HOXD11, NFE2L2, PMS1, SF3B1</i>
chr2	Amplification	q37.3	
chr3	High amplification	q11.1 - q26.1	<i>TFG, CBLB, GATA2, RPN1, FOXL2, WWTR1, GMPS, MLF1</i>
chr3	High amplification	q26.1 - q29	<i>EVI1, PIK3CA, SOX2, ETV5, EIF4A2, BCL6, LPP</i>
chr3	High amplification	q29	<i>TFRC</i>
chr5	Amplification	p15.33 - p11	<i>IL7R, LIFR</i>
chr6	Amplification	q12	
chr7	Amplification	p22.3 - q11.21	<i>CARD11, PMS2, ETV1, HNRNPA2B1, HOXA9, HOXA11, HOXA13, JAZF1, IKZF1, EGFR</i>
chr8	Amplification	p23.3 - q24.3	<i>PCM1, WRN, WHSC1L1, FGFR1, HOOK3, TCEA1, PLAG1, CHCHD7, NCOA2, HEY1, COX6C, EXT1, MYC, NDRG1, RECQL4, C8orf33</i>
chr9	Amplification	q32	
chr11	Amplification	q12.3 - q13.4	<i>MEN1, CCND1</i>
chr11	Amplification	q13.4 - q22.1	<i>NUMA1, PICALM, MAML2</i>
chr11	High amplification	q22.1 - q22.3	<i>BIRC3</i>
chr12	Amplification	p13.33	
chr12	Amplification	q23.1 - q24.33	<i>ALDH2, PTPN11, BCL7A</i>
chr14	Amplification	q11.1 - q32.33	<i>CCNB1IP1, TRA@, NKX2-1, NIN, KTN1, GPHN, TSHR, TRIP11, GOLGA5, DICER1, TCL6, TCL1A, BCL11B, AKT1, IGH@</i>
chr15	Amplification	q21.3 - q26.3	<i>FLJ27352, TCF12, PML, NTRK3, IDH2, CRT3, BLM</i>
chr16	Amplification	p13.3	
chr16	High amplification	p13.3 - p11.2	<i>TSC2, CREBBP, CIITA, SOCS1, TNFRSF17, ERCC4, MYH11, PALB2, IL21R, FUS</i>
chr17	Amplification	p13.3 - q11.2	<i>YWHAE, USP6, TP53, PER1, GAS7, MAP2K4, NF1, SUZ12</i>
chr18	High amplification	p11.31	
chr18	Amplification	p11.31 - p11.23	
chr18	Amplification	p11.1 - q23	<i>ZNF521, SS18, MALT1, BCL2</i>
chr19	Amplification	p13.2	
chr20	Amplification	p13 - q13.33	<i>ASXL1, MAFB, TOP1, SDC4, GNAS, SS18L1</i>

Tabela 9 - Regiões com deleção no número de cópias na linhagem HCB-514.

Chromosome Region	Event	Cytoband	Cancer genes
chr1	Deletion	p11.2 - q21.1	
chr2	Deletion	q33.1 - q37.3	<i>CREB1, IDH1, ATIC, FEV, PAX3, ACSL3</i>
chr2	Deletion	q37.3	
chr3	Deletion	p26.3 - p12.3	<i>SRGAP3, FANCD2, VHL, PPARG, RAF1, XPC, MLH1, MYD88, CTNNB1, SETD2, BAP1, PBRM1, FHIT, MITF, FOXP1</i>
chr3	Deletion	q26.1	
chr4	Deletion	p16.3 - p16.1	<i>FGFR3, WHSC1</i>
chr4	Deletion	p16.1	
chr4	Deletion	p16.1 - q22.1	<i>SLC34A2, PHOX2B, FIP1L1, PDGFRA, CHIC2, KIT, KDR</i>
chr4	Homozygous deletion	q22.1	
chr4	Deletion	q22.1 - q26	<i>RAP1GDS1, TET2</i>
chr4	Deletion	q26 - q35.2	<i>IL2, FBXW7</i>
chr5	Deletion	p15.33	
chr5	Deletion	q11.1 - q13.2	<i>IL6ST, PIK3R1</i>
chr5	Deletion	q13.2	
chr5	Deletion	q13.2 - q31.3	<i>APC</i>
chr5	Deletion	q31.3 - q35.3	<i>PDGFRB, CD74, ITK, EBF1, RANBP17, TLX3, NPM1, NSD1</i>
chr5	Deletion	q35.3	
chr7	Deletion	q11.21 - q22.1	<i>SBDS, ELN, HIP1, AKAP9, CDK6</i>
chr7	Deletion	q22.1	
chr7	Homozygous deletion	q22.1	
chr7	Deletion	q22.1 - q35	<i>MET, SMO, CREB3L2, KIAA1549, BRAF</i>
chr7	Deletion	q35 - q36.3	<i>EZH2, MLL3</i>
chr9	Homozygous deletion	p13.2 - p13.1	
chr9	Deletion	p13.1 - p12	
chr9	Homozygous deletion	p12 - p11.2	
chr9	Deletion	p11.2 - q13	
chr9	Deletion	q13	
chr9	Deletion	q21.11	
chr9	Deletion	q21.32	
chr11	Deletion	q22.3 - q25	<i>ATM, DDX10, POU2AF1, SDHD, PAFAH1B2, PCSK7, MLL, DDX6, CBL, ARHGEF12, FLI1</i>
chr13	Deletion	q11 - q34	<i>CDX2, FLT3, BRCA2, LHFP, LCP1, RB1, ERCC5</i>
chr18	Deletion	p11.32 - p11.31	
chr18	Deletion	p11.23 - p11.21	
chr18	Deletion	p11.21	
chr19	Deletion	q13.42	
chr21	Deletion	q11.2 - q22.12	<i>OLIG2, RUNX1</i>
chr21	Deletion	q22.2 - q22.3	<i>TMPRSS2, U2AF1</i>
chrX	Deletion	q24	

Tabela 10 - Regiões com alteração no número de cópias no tumor.

Chromosome Region	CNV	Cytoband	Cancer genes
chr1	Deletion	p21.1	
chr2	Amplification	p25.3 - p22.3	<i>MYCN, C2orf44, NCOA1, DNMT3A, ALK</i>
chr2	Homozygous deletion	p22.3	
chr3	High amplification	q23	
chr3	Deletion	q26.1	
chr4	Deletion	p16.3 - p11	<i>FGFR3, WHSC1, SLC34A2, PHOX2B</i>
chr4	Deletion	q11 - q35.2	<i>FIP1L1, PDGFRA, CHIC2, KIT, KDR, RAP1GDS1, TET2, IL2, FBXW7</i>
chr5	Deletion	p15.33	
chr5	Deletion	q13.2	
chr7	Amplification	p11.2	
chr7	Deletion	p11.2 - q36.3	<i>SBDS, ELN, HIP1, AKAP9, CDK6, MET, SMO, CREB3L2, KIAA1549, BRAF, EZH2, MLL3</i>
chr11	Deletion	q22.3 - q25	<i>ATM, DDX10, POU2AF1, SDHD, PAFAH1B2, PCSK7, MLL, DDX6, CBL, ARHGEF12, FLI1</i>
chr18	Deletion	p11.32 - p11.31	
chr18	High amplification	p11.31	
chrX	Amplification	q23	

Em negrito estão as alterações encontradas também na linhagem HCB-514.

5.1.7. Avaliação da expressão gênica na linhagem HCB-514

A partir do painel PanCancer Pathways Nanostring, o perfil de expressão de mRNA da linhagem HCB-514 foi comparado ao da linhagem de queratinócito normal, HaCat. Os resultados foram normalizados utilizando os genes housekeeping. Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram fold-change de 4 e $p < 0,01$.

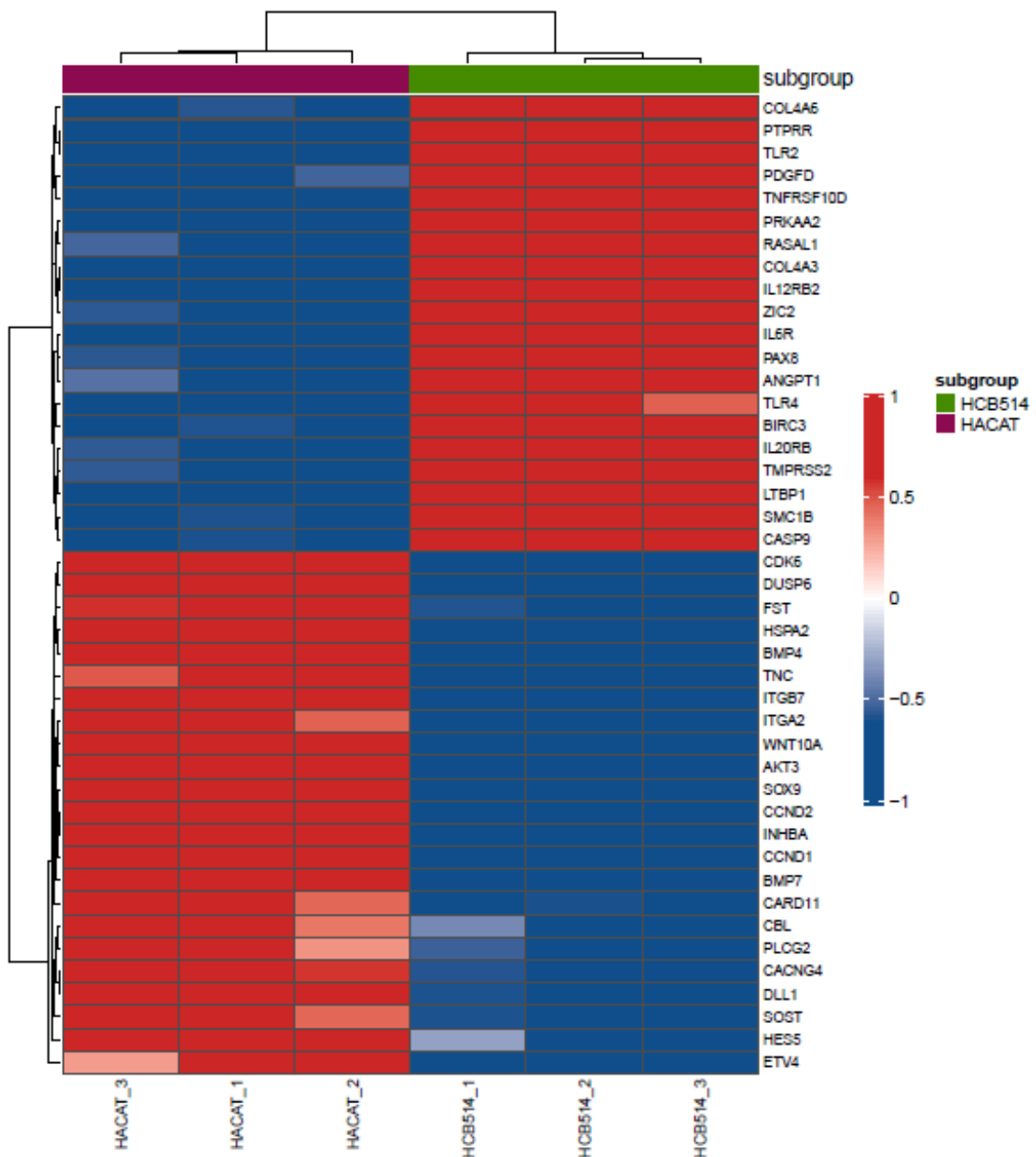


Figura 10 - Heatmap dos mRNA diferencialmente expressos na HCB-514 em comparação à HaCat.

Dentre os mRNAs com expressão reduzida na HCB-514, encontram-se *AKT3* e *WNT10A*, envolvidos na via de regulação da transição epitélio-mesenquimal, e *DUSP6*, cuja proteína está envolvida na inativação da sinalização de ERK. Dentre os mRNAs com expressão aumentada estão com função de receptores de interleucinas, *IL6R* e *IL12RB2* e receptores relacionados com a regulação do microambiente imunológico local, *TLR2* e *TLR4*.

5.1.8. Integração entre CNA e expressão gênica na linhagem HCB-514

Integrando os resultados de CNA com os de expressão gênica, verificou-se que os genes amplificados *BIRC3* e *PAX8* também estão com expressão aumentada. Além disso, os genes deletados *CBL* e *CDK6* também apresentaram redução de expressão. A função de *BIRC3* está relacionada com a inibição de apoptose e regulação de TLRs. A função de *PAX8* está relacionada com fator transcricional. O *CBL* codifica uma enzima que é recrutada para sinalizar substratos para degradação no proteossoma. Já *CDK6* tem função no ciclo celular.

5.1.9. Avaliação do potencial tumorigênico da linhagem HCB-514 em camundongos

Para avaliar se a linhagem tumoral estabelecida neste trabalho teria capacidade de formar tumor *in vivo*, ela foi inoculada em camundongos NSG, conforme descrito na sessão de materiais e métodos. Após inoculação das células (dia 0), os animais apresentaram bom estado geral, com boa absorção do matrigel, sem perda de peso ao longo dos dias. No 5º dia, foi possível visualizar um pequeno nódulo tumoral no grupo que recebeu maior número de células (1×10^7) e, no 7º dia, também foi visualizado nódulo de menor tamanho no grupo com menor número de células (5×10^6) (Figura 10). No 9º dia, os nódulos foram medidos. Este procedimento foi realizado ao menos 2 vezes por semana. Ao longo do experimento, a média do volume tumoral para o grupo que recebeu 1×10^7 células foi de $141,85 \text{ mm}^3$ no 9º dia, e de $653,30 \text{ mm}^3$ no 16º dia. No grupo que recebeu 5×10^6 a média foi de $87,57 \text{ mm}^3$ no 9º, e $497,53 \text{ mm}^3$ no 16º dia (Tabela 12).

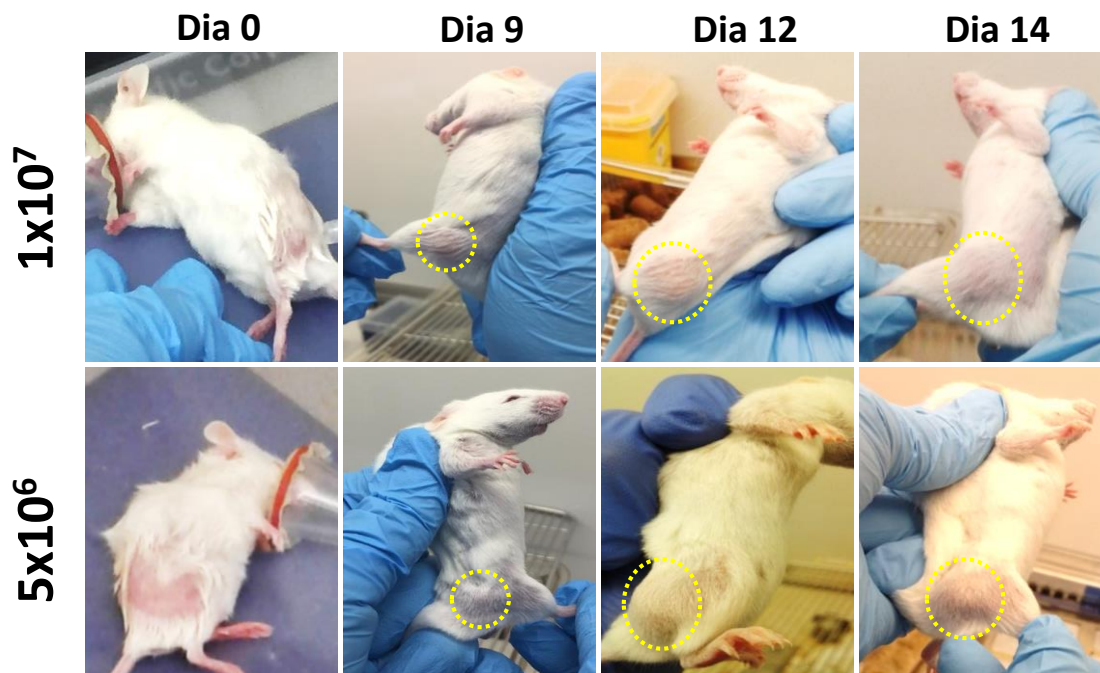


Figura 11 - Imagens dos animais antes da inoculação (Dia 0) e ao longo do crescimento tumoral após inoculação, quando foram feitas as medidas com paquímetro. A região tumoral está em destaque .

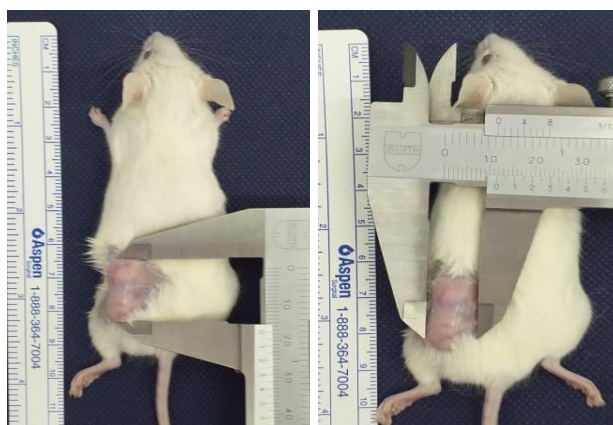


Figura 12 - Imagem do animal 03 injetado com 5×10^6 células HCB-514, no 28º dia após inoculação.

Tabela 11 - Média (\pm E.P.M.) do volume tumoral (em mm^3) em cada grupo.

Dias	1×10^7	5×10^6
9 ^o	141,85 \pm 31,55	87,57 \pm 33,32
12 ^o	504,75 \pm 207,77	401,25 \pm 37,94
14 ^o	609,45 \pm 140,14	405,40 \pm 38,77
16 ^o	653,30 \pm 117,32	497,53 \pm 62,68

Do 20° ao 28° dia os animais foram eutanasiados (conforme apresentavam dificuldade de locomoção), embora ainda apresentassem bom estado geral. O tumor foi retirado para histologia e o volume tumoral foi calculado, conforme descrito na metodologia. A curva do crescimento destes tumores encontra-se na Figura 12.

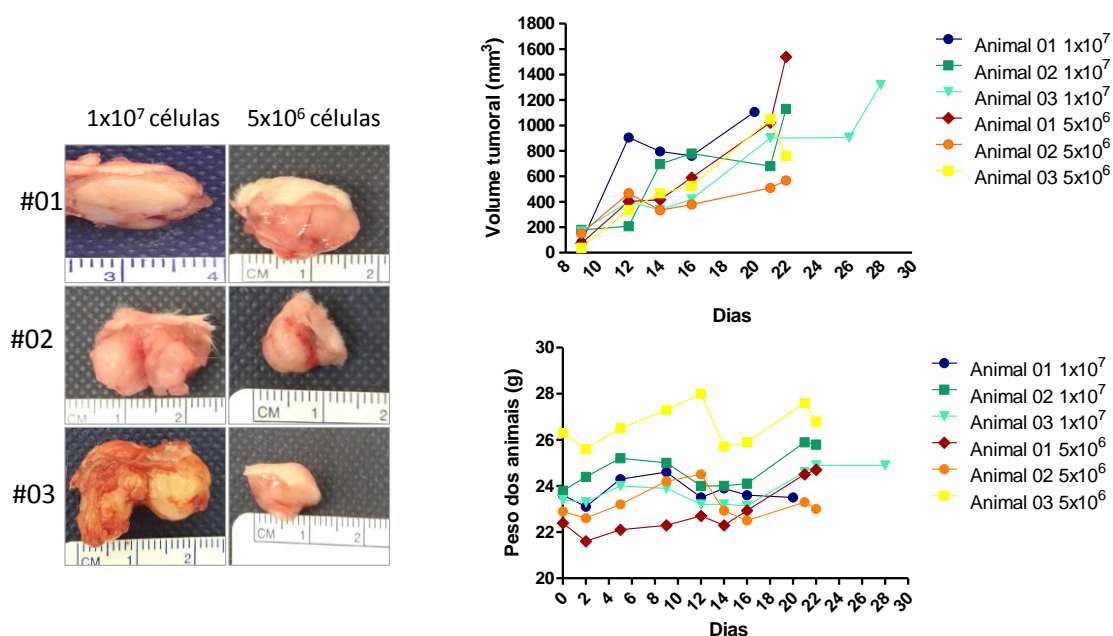


Figura 13 - A) Imagens dos tumores após excisão. Gráficos contendo B) volume tumoral e C) peso de cada animal ao longo das medições.

5.1.9.1 Avaliação histopatológica e imunoistoquímica dos tumores xenográficos da HCB-514

Através da avaliação histopatológica das lâminas coradas com H&E, todos os tumores excisados apresentaram desmoplasia (formação de tecido conjuntivo fibroso) ao redor de grupos de células tumorais HCB-514 (Figura 13). Tal efeito ocorre uma vez que o estroma do camundongo passa a interagir com as células do xenotransplante. Além disso, a ausência de marcação no centro dos nichos de células tumorais, juntamente com os núcleos de menor tamanho verificados com H&E, indicam processo de queratinização na região, provavelmente devido à distância em que as células HCB-514 desta região se encontravam dos vasos sanguíneos do camundongo. Alguns tumores também apresentaram infiltração na fibra muscular dos camundongos.

Os tumores retirados após experimento foram processados e submetidos a imunohistoquímica para p16, p40, ki-67 e p63, conforme detalhado na metodologia. Os tumores apresentaram positividade para a proteína p16, com padrão de marcação tanto nuclear quanto citoplasmático, tal como a marcação encontrada no tumor da paciente e no *cell block* da linhagem da Figura 6 desta tese. Também houve positividade para p40, com padrão de marcação nuclear, tal como encontrado nas amostras citadas (seção). Adicionalmente, também foi houve positividade para as proteínas p63 e ki-67, com padrão de marcação nuclear (Figura 13).

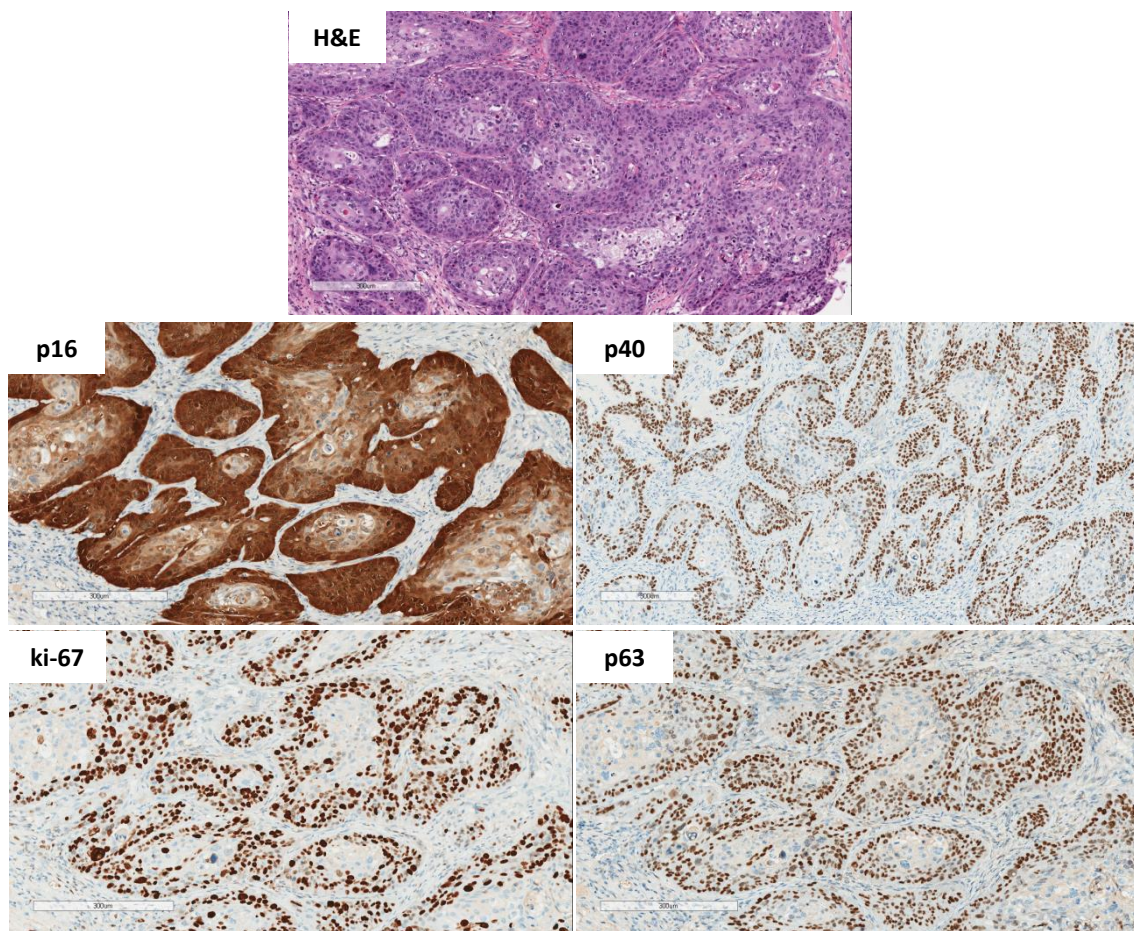


Figura 14 - Imagens representativas a marcação de H&E e imunohistoquímicas dos tumores de HCB-514 retirados dos camundongos. As imagens são do animal 3, inoculado com 5×10^6 . Os anticorpos estão indicados na figura. H&E (hematoxilina-eosina).

5.2 Avaliação do potencial antineoplásico de extratos naturais em linhagens de colo uterino

5.2.1. Triagem inicial com extratos brutos obtidos de diferentes plantas

A triagem foi realizada com os seguintes extratos: 1, 2, 3, 7, 8, 10, 14-I, 15-I, 16-I, 17, 18, 19, 21-I. Todos foram obtidos a partir das folhas das respectivas plantas, indicadas na tabela 12. Os mesmos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 50 mg/mL, sendo esta a concentração da solução de estoque. As doses testadas variaram de 2,5 µg/mL até 300 µg/mL.

Tabela 12 - Identificação dos extratos testados.

Identificação dos Extratos	Nome Popular	Nome Científico	Família	Registro
1	Pau pombo	<i>Tapirira guianensis</i>	<i>Fabaceae</i>	143407 BHCB
2	Gonçalo-Alves	<i>Astronium fraxinifolium</i>	<i>Anacardiaceae</i>	143403 BHCB
3	Pimenta-de-Macaco	<i>Xylopia aromatica</i>	<i>Annonaceae</i>	43397 BHCB
7	Araticum	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Annonaceae</i>	143400 BHCB
8	Negramina	<i>Siparuna guianensis</i>	<i>Siparunaceae</i>	143404 BHCB
10	Marcela	<i>Achyrocline alata</i>	<i>Asteraceae</i>	11486 CG/MS
14-I	Pata-de-vaca lilás	<i>Bauhinia variegata</i>	<i>Fabaceae</i>	161589 BHCB
15-I	Pata-de-vaca branca	<i>Bauhinia variegata candida</i>	<i>Fabaceae</i>	161590 BHCB

16-I	Pata-de-viado	<i>Bauhinia unguolata</i>	<i>Fabaceae</i>	161588 BHCB
17	Pixirica-da-mata	<i>Miconia cuspidata</i>	<i>Melastomataceae</i>	44998 HUFU
18	Canela de velho	<i>Miconia albicans</i>	<i>Melastomataceae</i>	56558 HUFU
19	Pixirica-açu	<i>Miconia chamissois</i>	<i>Melastomataceae</i>	59592 HUFU
21-I	Barbatimão	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	<i>Fabaceae</i>	169871 BHCB

Os valores de IC₅₀ estão representados no gráfico abaixo, com destaque para o extrato 7 (Figura 14).

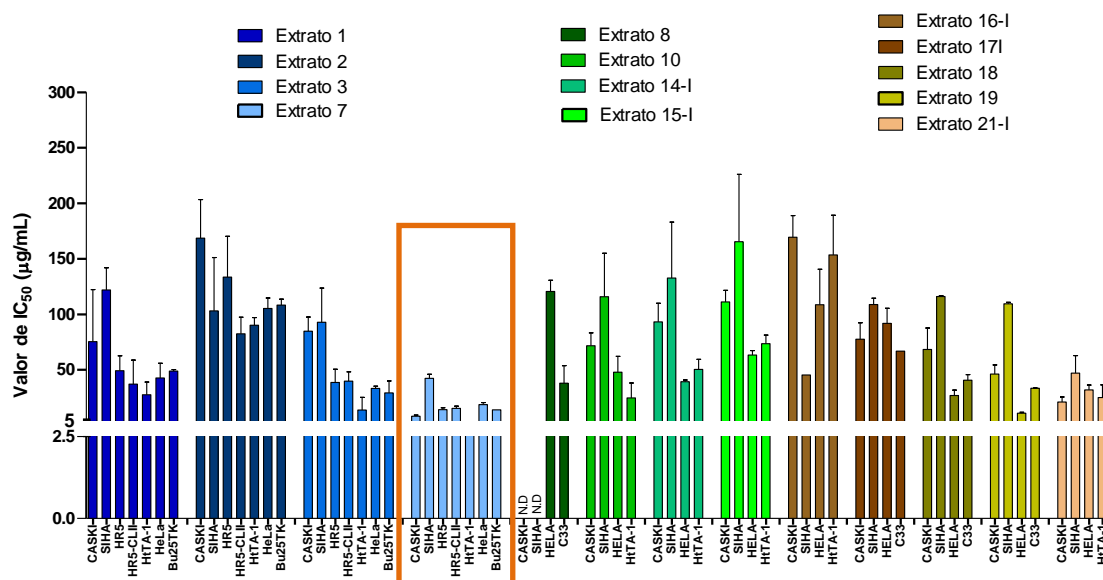


Figura 15 - Efeito dos extratos de diferentes espécies de plantas nas linhagens tumorais de colo uterino. A viabilidade celular foi mensurada após 72 horas, através do ensaio de MTS. Os resultados foram expressos como a porcentagem média \pm S.E.M. das células viáveis em relação à porcentagem da viabilidade do grupo DMSO sozinho (viabilidade considerada como 100%). A concentração de IC₅₀ foi calculada por regressão não-linear usando o Graphpad Prism software. Os dados representam a

media de pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata. N.D.=não determinado

5.2.2. Triagem com partições obtidas da planta *Annona crassiflora*

Dentre os extratos testados, aquele obtido a partir da planta *Annona crassiflora* (7) foi o que apresentou melhor resultado na redução da viabilidade celular nas linhagens de colo uterino. Como extratos brutos são compostos por uma grande diversidade de substâncias, para a continuação do estudo, este extrato foi particionado para avaliar qual partição apresentaria resultados mais próximos aos do extrato.

Para estes ensaios, pelo fato de as partições terem uma composição um pouco mais pura do que os extratos brutos, determinou-se que a curva de concentrações seria de até 50 µg/mL. Esse valor foi baseado em publicações do órgão americano NCI, que considera que um composto natural tenha potencial antitumoral contanto que a concentração para obter tal efeito não ultrapasse 30 µg/mL (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990 *apud* DE MESQUITA *et al.*, 2009)⁵⁸. As concentrações testadas foram: 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 µg/mL.

Na figura 15 estão representados os valores das IC₅₀ de todas as partições testadas. Todas elas apresentaram capacidade de reduzir a viabilidade em pelo menos três linhagens. No entanto, as menores médias de IC₅₀ foram das partições C e D (Tabela 13). Logo, na próxima etapa, foram utilizadas as frações referentes a estas partições para ensaio.

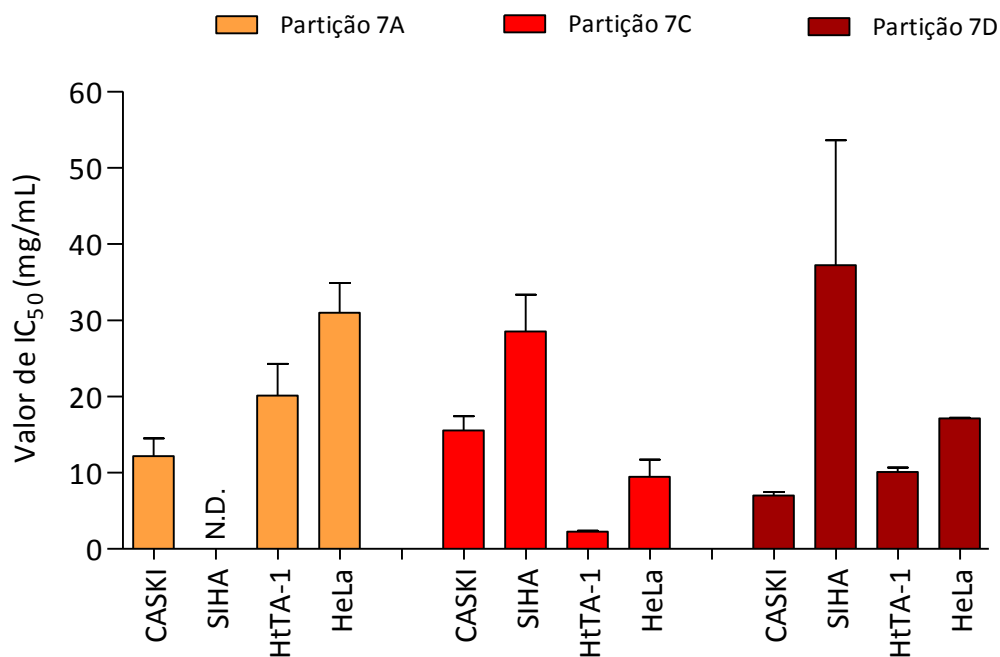


Figura 16 - Efeito das partições hidroalcoólica (A), clorofórmica (C) e acetato de etila (D) e de *A. crassiflora* nas linhagens tumorais de colo uterino. A viabilidade celular foi mensurada após 72 horas, através do ensaio de MTS. Os resultados foram expressos como a porcentagem média \pm S.E.M. das células viáveis em relação à porcentagem da viabilidade do grupo DMSO sozinho (viabilidade considerada como 100%). A concentração de IC₅₀ foi calculada por regressão não-linear usando o Graphpad Prism software. Os dados representam a média de pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata. N.D.=não determinado.

Tabela 13 - Valores de IC₅₀ em $\mu\text{g/mL}$ (média \pm D.P.) das partições da *Annona crassiflora* nas linhagens tumorais de colo uterino.

Partições	CaSki	SiHa	HtTA-1	HeLa	IC ₅₀ Média
7A	12,17 \pm 2,32	>50	20,13 \pm 4,14	30,99 \pm 3,89	21,10
7C	15,56 \pm 1,85	28,54 \pm 4,81 \pm	2,27 \pm 0,11	9,45 \pm 2,25	13,96
7D	7,03 \pm 0,43	37,21 \pm 16,41	10,08 \pm 0,58	17,11 \pm 0,12	17,86

5.2.3. Triagem com frações obtidas da planta *Annona crassiflora*

Nesta nova etapa, foram testadas 10 frações obtidas da partição clorofórmica e 09 frações obtidas da partição acetato de etila. As doses foram as mesmas utilizadas para as partições (de 0,78 até 50 $\mu\text{g/mL}$). Devido à grande quantidade de frações a

serem testadas, optou-se por iniciar o screening apenas com 2 linhagens para depois testarmos somente as frações que apresentaram atividade, dentro dessas doses, nas demais linhagens.

Inicialmente, as frações foram testadas nas linhagens HeLa e SiHa. Após 72 de tratamento, as frações nomeadas de: 7C18, 7C22, 7C39, 7C52, 7D7, 7D10, 7D37 não apresentaram efeito em nenhuma dose testada, não sendo, portanto, testadas nas demais linhagens.

Nas figuras 16 e 17 estão representados os valores das IC_{50} de todas as frações testadas. Considerando a citotoxicidade nas quatro linhagens, o efeito mais evidente foi observado na fração 7C24, com média das linhagens de 25 $\mu\text{g/mL}$, seguida pelas frações 7C28 (27 $\mu\text{g/mL}$), 7D13 (27 $\mu\text{g/mL}$) e 7D1 (31 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 13).

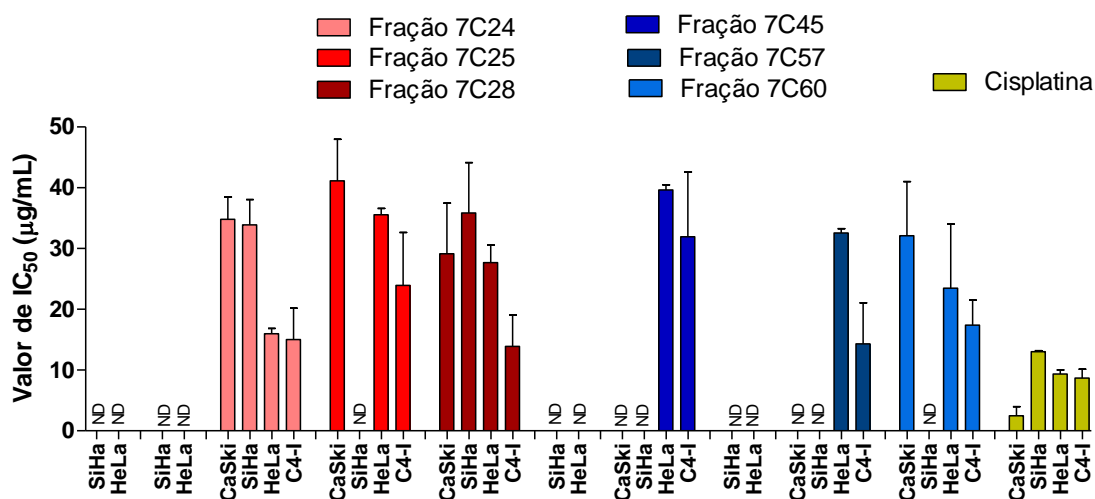


Figura 17 - Efeito das diferentes frações da partição clorofórmica de *A. crassiflora* nas linhagens tumorais de colo uterino. A viabilidade celular foi mensurada após 72 horas, através do ensaio de MTS. Os resultados foram expressos como a porcentagem média \pm S.E.M. das células viáveis em relação à porcentagem da viabilidade do grupo DMSO sozinho (viabilidade considerada como 100%). A concentração de IC_{50} foi calculada por regressão não-linear usando o *Graphpad Prism software*. Os dados representam a media de pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata. N.D.=não determinado.

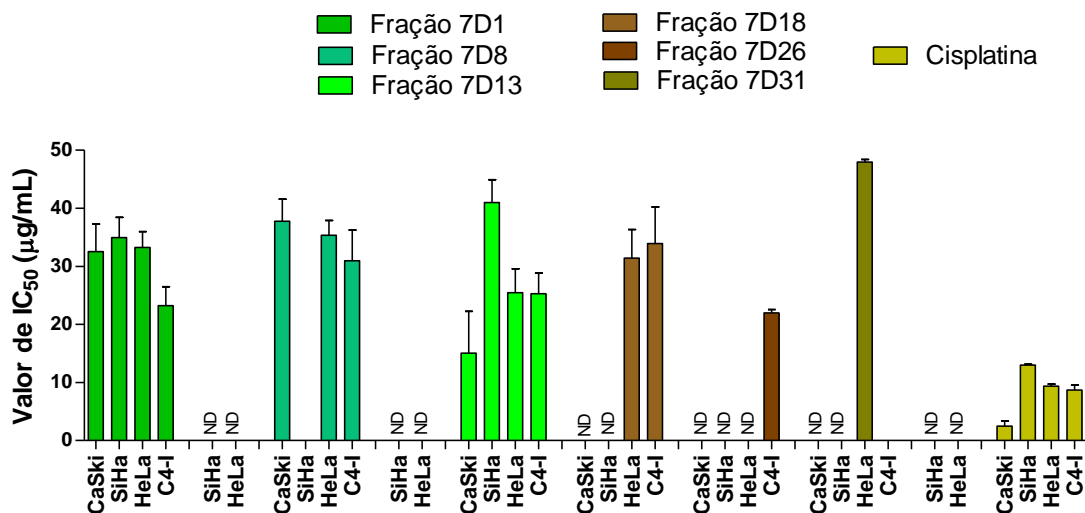


Figura 17 - Efeito das diferentes frações da partição acetato de etila de *A. crassiflora* nas linhagens tumorais de colo uterino. A viabilidade celular foi mensurada após 72 horas, através do ensaio de MTS. Os resultados foram expressos como a porcentagem média \pm S.E.M. das células viáveis em relação à porcentagem da viabilidade do grupo DMSO sozinho (viabilidade considerada como 100%). A concentração de IC₅₀ foi calculada por regressão não-linear usando o *Graphpad Prism software*. Os dados representam a media de pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata. N.D.=não determinado.

Tabela 14 - Valores de IC₅₀ em µg/mL (média±D.P.) das frações de *A. crassiflora* e cisplatina (quimioterápico usado na prática clínica).

Frações	CaSki	SiHa	HeLa	C4-I	IC ₅₀ Média
7C24	34,81±3,67	33,88±4,17	15,96±0,89	15,01±5,19	24,92
7C25	41,14±6,86	>50	35,55±1,06	23,92±8,74	33,54
7C28	29,13±8,34	35,85±8,29	27,7±2,86	13,9±5,16	26,65
7C45	>50	>50	39,64±0,86	31,95±10,66	35,80
7C57	>50	>50	32,58±0,69	14,30±6,76	23,44
7C60	32,11±8,90	>50	23,47±10,56	17,4±4,13	24,33
7D1	32,55±8,17	34,94±6,09	33,25±3,88	23,22±5,67	30,99
7D8	37,79±5,36	>50	35,36±3,59	30,96±9,15	34,70
7D13	15,05±10,22	41,01±5,53	25,46±7,12	25,29±6,21	26,70
7D18	>50	>50	31,42±8,55	33,94±10,88	32,68
7D26	>50	>50	>50	21,98±0,83	21,98
7D31	>50	>50	47,97±0,60	>50	47,97
Cisplatina	2,49±1,50	13,01±0,16	9,36±0,65	8,70±1,45	8,39

Valores em negrito indicam as frações que tiveram efeito para as 4 linhagens avaliadas.

5.2.4. Identificação de grupos de compostos e prováveis moléculas na espécie *A. crassiflora*

Através do estudo fitoquímico, foi detectada a presença de alguns grupos de metabólitos secundários, descritos na tabela abaixo (Tabela 15).

Tabela 15 - Detecção de compostos secundários presentes nos extratos da planta *A. crassiflora* através de estudo fitoquímico.

Plantas	Esteroides Triterpenoides	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Alcaloides	Cumarinas
7EB	-	+	+	+	+	+
7A	-	+	-	+	-	+
7C	-	+	-	+	+	+
7D	-	+	-	+	-	+

7EB (extrato bruto de *Annona crassiflora*); A (partição hidroalcóolica), , C (partição clorofórmica), D (partição aceto de etila); + (resultado positivo); - (resultado negativo).

A fim de identificar quais seriam as possíveis moléculas presentes em algumas das partições ou frações que tiveram efeito na viabilidade das células, foi realizada a espectrometria de massas ESI (-) FT-ICR para a partição 7C e as frações 7C24. O perfil de massa foi analisado na magnitude de 100 até 700 m/z (Figura 19 e 20). Com este perfil, foi possível identificar algumas das moléculas presentes (Tabela 16 e 17) .

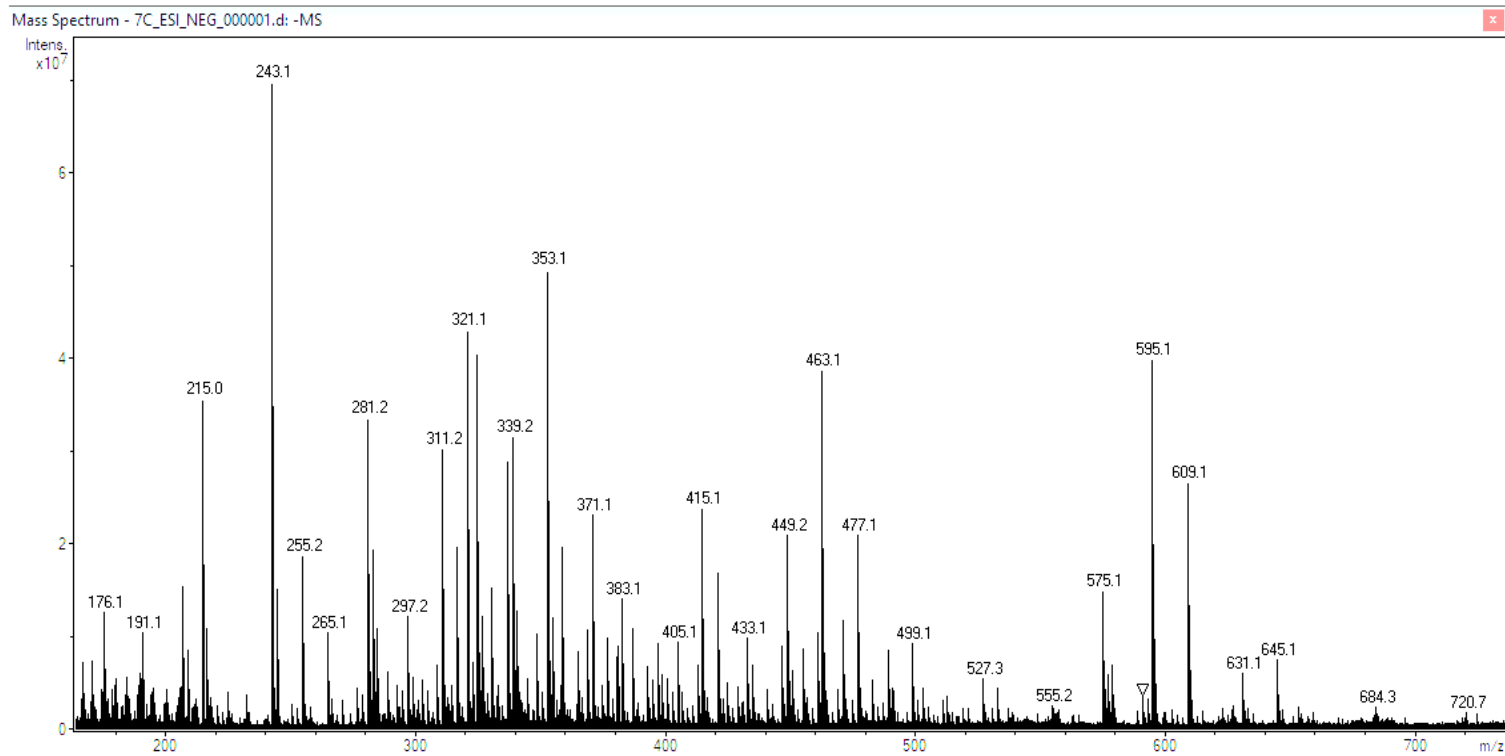


Figura 19 – Dados sobre espectrometria de massas da partição 7C de *A. crassiflora*.

Tabela 16 - Estruturas propostas por ESI(-)FT-ICR MS para a partição 7C

<i>m/z</i> <i>mensurada</i>	<i>m/z</i> <i>teórica</i>	Erro (ppm)	DBE	[M-H] ⁻	Possível molécula	Referência
215.03291	215.0323	-2.85	10	[C ₈ H ₃ N ₆ O ₂ -H+] ⁻	N.I.	-
243.06422	243.0636	-2.56	10	[C ₁₀ H ₇ N ₆ O ₂ -H+] ⁻	N.I.	-
255.23315	255.23295	-0.75	1	[C ₁₆ H ₃₁ O ₂ -H+] ⁻	Ácido hexadenoico (ácido palmítico)	83,84
281.24884	281.2486	-0.85	2	[C ₁₈ H ₃₃ O ₂ -H+] ⁻	(Z)-9-Octadecenoic acid (ácido oleico)	KNAPSAcK dtabase; ⁸⁴ ; 85
297.24379	297.24352	-0.92	2	[C ₁₈ H ₃₃ O ₃ -H+] ⁻	Ácido ricinoleico	KNAPSAcK database;84
311.16891	311.16846	-1.44	1	[C ₁₉ H ₂₃ N ₆ O ₆ -H+] ⁻	N.I.	-
317.03059	317.03029	-0.94	11	[C ₁₅ H ₉ O ₈ -H+] ⁻	N.I.	-
321.05954	321.05891	-1.98	10	[C ₁₁ H ₉ N ₆ O ₆ -H+] ⁻	N.I.	-
339.20029	339.20109	2.36	6	[C ₁₂ H ₂₂ N ₁₀ O ₂ -H+] ⁻	N.I.	-
353.08821	353.08781	-1.13	8	[C ₁₆ H ₁₇ O ₉ -H+] ⁻	Ácido 4-O-E-cafeoilquínico	86
359.11992	359.1195	-1.17	1	[C ₁₂ H ₂₃ O ₁₂ -H+] ⁻	N.I.	-
371.11991	371.1195	-1.11	2	[C ₁₃ H ₂₃ O ₁₂ -H+] ⁻	N.I.	-
415.12514	415.12459	-1.35	7	[C ₁₈ H ₂₃ O ₁₁ -H+] ⁻	Alpinoside	KNAPSAcK database
463.08891	463.0882	-1.53	12	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ -H+] ⁻	Quercetin 3-O-glucoside	⁸⁷
477.10455	477.10385	-1.46	12	[C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ -H+] ⁻	Quercetin-O-methyl-O-hexoside	86
499.06575	499.06624	0,97	8	[C ₁₁ H ₁₅ N ₈ O ₁₅ -H+] ⁻	N.I.	-

575.12071	575.12084	-0.23	24	[C ₃₁ H ₁₉ N ₄ O ₈ - H ⁺]-	N.I.	-
595.13169	595.1318	0.18	18	[C ₂₇ H ₂₃ N ₄ O ₁₂ - H ⁺]-	N.I.	-
609.14742	609.14796	0.88	1	[C ₁₅ H ₃₃ N ₂ O ₂₃ - H ⁺]-	N.I.	-
645.12426	645.12414	-0.17	9	[C ₁₇ H ₂₅ N ₈ O ₁₉ -H ⁺]-	N.I.	-

DBE (equivalente de duplas ligações); m/z (razão massa sobre carga); N.I. (Não identificada).

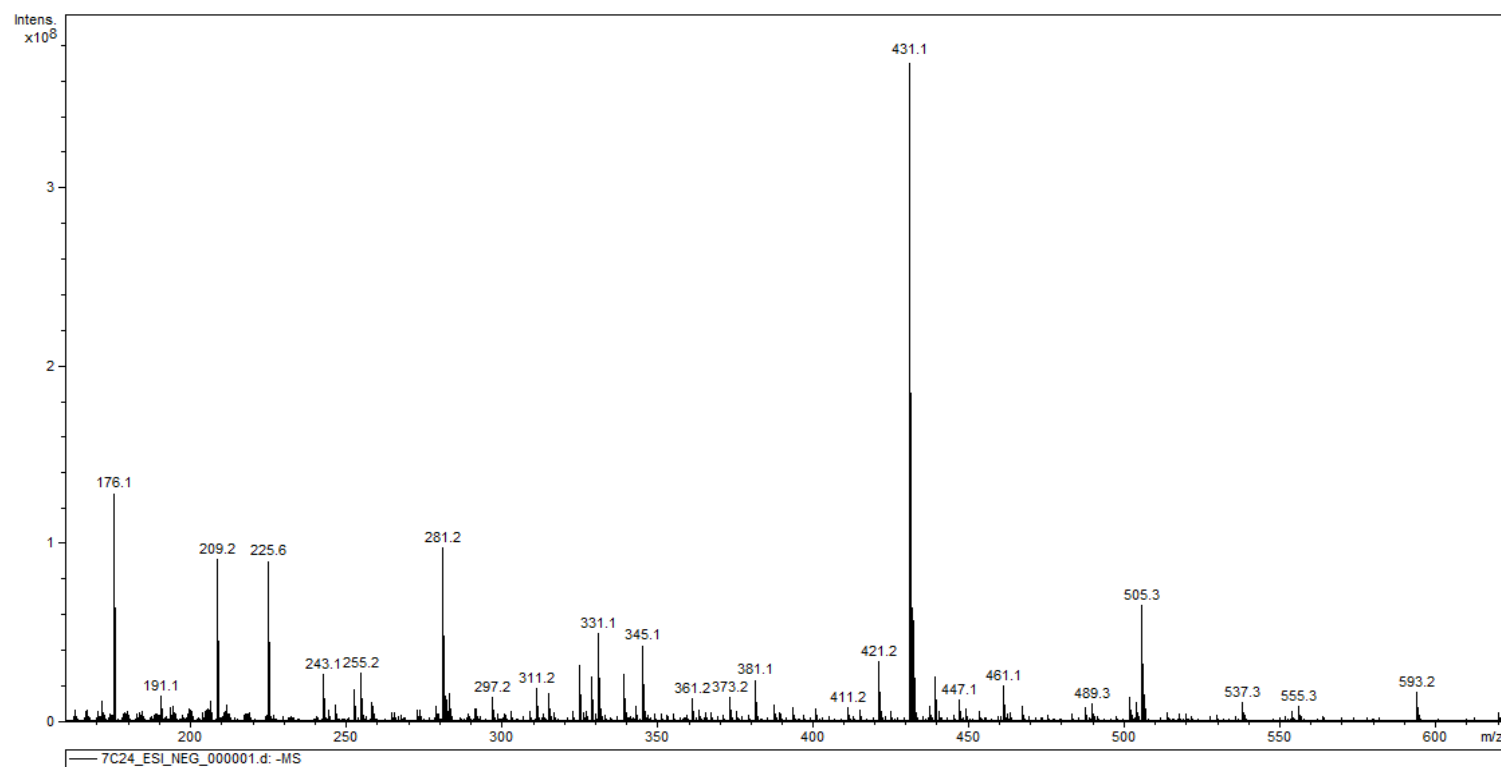


Figura 20- Dados sobre espectrometria de massas da partição 7C24 de *A. crassiflora*

Tabela 17 - Estruturas propostas por ESI(-)FT-ICR MS para a fração 7C24

<i>m/z</i> <i>mensurada</i>	<i>m/z</i> <i>teórica</i>	Erro (ppm)	DBE	[M-H] ⁻	Possível molécula	Referência
281.24879	281.2486	-0.66	2	[C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁻ H ⁺]-	(Z)-9-Octadecenoic acid (ácido oleico)	KNAPSAcK database; 84;85
331.0826	331.0823	-0.28	10	[C ₁₇ H ₁₅ O ₇ ⁻ H ⁺]-	N.I.	-
431.09868	431.0984	-0.72	12	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ ⁻ H ⁺]-	kaempferol-3-O-rhamnoside	88, 89
505.30244	505.3018	-1.23	33	[C ₂₅ H ₄₅ O ₁₀ ⁻ H ⁺]-	N.I.	-
593.15213	593.153	1.55	1	[C ₁₅ H ₃₃ N ₂ O ₂₂ ⁻ H ⁺]-	N.I.	-

DBE (equivalente de duplas ligações); m/z (razão massa sobre carga); N.I. (Não identificada).

Dentre as frações testadas, 7C24 foi uma das que apresentaram menores valores de IC₅₀. Por isso, foi selecionada para os ensaios funcionais a fim de melhor caracterizar seu efeito nas linhagens de colo uterino.

5.2.3.1. Modulação de vias de sinalização por 7C24 de *Annona crassiflora*

Para investigar o efeito de 7C24 em alguns processos celulares, como o de morte, as células SiHa e HeLa foram tratadas com seus respectivos valores de IC₅₀ com 7C24 (33,88 e 15,96, respectivamente) e cisplatina (13,01 e 9,36, respectivamente). Após 24 h, foi realizado o *Western blotting*. Nestas condições, foi detectada clivagem de PARP e fosforilação da histona H2AX para SiHa e um aumento desta clivagem e de p-H2AX para a linhagem mais sensível, HeLa, indicando morte celular programada, bem como dano ao DNA. Além disso, para a linhagem SiHa, 7C24 induziu o aumento de p21, enquanto a cisplatina induziu a redução desta proteína. Na HeLa, ambos os tratamentos induziram redução de p21 (Figura 21). As alterações nesta proteína são indicativas de modulação do ciclo celular.

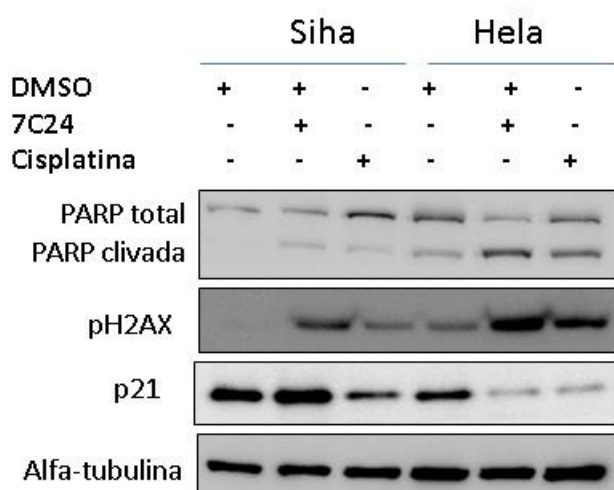


Figura 21 - Avaliação do efeito de 7C24 em proteínas envolvidas em processos celulares nas linhagens SiHa e HeLa. As células foram tratadas por 24 h e, após extração das proteínas, foi realizado o *Western blotting*. + (presente), - (ausente).

5.2.3.2. Avaliação do ciclo celular com a fração 7C24 de *Annona crassiflora*

Para avaliar o efeito de 7C24 no ciclo celular, a linhagem SiHa recebeu tratamento com a IC₅₀ desta fração. Após 24 h, as células foram submetidas ao

procedimento para marcação de seu DNA com iodeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo, conforme descrito anteriormente. Os resultados mostraram parada do ciclo em G0/G1, demonstrada pelo aumento significativo de células nesta fase (de 80,2 para 85,2%), com redução na fase S (de 12,0 para 6,5%) (Figura 22).

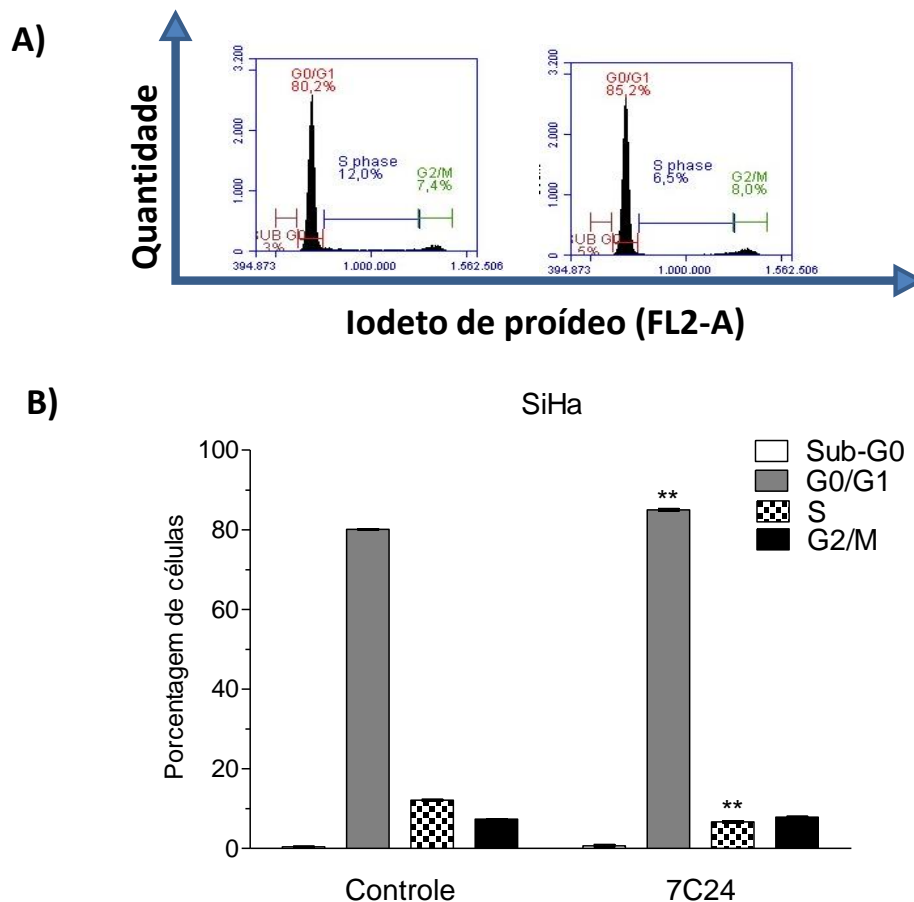


Figura 22 - Representação dos resultados do ciclo celular na SiHa, 24 h após tratamento com 33,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 7C24. A) Histograma representativo dos resultados. B) Gráfico com os valores e análise estatística. ** $p < 0,01$.

5.3. Investigação da atividade antineoplásica de combi-moléculas, com dupla função (inibidora de EGFR e alquilante do DNA), em linhagens de colo uterino

5.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Após 72 horas de tratamento com as combi-moléculas e com Gefitinibe e Clorambucil, foi realizado ensaio de MTS, que originou as curvas dose-resposta da Figura 14. Com relação à sensibilidade aos tratamentos, foi encontrado um padrão, sendo a linhagem SiHa mais resistente, seguida por HeLa, HCB-514, C4-I e CaSki (Figuras 23 e 24, Tabela 18).

Utilizando a linhagem murina de fibroblasto, NIH-3T3, foi possível calcular o índice de seletividade (IS) para as moléculas (Tabela 19). Os índices acima de 2 estão destacados na Tabela 17. Tanto as moléculas ZR2002 e JS-61 foram seletivas para as linhagens tumorais C4-I e CaSki. Já a molécula JS-84 foi seletiva tanto para C4-I e CaSki, quanto para HCB-514. Interessantemente, as três moléculas foram mais seletivas do que a cisplatina. Além disso, uma outra linhagem normal, desta vez humana, foi utilizada para comparar os efeitos dos tratamentos. Usando como parâmetro a linhagem humana normal de queratinócito, HaCaT, os índices de seletividade de ZR2002 foram maiores do que 15 vezes para HeLa, C4-I, CaSki e HCB-514, enquanto para SiHa este índice foi de 2,2 vezes. A seletividade de JS-84 para C4-I, CaSki e HCB-514 foi semelhante à seletividade determinada com NIH-3T3. Já a molécula JS-61 não se mostrou seletiva usando a HaCaT como parâmetro, embora tenha apresentado valores próximos a 2 nas mesmas linhagens para as quais houve seletividade com NIH-3T3 (C4-I e CaSki). Para cisplatina, ainda não foi possível determinar o IS, pois as triplicatas ainda não estão completas.

A partir deste ensaio, foram selecionadas uma linhagem mais resistente, a SiHa, uma mais sensível, a CasKi e a linhagem estabelecida neste trabalho, a HCB-514 para os demais ensaios funcionais. Além disso, uma vez que as combi-moléculas ZR2002 e JS-84 demonstraram maior eficiência do que JS-61, elas foram selecionadas para a realização dos demais ensaios. Uma vez que o intuito desta investigação é também comparar o efeito das combi-moléculas, tanto com a combinação de Gefitinibe + Clorambucil e com a Cisplatina, foram selecionadas duas doses, que contemplassem todos os valores de IC₅₀ das linhagens. Desta forma, em uma mesma concentração,

será possível avaliar qual efeito cada droga causa em células que apresentam diferentes perfis de sensibilidade. Neste sentido, as doses selecionadas foram 2 e 20 μM .

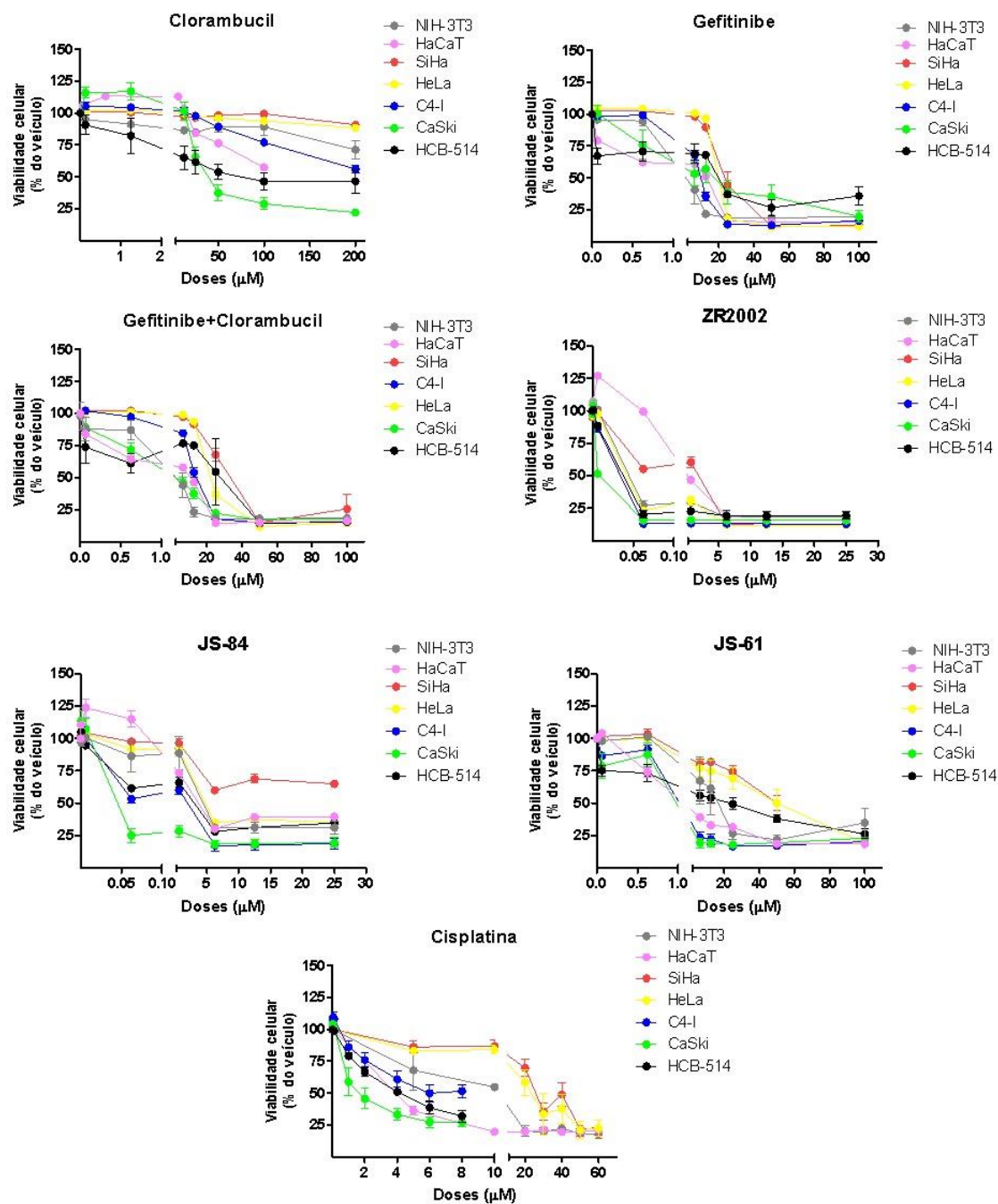


Figura 23 - Curvas dose-resposta das combi-moléculas testadas em linhagens tumorais de colo uterino, na NIH-3T3 e na HaCaT. A viabilidade celular foi mensurada após 72 horas, através do ensaio de MTS. Os resultados foram expressos como a porcentagem média \pm E.P.M. das células viáveis em relação à porcentagem da viabilidade do grupo DMSO ou NaCl 0,9% sozinhos (viabilidade considerada como 100%) através do *Graphpad Prism software*. Os dados representam a média de pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata.

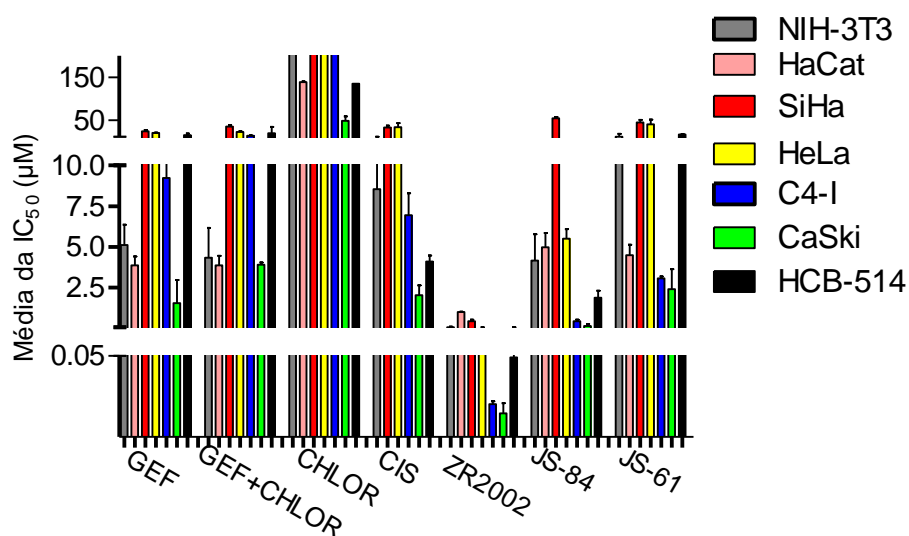


Figura 24 - Efeito das combi-moléculas em linhagens tumorais de colo uterino. A viabilidade celular foi mensurada após 72 horas, através do ensaio de MTS. A concentração de IC₅₀ foi calculada por regressão não-linear usando o Graphpad Prism software. Os dados representam a média de pelo menos dois experimentos independentes feitos em triplicata. As barras que ultrapassam o eixo y indicam valores maiores do que a maior dose testada.

Tabela 18 - Valores de IC₅₀ em µM (Média ± E.P.M.).

	Clorambucil	Gefitinibe	Gef+Clor	ZR2002	JS-84	JS-61	Cisplatina
NIH-3T3	>200	5±1,2	4±1,8	0,079±0,023	4,2±1,6	11,51±6,5	8,5±2,6
HaCaT	138,8±1,8	3,9±0,6	3,9±0,6	1,0±0,03	5,0±0,9	4,49±0,66	4,6±0,7.
SiHa	>200	24±2,6	35±4	0,446±0,088	54,3±3,03	44,5±6	39±4,4
HeLa	>200	20±0,4	22,7±1,1	0,058±0,018	5,5±0,584	40,4±10,9	33±9,5
C4-I	>200	9±0,8	13,8±0,9	0,020±0,0017	0,448±0,0866	3,06±0,12	6,9±1
CaSki	48±10,7	1,6±1,4	3,9±0,1	0,015±0,006	0,151±0,111	2,42±1,23	2±0,6
HCB-514	135,2±0	15,4±3,1	19±14,8	0,049±0,025	1,889±0,419	16,8±0,3	4±0,4
Média	N.D.	14	19	0,112	12,46	21,44	17

Média não inclui os valores de NIH-3T3 e HaCaT.

Tabela 19 - Índice de seletividade (IS) das combi-moléculas.

Tratamentos	Gefitinibe		Clorambucil		Gefitinibe+ Clorambucil		ZR2002		JS-84		JS-61		Cisplatina	
	NIH-3T3	HaCaT	NIH-3T3	HaCaT	NIH-3T3	HaCaT	NIH-3T3	HaCaT	NIH-3T3	HaCaT	NIH-3T3	HaCaT	NIH-3T3	HaCaT
SiHa	0,2	0,2	N.D.	N.D.	0,1	0,1	0,2	2,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	8,5
HeLa	0,3	0,2	N.D.	N.D.	0,2	0,2	1,4	17,2	0,8	0,9	0,3	0,1	0,3	7,2
C4-I	0,6	0,4	N.D.	N.D.	0,3	0,3	4,0	50,0	9,4	11,2	3,8	1,5	1,2	1,5.
CaSki	3,1	2,4	N.D.	N.D.	1,0	1,0	5,3	66,7	27,8	33,1	4,8	1,9	4,3	0,4
HCB-514	0,3	0,3	N.D.	N.D.	0,2	0,2	1,6	20,4	2,2	2,6	0,7	0,3	2,1	0,9.

Valores em negrito indicam IS acima de 2. N.D. (não determinado).

5.3.2. Efeito das combi-moléculas no potencial de migração celular

Para o ensaio de migração, $2,5 \times 10^5$ células foram adicionadas a cada inserto e os tratamentos utilizados foram: DMSO, cisplatina, gefitinibe + clorambucil, ZR2002 e JS-84, todos na dose de 20 μ M.

Para a linhagem mais sensível, CaSki, a média no controle foi de 186 células (100%). Os tratamentos com ZR2002, JS-84, Gef+Clor e Cis apresentaram respectivamente 99,5; 92,5; 94,2 e 52,8 % de redução em relação ao controle, todos significativos.

Para a linhagem HCB-514, a média do controle foi de 401 (100%) células. Os tratamentos com ZR2002, JS-84, Gef+Clor e Cis apresentaram respectivamente 99,9; 94,0; 77,7 e 87,1 % de redução em relação ao controle, todos também significativos

Para a linhagem SiHa, enquanto o controle apresentou migração média de 723 (100%) células por campo, os tratamentos com ZR2002 e Cis apresentaram redução significativa de 99,7 e 86,8% das células, respectivamente. Os tratamentos com JS-84 e Gef+Clor apresentaram a mesma tendência, com redução de 25,4 e 9,2%, respectivamente (Figuras 24 e 25).

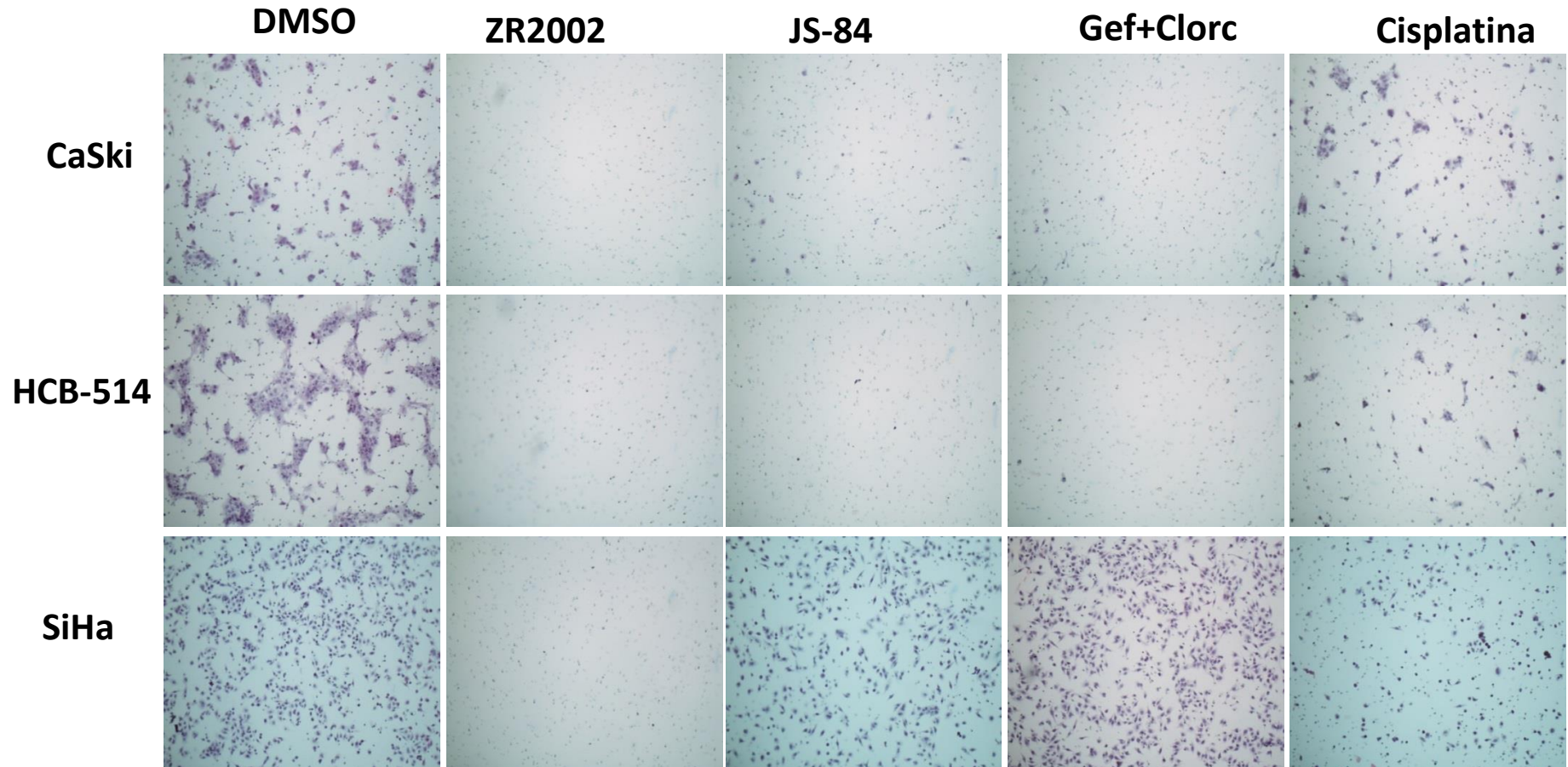


Figura 24 - Imagens representativas do ensaio de migração por inserto. As células foram tratadas com 20 uM de cada droga para permitir comparação dos efeitos das combi-moléculas. Após 24h as células foram fixadas e coradas com HE.

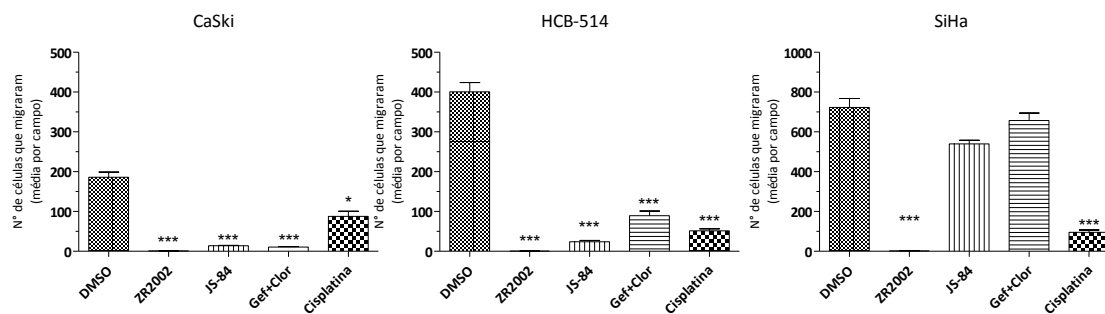


Figura 25 - Avaliação do efeito das moléculas na migração celular a partir da quantificação das imagens. As linhagens SiHa, CaSki e HCB-514 ($2,5 \times 10^5$ células) juntamente com as moléculas diluídas em meio sem SFB foram adicionadas no interior de um inserto, que foi inserido em um poço contendo meio quimioatrativo (com 10% SFB). Após 24h, as células foram fixadas, coradas com HE e montadas em lâmina para posterior fotodocumentação. A quantificação foi realizada através do programa ImageJ. O resultado representa a média \pm E.P.M; de dois experimentos realizados em duplicata.

5.3.3. Efeito das combi-moléculas no potencial de invasão celular

Para o ensaio de invasão, $2,5 \times 10^5$ células foram adicionadas a cada inserto e os tratamentos utilizados foram os mesmos do ensaio de migração, também na dose de 20 μ M. Para a linhagem, CaSki, a média no controle foi de 148 células (100%). Os tratamentos com ZR2002, JS-84, Gef+Clor e Cis apresentaram respectivamente 99,2; 92,6 e 99,2, 82,5 % de redução em relação ao controle, todos significativos.

Para a linhagem HCB-514, a média do controle foi de 400 (100%) células. Os tratamentos com ZR2002, JS-84, Gef+Clor e Cis apresentaram respectivamente 99; 98,1; 83,2 e 96,5% de redução em relação ao controle, todos também significativos.

Para a linhagem SiHa, a média de células capazes de invadir o matrigel foi 331 (100%) por campo. Os tratamentos com ZR2002, JS-84 e Cis apresentaram respectivamente 99,7; 74,1 e 75,4 % de redução em relação ao controle, todos significativos. Já o tratamento com Gef+Clor apresentou uma tendência a redução de 16,8% (Figuras 26 e 27).

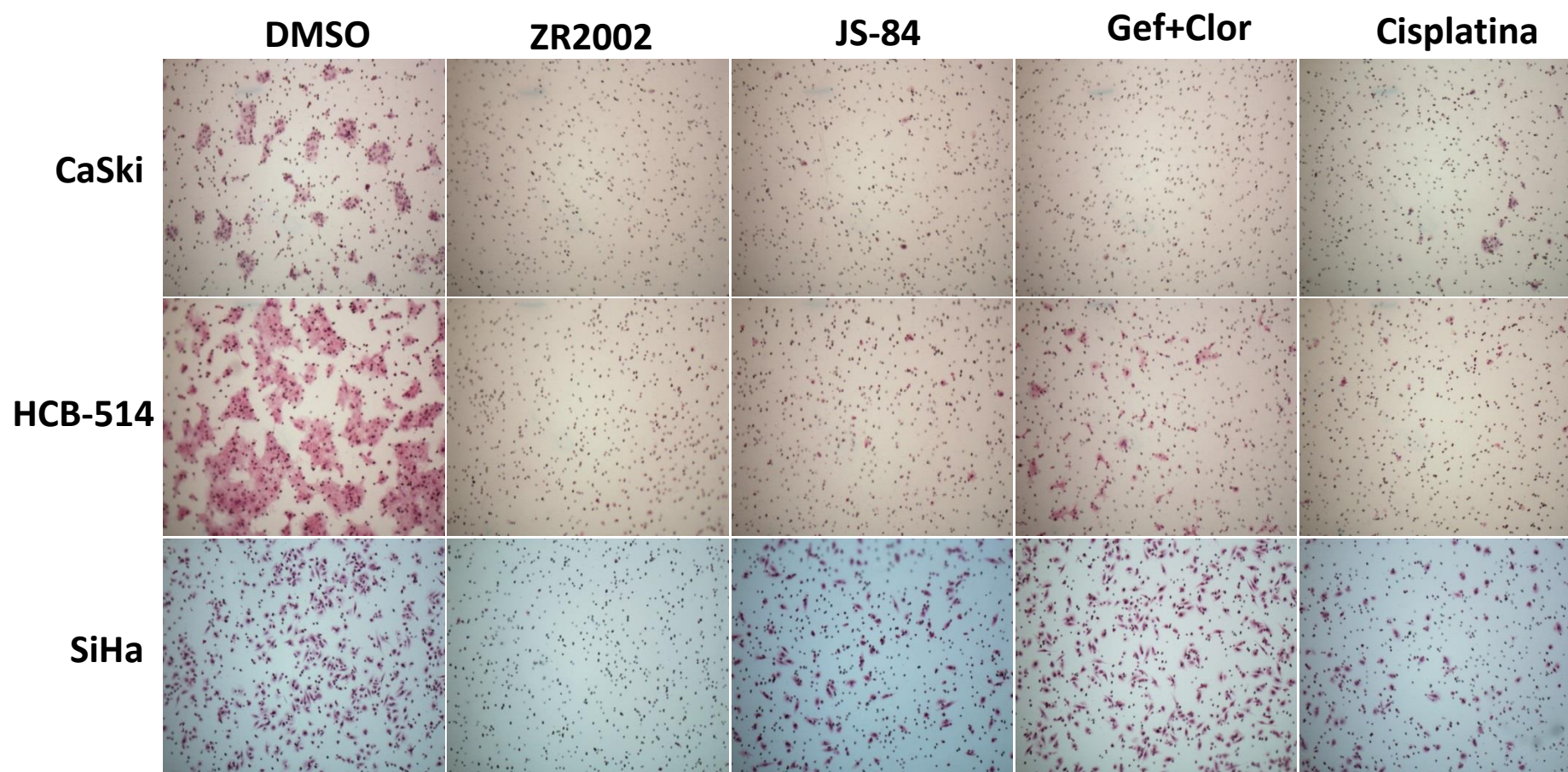


Figura 26 - Imagens representativas do ensaio de invasão por inserto. As células foram tratadas com 20 μ M de cada droga para permitir comparação dos efeitos das combi-moléculas. Após 24h as células foram fixadas e coradas com HE.

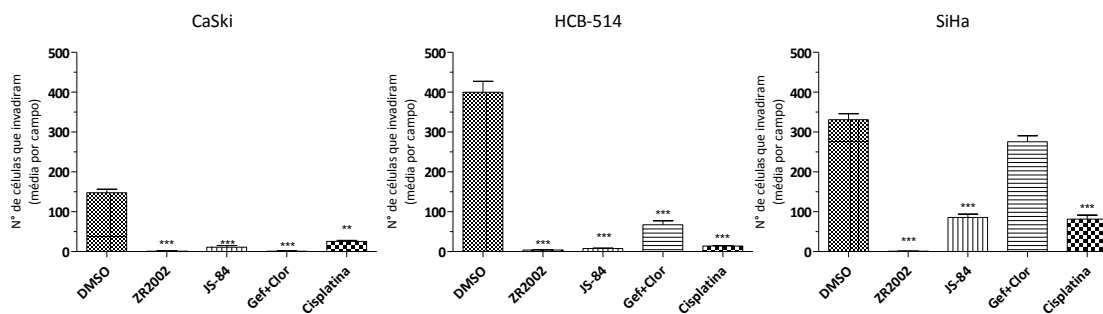


Figura 27 - Avaliação do efeito das moléculas na invasão celular a partir da quantificação das imagens. As linhagens CaSki e HCB-514 ($2,5 \times 10^5$ células) juntamente com as moléculas diluídas em meio sem SFB foram adicionadas no interior de um inserto, que foi inserido em um poço contendo meio quimioatrativo (com 10% SFB). Após 24h, as células foram fixadas, coradas com HE e montadas em lâmina para posterior fotodocumentação. A quantificação foi realizada através do programa ImageJ. O resultado representa a média \pm E.P.M; de dois experimentos realizados em duplicata.

5.3.4. Atividade das combi-moléculas na formação de colônia (potencial clonogênico)

Para este ensaio, foram testadas as doses 2 e 20 μ M. Após 14 dias, foi possível verificar uma redução significativa nas colônias formadas para todos os tratamentos, mesmo na menor dose testada e na linhagem mais resistente, SiHa. Para a linhagem SiHa, esta redução variou de 70,2 a 80,3% nos tratamentos envolvendo inibidores de EGFR (ZR2002, JS-84, Gef+Clor e Gef), e de 69 a 76% nos tratamentos com cisplatina. Para a linhagem CaSki, a redução variou de 81,7 a 88,3 nos tratamentos envolvendo inibidores de EGFR, e de 62,5 a 89,6% nos tratamentos com cisplatina (Figuras 28, 29 e 230).

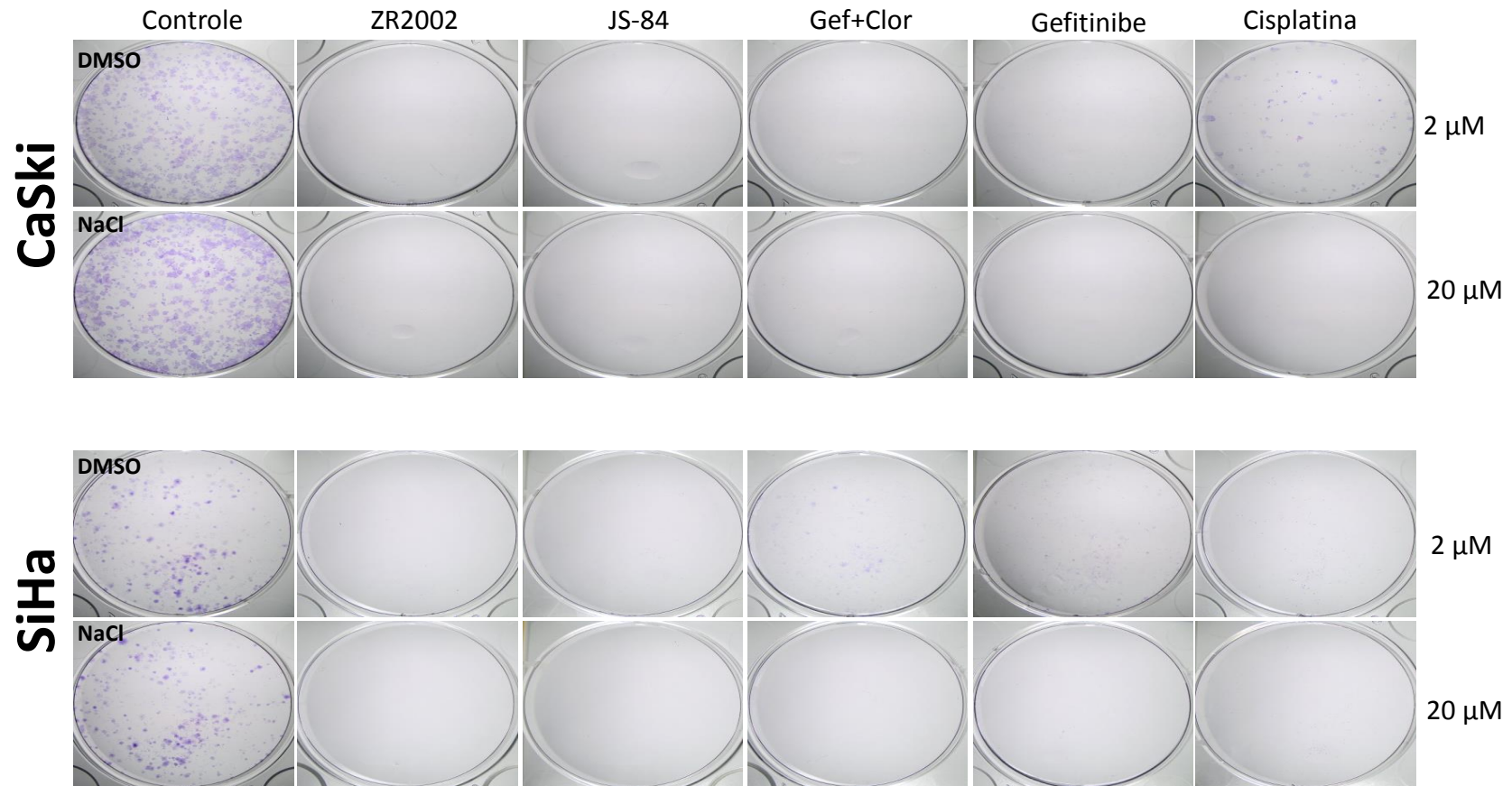


Figura 28 - Ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem 14 dias após tratamento. As células foram plaquedas e tratadas (2 e 20 μM) conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. Os tratamentos foram realizados em um único momento e, após 14 dias, as células foram fixadas e coradas com o corante cristal violeta para posterior quantificação.

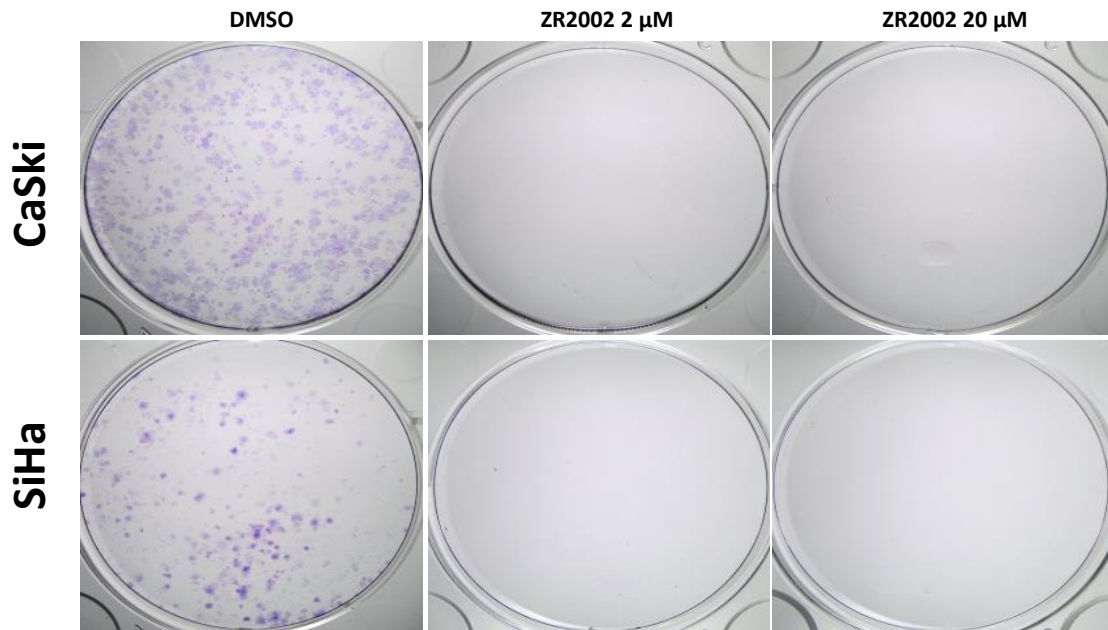


Figura 29 - Imagem aumentada do ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem 14 dias após tratamento.

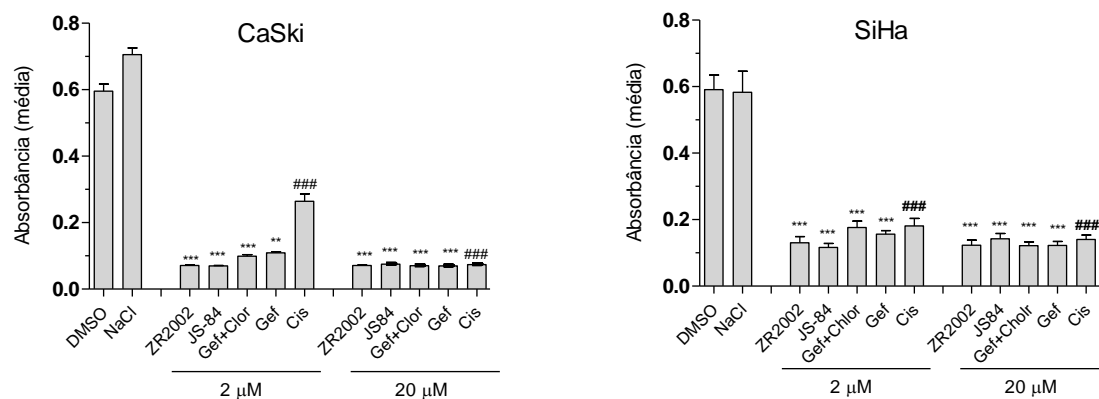


Figura 30 - Quantificação do ensaio de formação de colônia dependente de ancoragem 14 dias após o tratamento com as doses de 2 e 20 µM. As células foram fixadas, coradas com cristal violeta e a absorbância do corante diluído foi medida. *** p < 0,0001 (em comparação com DMSO) e #### p < 0,0001 (em comparação com NaCl).

5.3.5. Avaliação da viabilidade na cultura em 3D

Para este ensaio, somente a linhagem SiHa apresentou capacidade de formar esferoides concisos e estáveis para avaliação do efeito dos tratamentos com as moléculas híbridas. Após 10 dias de tratamento, foi possível observar uma redução no tamanho dos esferoides com JS-84, Gef+Clor e Cis (Figura 31). Nas maiores doses de ZR2002 houve desagregação dos esferoides e, mesmo não sendo possível verificar o tamanho deles, o efeito na redução da viabilidade celular foi confirmado através do

teste Cell Titter-Glo 3D (Figura 32). O valor de IC_{50} foi menor após tratamento com ZR2002 ($0,051 \mu M \pm 0,006$), seguido por JS-84 ($18,25 \mu M \pm 4,47$), Gef+Clor ($16,69 \mu M \pm 3,41$) e, por fim, Cis ($60,76 \mu M \pm 3,03$) (Figura 32A). Uma vez que na maioria dos ensaios foram utilizadas as doses de 2 e 20 μM , foi feita a comparação da viabilidade celular em doses próximas a estes valores. Na dose de 6,25 μM , ZR2002 já foi capaz de reduzir a viabilidade celular por completo. Nas doses de 25 μM , JS-84 reduziu 56%, Gef+Clor reduziu 69% e Cis reduziu 37% (Figura 32B).

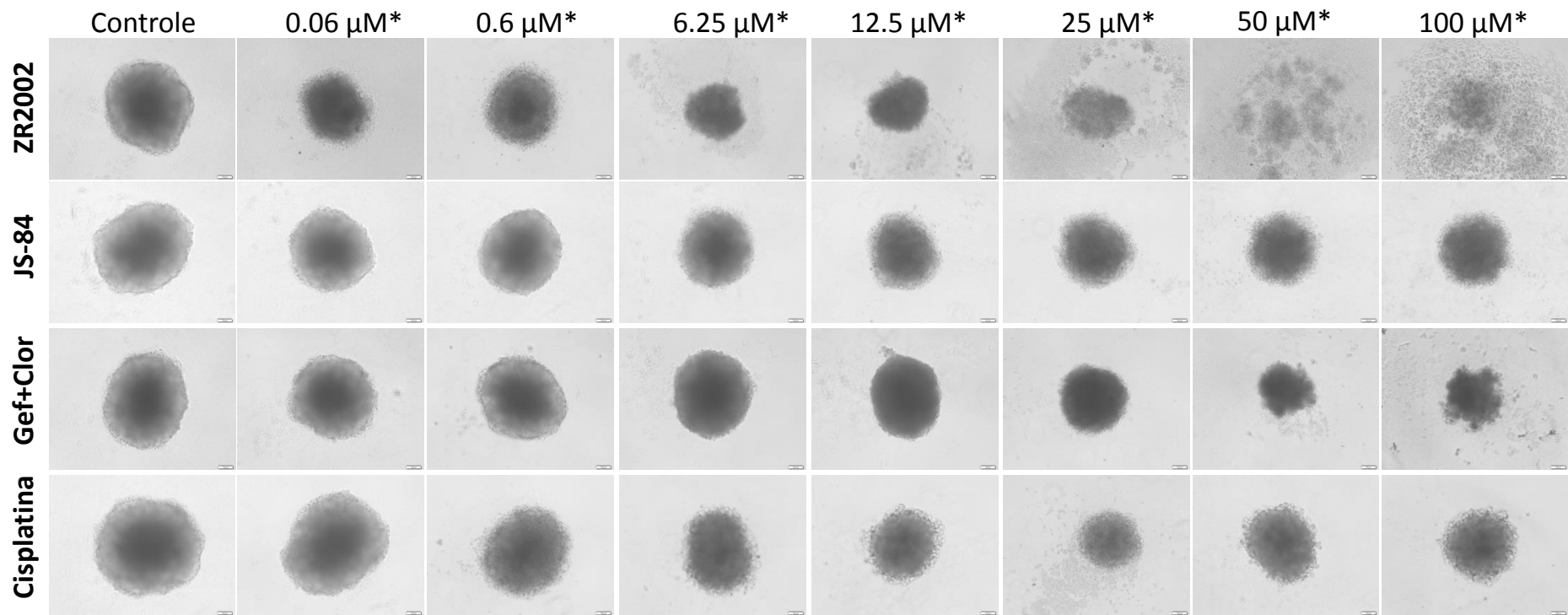


Figura 31 - Imagens representativas dos esferoides da linhagem SiHa 10 dias após os tratamentos (total de 14 dias em cultura). Os esferoides foram tratados uma única vez com as concentrações indicadas na imagem para ZR2002, JS-84 e Gef+Clor. As doses utilizadas para cisplatina foram de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Os controles foram tratados com os veículos (DMSO ou NaCl 0,9%). *Exceto para cisplatina.

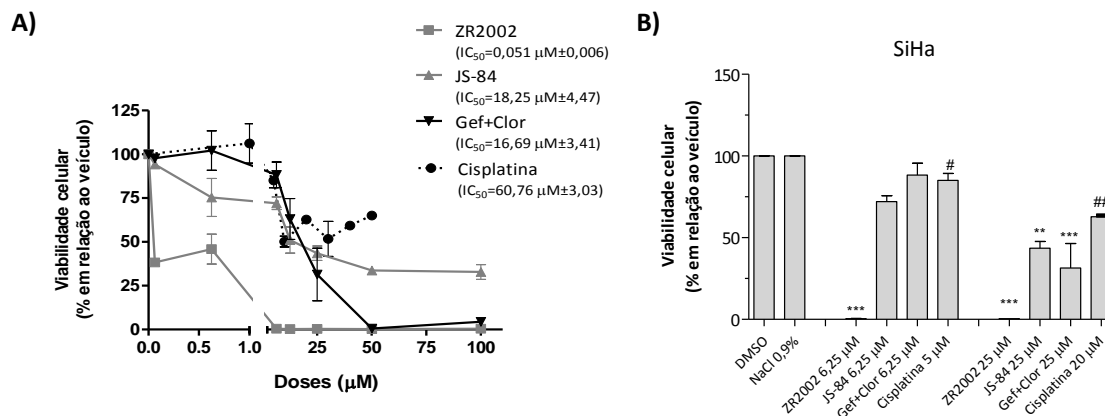


Figura 32 - Gráficos representativos da viabilidade celular dos esferoides da linhagem SiHa, 10 dias após tratamento com doses crescentes de ZR2002, JS-84, Gef+Clor e Cis. A) Curva dose-resposta da viabilidade no ensaio em 3D. B) Porcentagem da viabilidade em doses próximas a 2 e 20 μM . Os dados representam média \pm E.P.M. de ao menos dois experimentos independentes e foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$ (em comparação com NaCl).

5.3.6. Avaliação do efeito dos tratamentos no ciclo celular

5.3.6.1. Distribuição nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Na linhagem CaSki, após 24 h o tratamento com DMSO, a distribuição das células nas fases do ciclo foram: $0,74 \pm 0,29\%$ em sub-G0/G1, $73,9 \pm 10,95\%$ na fase G0/G1, $10 \pm 0,94\%$ na fase S e $15,3 \pm 10,54\%$ na fase G2/M, com valores semelhantes para para NaCl 0,9%. Após 24 h, o tratamento com ZR2002 2 μM levou a um aumento na porcentagem de sub-G0/G1 para $17,07 \pm 0,16\%$, com redução na porcentagem de células na fase G2/M para $6,15 \pm 1,60\%$, além de uma tendência na redução da porcentagem de células na fase S para $6,63 \pm 0,94\%$. Na maior dose, também houve um aumento na porcentagem de sub-G0/G1 para $3,30 \pm 0,52\%$. O tratamento com JS-84 2 μM também levou a um aumento de sub-G0/G1 para $6,06 \pm 0,96\%$, bem como redução na porcentagem de células na fase G2/M para $6,73 \pm 1,37\%$ e tendência de redução na fase S $5,70 \pm 2,37\%$. Os mesmos resultados foram observados com a maior dose, com $6,47 \pm 0,42\%$ em sub-G0/G1, $6,36 \pm 1,53\%$ em G2/M e $4,51 \pm 1,48\%$ na fase S. Após tratamento com Cis 2 μM e 20 μM , verificou-se uma redução na fase S para $15,71 \pm 4,01\%$ e $5,34 \pm 1,55\%$. Após tratamento com Clor 20 μM houve uma redução na

porcentagem de células na fase G0/G1 para $50,95 \pm 3,62\%$, aumento na fase S para $30,74 \pm 7,87\%$ (Figura 33).

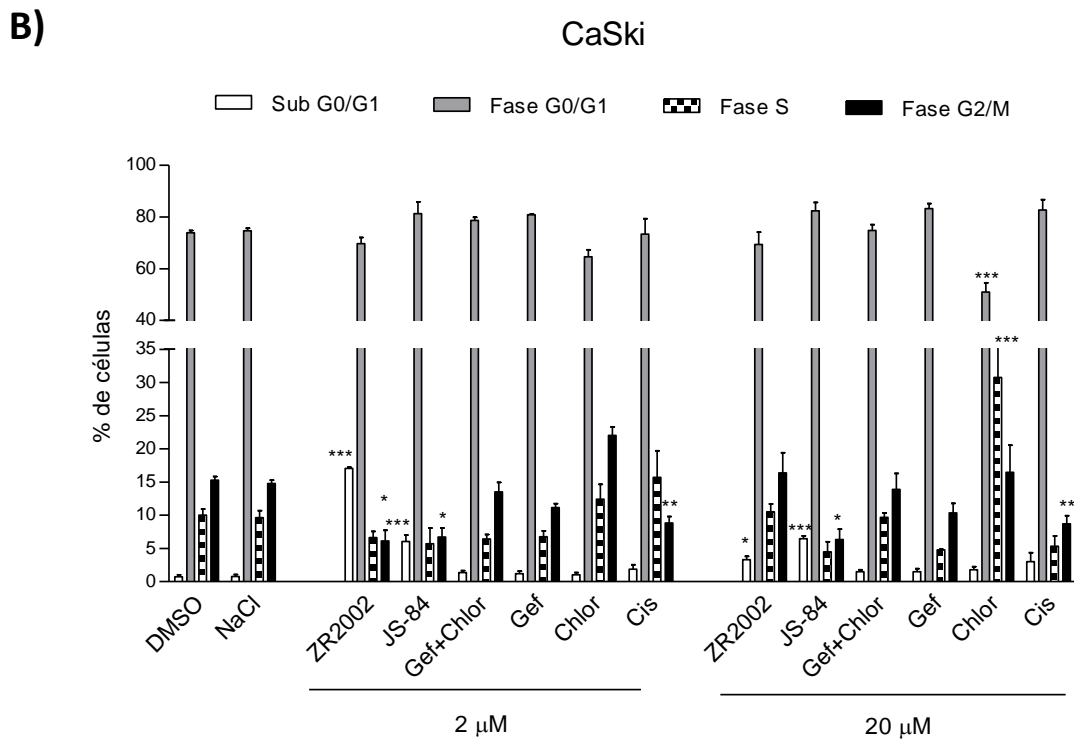
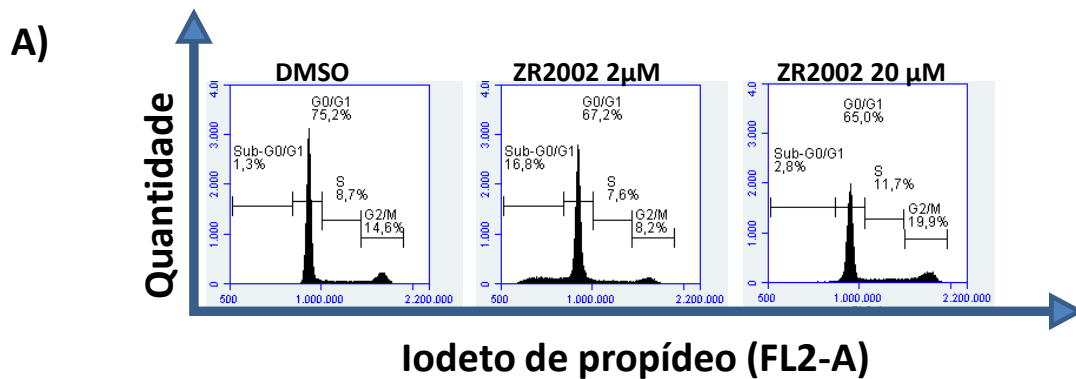


Figura 33 - Efeito das combi-moléculas ZR2002 (2 e 20 µM), JS-84 (2 e 20 µM) e demais tratamentos na distribuição do ciclo celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical CaSki. A) Exemplo dos histogramas gerados no citômetro de fluxo. B) Gráfico dos resultados obtidos para cada um dos tratamentos, conforme indicados na imagem. Os dados representam média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes e foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Na linhagem HCB-514, após 24 h de tratamento com DMSO, a distribuição das células nas fase sub-G0/G1, G0/G1, fase S e fase G2/M foram, respectivamente, $5,72 \pm 1,55\%$; $62,1 \pm 2,35\%$; $12,75 \pm 1,15\%$ e $18,78 \pm 1,09\%$, com valores semelhantes ao

tratamento com NaCl 0,9%. O tratamento com ZR2002 2 μ M induziu o aumento na porcentagem de células em sub-G0/G1, com redução nas fases G0/G1 ($35,41 \pm 0,30\%$) e G2/M ($6,06 \pm 0,1\%$) do ciclo. Na dose de 20 μ M, ZR2002 induziu redução em G0/G1 ($52,23 \pm 2,32\%$) e uma tendência de aumento na fase S ($19,24 \pm 2,63\%$). JS-84 2 μ M também induziu aumento na porcentagem de células em sub-G0/G1 ($19,41 \pm 1,98\%$) e uma redução em G2/M ($11,69 \pm 1,49\%$). JS-84 20 μ M induziu um aumento na porcentagem em sub-G0/G1 ($21,95 \pm 1,45\%$), com uma tendência de redução nas fases G0/G1 ($55,45 \pm 2,23\%$) e G2/M ($11,89 \pm 1,29\%$). O tratamento com Cis 2 μ M, induziu um aumento na porcentagem de células na fase S ($24,75 \pm 2,25\%$) com tendência de redução na fase G0/G1 ($51,24 \pm 2,15\%$), enquanto Cis 20 μ M, induziu aumento na porcentagem em sub-G0/G1 ($26,7 \pm 2,81\%$), redução na fase G0/G1 ($48,18 \pm 3,07\%$) e na fase G2/M ($10,23 \pm 1,36\%$). O tratamento com Gef+Clor 20 μ M induziu uma redução na fase G0/G1 ($45 \pm 1,28\%$) e um aumento na fase S ($22,63 \pm 2,11\%$) (Figura 34).

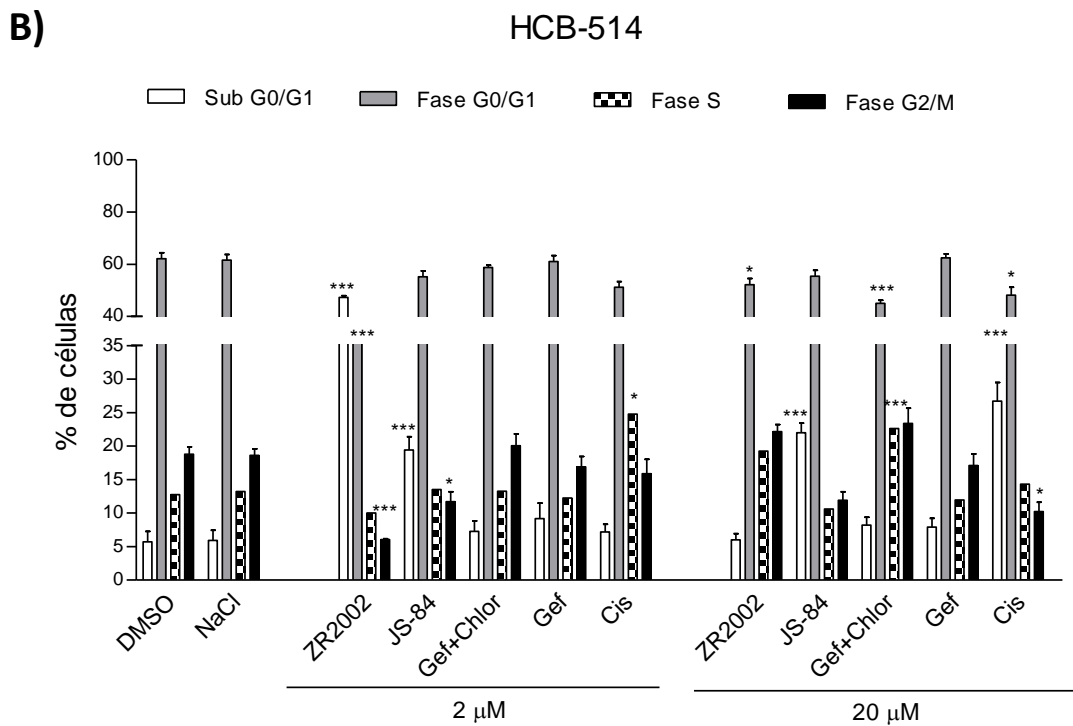
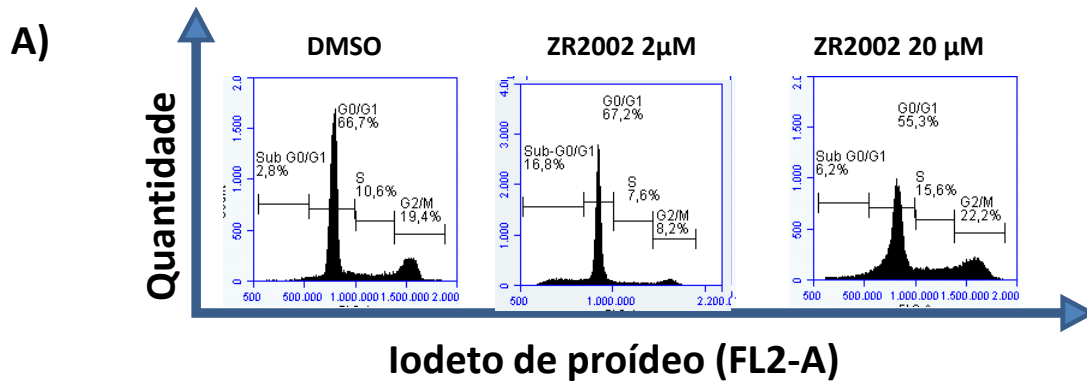


Figura 34 - Efeito das combi-moléculas ZR2002 (2 e 20 µM), JS-84 (2 e 20 µM) e demais tratamentos na distribuição do ciclo celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical HCB-514. A) Exemplo dos histogramas gerados no citômetro de fluxo. B) Gráfico dos resultados obtidos para cada um dos tratamentos, conforme indicados na imagem. Os dados representam média \pm E.P.M. de ao menos 2 experimentos independentes e foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni (exceto para Clor, conforme mencionado no texto). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Na linhagem SiHa, após 24 h de tratamento com DMSO, a distribuição das células nas fases sub-G0/G1, G0/G1, fase S e fase G2/M foram, respectivamente, $0,28 \pm 0,07\%$; $86,12 \pm 1,22\%$; $6,31 \pm 0,07\%$ e $7,48 \pm 1,43\%$, com valores semelhantes ao tratamento com NaCl 0,9%. Para esta linhagem, somente Clor 20 µM apresentou resultados estatisticamente significantes, com aumento na porcentagem de células na fase S

(22,69±3,81%) e na fase G2/M (22,92±3,05%), com tendência de redução na fase G0/G1 (55,07±6,24). Entretanto, é importante ressaltar que foi possível notar uma tendência no aumento de células em sub-G0/G1 nos tratamentos com ZR2002 2 μ M (10,91±8,19%) e 20 μ M (34,15±23,45%), e na redução na fase G0/G1 a 2 μ M (79,32±3,13%) e a 20 μ M (52,49±20,57%). O tratamento com JS-84, apresentou tendência em acúmulo na fase S do ciclo a 2 μ M (17,59±7,2) e a 20 μ M (16,80±4,25%). O tratamento com Cis também apresentou tendência em acúmulo de células na fase S a 2 μ M (22,43±6,73%) e a 20 μ M (19,67±5,42%) (Figura 35).

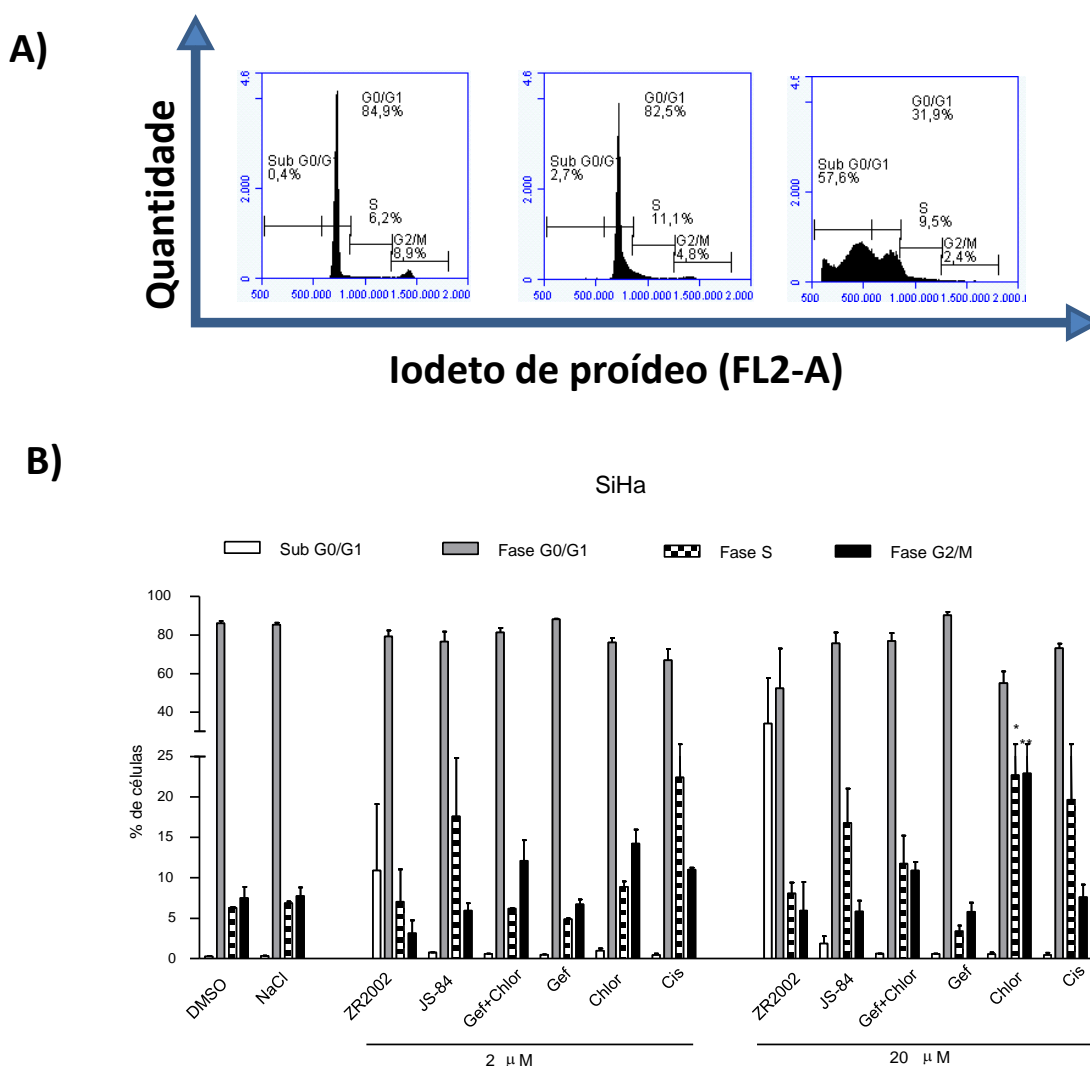


Figura 35 - Efeito das combi-moléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS-84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na distribuição do ciclo celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical SiHa. A) Exemplo dos histogramas gerados no citômetro de fluxo. B) Gráfico dos resultados obtidos para cada um dos tratamentos, conforme indicados na imagem. Os dados representam média \pm E.P.M. de ao menos 2 experimentos independentes e

foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3.6.2. Expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular

Além da citometria de fluxo, também foi avaliada a expressão da proteína p21, inibidora do complexo ciclina-quinase dependente de ciclina, após tratamentos com ZR2002, JS-84 ou Cis, pela técnica de *Western-blot*.

Para a linhagem CaSki, a proteína p21 foi avaliada somente para ZR2002, ao longo de uma cinética de 6, 12 e 24 h. Com o tratamento com a maior dose de ZR2002 (20 μM), é possível observar ausência completa de expressão de p21 já a partir de 6 h. Com a menor dose (2 μM), p21 encontra-se ausente após 24 h (Figura 36).

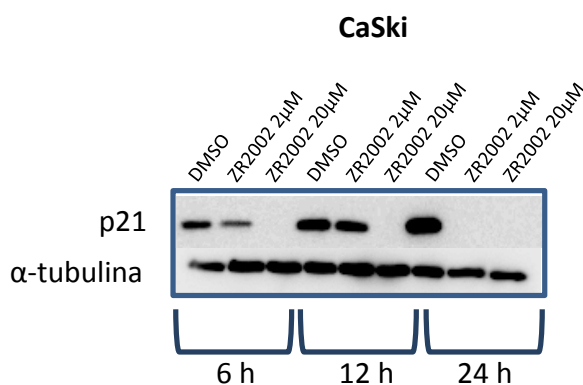


Figura 36 - Expressão da proteína p21 na linhagem CaSki após tratamento com ZR2002 ao longo de 6, 12 e 24 h.

Para a linhagem SiHa, as proteínas foram avaliadas 24 h após os tratamentos. Com ZR2002 20 μM também houve redução completa da expressão da proteína p21 após 24 h. Já com a dose de 2 μM , não houve alteração. Após tratamentos com JS-84 e Cis, em ambas as doses, houve redução da expressão de p21. Além disso, para esta linhagem, também foi possível avaliara a expressão de p27, em todos os tratamentos. Após tratamentos com 20 μM de Clor, Gef+Clor e ZR2002, bem como com 2 μM de JS-84 e Cis, houve redução parcial da expressão de p27. Já na mior dose (20 μM) de JS-84 e Cis, houve uma redução ainda mais evidente. Após tratamento com ambas as doses de Gef, houve um aumento na expressão desta proteína (Figura 37).

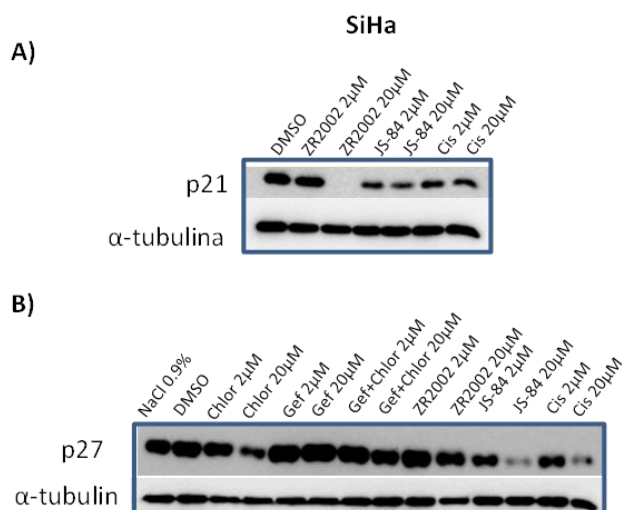


Figura 37- Expressão das proteínas p21 e p27 na linhagem SiHa após 24 h de tratamento com ZR2002, JS-84 e demais drogas. A) Expressão de p21; B) Expressão de p27.

5.3.7. Avaliação do efeito dos tratamentos nos processos de morte celular

5.3.7.1. Análise da externalização de fosfatidilserina e integridade da membrana plasmática por citometria de fluxo

Para avaliar se mecanismos de apoptose poderiam estar envolvidos na capacidade das combi-moléculas e demais tratamentos na redução da viabilidade celular, CaSki, HCB-514 e SiHa foram tratadas com as doses de 2 e 20 μM e analisadas por citometria de fluxo (através da marcação de anexina V-PE/7-AAD) após 24h.

O tratamento com DMSO (controle) na linhagem CaSki, apresentou as seguintes porcentagens de células em cada um dos quadrantes: 83,2 \pm 0,9; 2,22 \pm 0,5; 5,9 \pm 1,9; 4,6 \pm 2,3%). As maiores doses de ZR2002 e Gef reduziram significativamente a porcentagem de células viáveis para 56,9 \pm 1,4 e 60,9 \pm 5,0%, respectivamente, com um aumento na porcentagem de células não viáveis (marcação somente de 7-AAD) para 23,8 \pm 1,1% e 24,4 \pm 8,8%, respectivamente. Ainda, embora não significativo, é possível observar uma maior porcentagem de células em apoptose tardia/necrose nestes mesmos tratamentos (24,0 \pm 7,9 e 12,2 \pm 2,5%, respectivamente). JS-84 20 μM reduziu significativamente a porcentagem de células viáveis para 60,8 \pm 1,3%, com um aumento

não significativo na porcentagem de células nos demais estágios ($11,8 \pm 2,6\%$ em apoptose inicial; $17,4 \pm 0,8\%$ em apoptose tardia/necrose e $9,0 \pm 1,8\%$ não viáveis).

Na menor dose, somente o tratamento com ZR2002 reduziu a viabilidade celular para $58,3 \pm 10,2\%$ e aumentou porcentagem de células em apoptose inicial para $14,9 \pm 3,5\%$. O tratamento com Cis promoveu um aumento significativo na porcentagem de células em apoptose inicial para $7,4 \pm 1,3\%$, quando comparado ao tratamento com seu veículo de diluição, NaCl ($3,1 \pm 0,5\%$) (Figura 38).

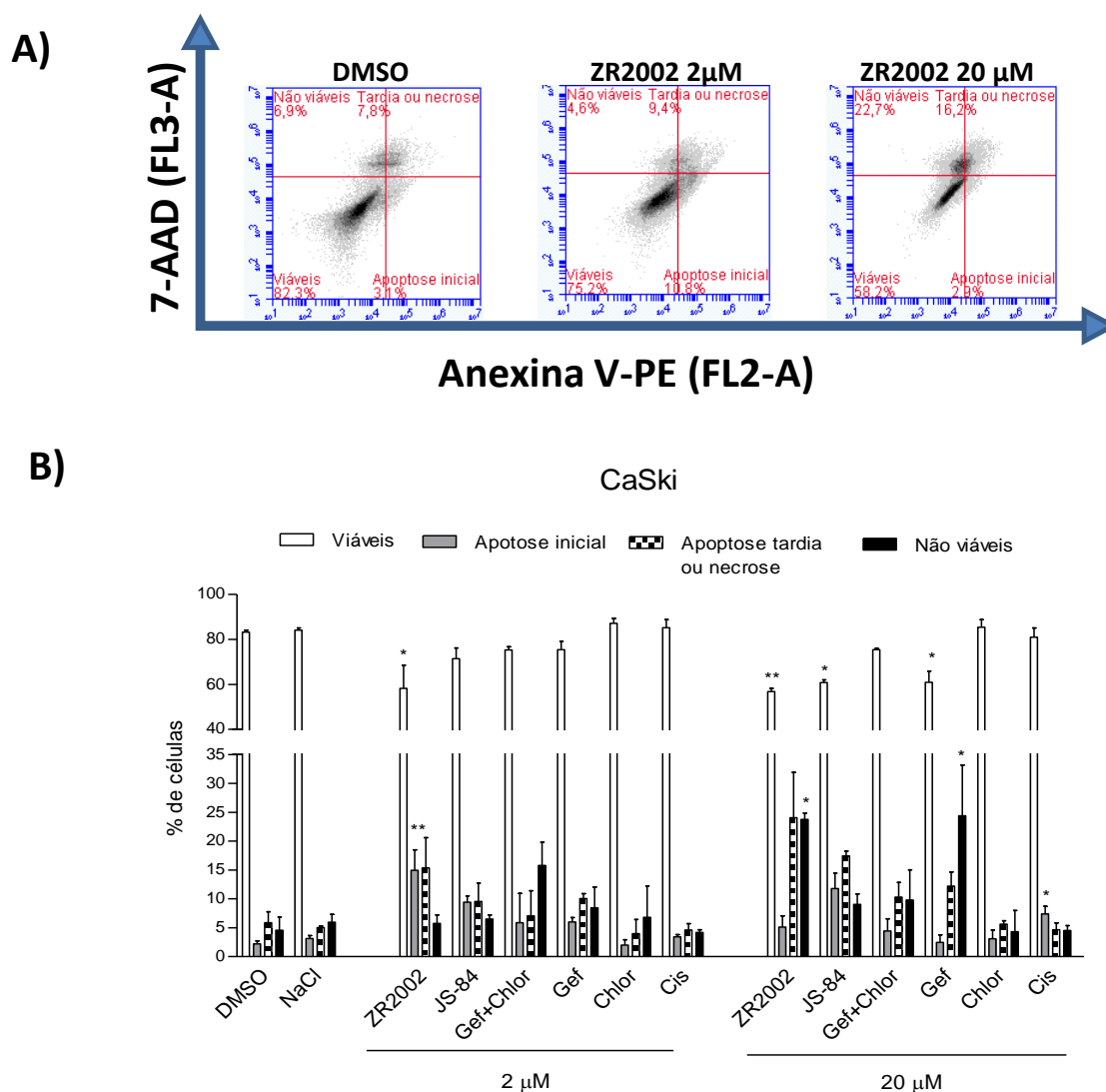


Figura 38- Efeito das combi-moléculas ZR2002 (2 e 20 µM), JS-84 (2 e 20 µM) e demais tratamentos na morte celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical CaSki. A) Exemplo dos gráficos de densidade gerados no citômetro de fluxo. B) Gráfico dos resultados obtidos para cada um dos tratamentos, conforme indicados na imagem. Os dados representam média \pm E.P.M. de ao menos 2 experimentos independentes e foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Na linhagem HCB-514, após tratamento com ZR2002 2 μ M houve redução na população de células viáveis para $16,6\pm 1,4\%$ e aumentos na apoptose inicial para $7,8\pm 2,3\%$, na apoptose tardia/necrose $44,9\pm 0,4\%$ e na população não viável para $28,6\pm 0,06\%$. Embora não significativo, após tratamento com JS-84 2 μ M, houve tendência para: redução da viabilidade para $70,5\pm 5,4\%$, aumento na porcentagem de apoptose tardia/necrose para $25,2\pm 6,9\%$ e na porcentagem de população não viável para $17,0\pm 3,0\%$. Na dose mais alta de ZR2002 (20 μ M), houve redução da viabilidade celular para $61,7\pm 8,2\%$, aumento na população não viável para $18,7\pm 4,3\%$ e, embora não significativo, ocorreu uma tendência ao aumento na porcentagem em apoptose tardia/necrose para $18,0\pm 3,9\%$. Após tratamento com JS-84 20 μ M, houve redução na porcentagem de células viáveis para $43,0\pm 4,2\%$ e aumentos na porcentagem de apoptose inicial para $7,7\pm 0,4\%$ e na população não viável para $19,2\pm 4,4\%$, ainda, embora não significativo, houve aumento na porcentagem de apoptose tardia/necrose para $23,0\pm 4,0\%$. Na maior dose, Cis promoveu redução na população de células viáveis para $35,3\pm 2,5\%$, e um aumento nas populações em apoptose tardia/necrose e na não viável, respectivamente para $30,3\pm 4,2\%$ e $26,2\pm 4,0\%$ (Figura 39).

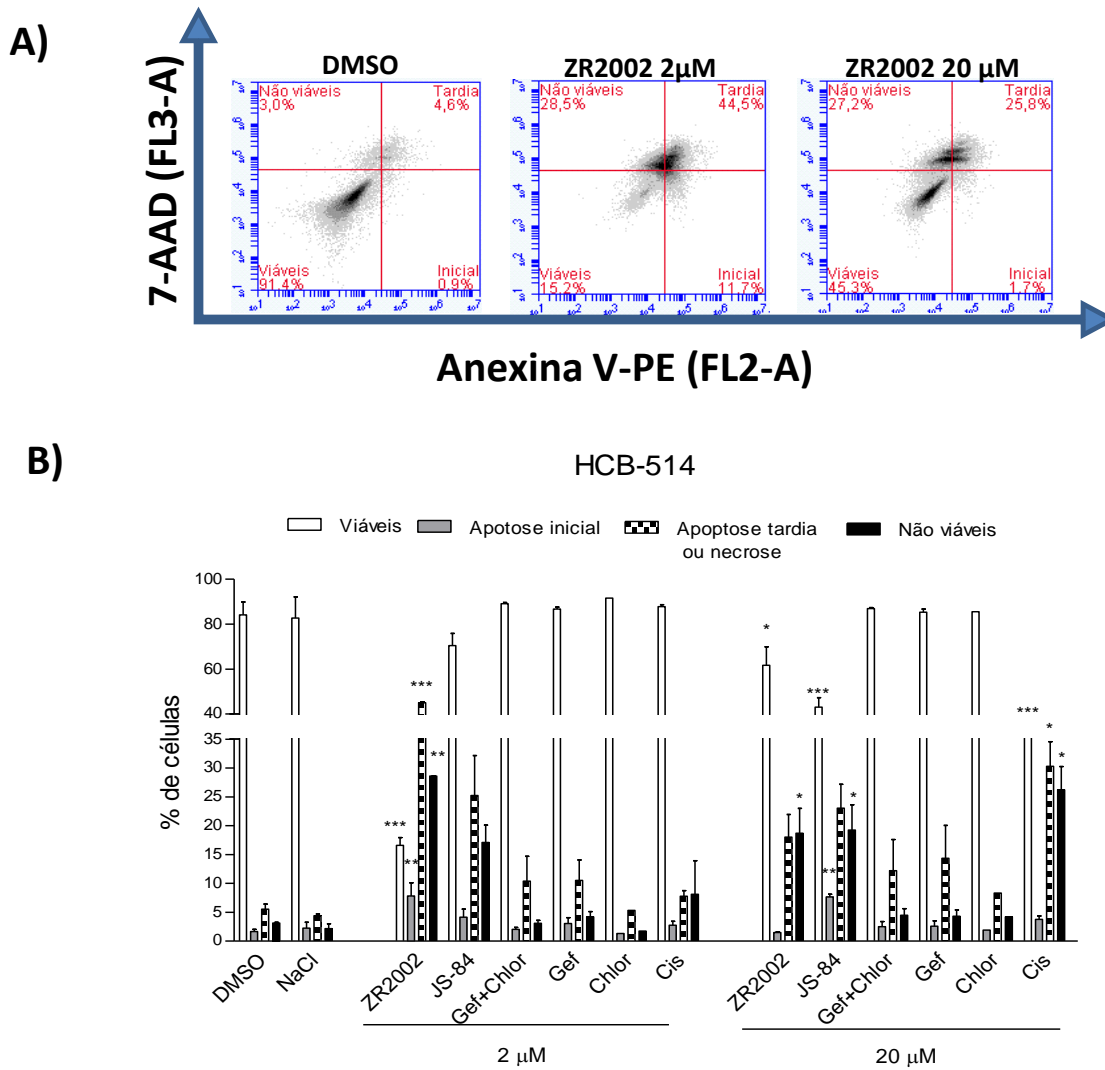


Figura 39- Efeito das combi-moléculas ZR2002 (2 e 20 µM), JS-84 (2 e 20 µM) e demais tratamentos na morte celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical HCB-514. A) Exemplo dos gráficos de densidade gerados no citômetro de fluxo. B) Gráfico dos resultados obtidos para cada um dos tratamentos, conforme indicados na imagem. Os dados representam média \pm E.P.M. de ao menos 2 experimentos independentes e foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Para a linhagem SiHa, a redução da viabilidade para $81,9 \pm 6,9\%$ ZR2002 e aumento não significativo para $9,7 \pm 4,4\%$ tardia. Para as maiores doses redução para ZR2002 $67,6 \pm 2,9\%$ e aumento para $11,1 \pm 4,5\%$ tardia e $20 \pm 7,3\%$ não viáveis. Para JS-84 20µM redução da porcentagem de células viáveis para $86,2 \pm 0,1\%$. Embora não significativo, houve um aumento nas porcentagens de células para $4,4 \pm 1,9\%$ inicial, $5,6 \pm 1,1\%$ na apoptose tardia (Figura 40).

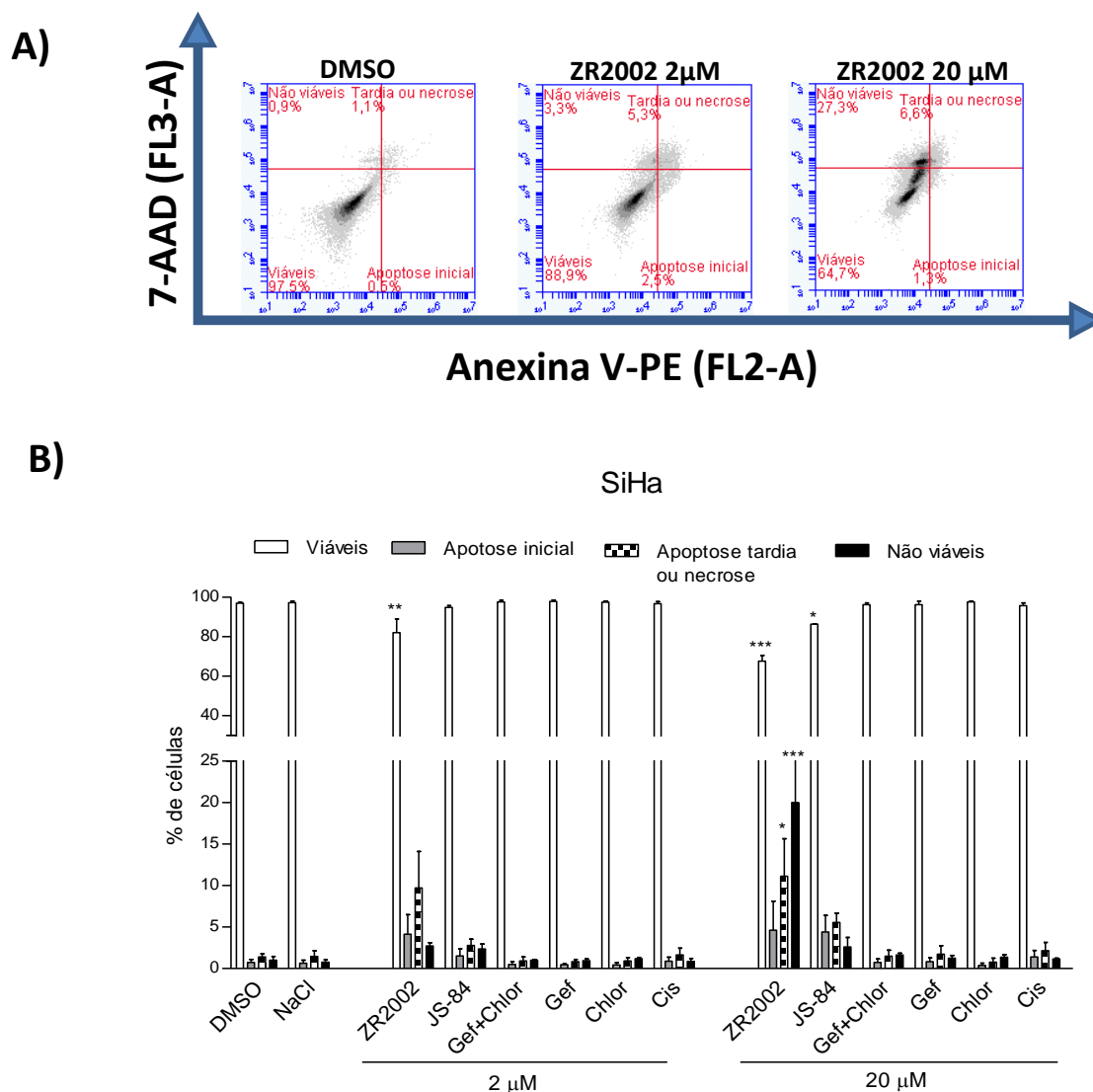


Figura 40- Efeito das combi-moléculas ZR2002 (2 e 20 μ M), JS-84 (2 e 20 μ M) e demais tratamentos na morte celular após 24 h, na linhagem tumoral cervical SiHa. A) Exemplo dos gráficos de densidade gerados no citômetro de fluxo. B) Gráfico dos resultados obtidos para cada um dos tratamentos, conforme indicados na imagem. Os dados representam média \pm E.P.M. de ao menos 2 experimentos independentes e foram submetidos ao teste ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

5.3.7.2. Expressão de proteínas envolvidas na morte celular

Para elucidar o mecanismo de morte celular promovido pelos tratamentos, avaliou-se a clivagem de PARP, também em 24 h de tratamento. Para a linhagem mais sensível, CaSki, houve um aumento da clivagem em todos os tratamentos, exceto Clor. Esta clivagem foi mais acentuada nos seguintes tratamentos: ZR2002 (2 μ M), JS-84 (2 e 20 μ M) e Cis (20 μ M). Para a linhagem de moderada resposta, HCB-514, a clivagem

ocorreu nos seguintes tratamentos: ZR2002 (2 μ M), JS-84 (2 e 20 μ M). Já para a mais resistente, SiHa, somente ZR2002 (2 e 20 μ M) induziu clivagem de PARP (Figura 41).

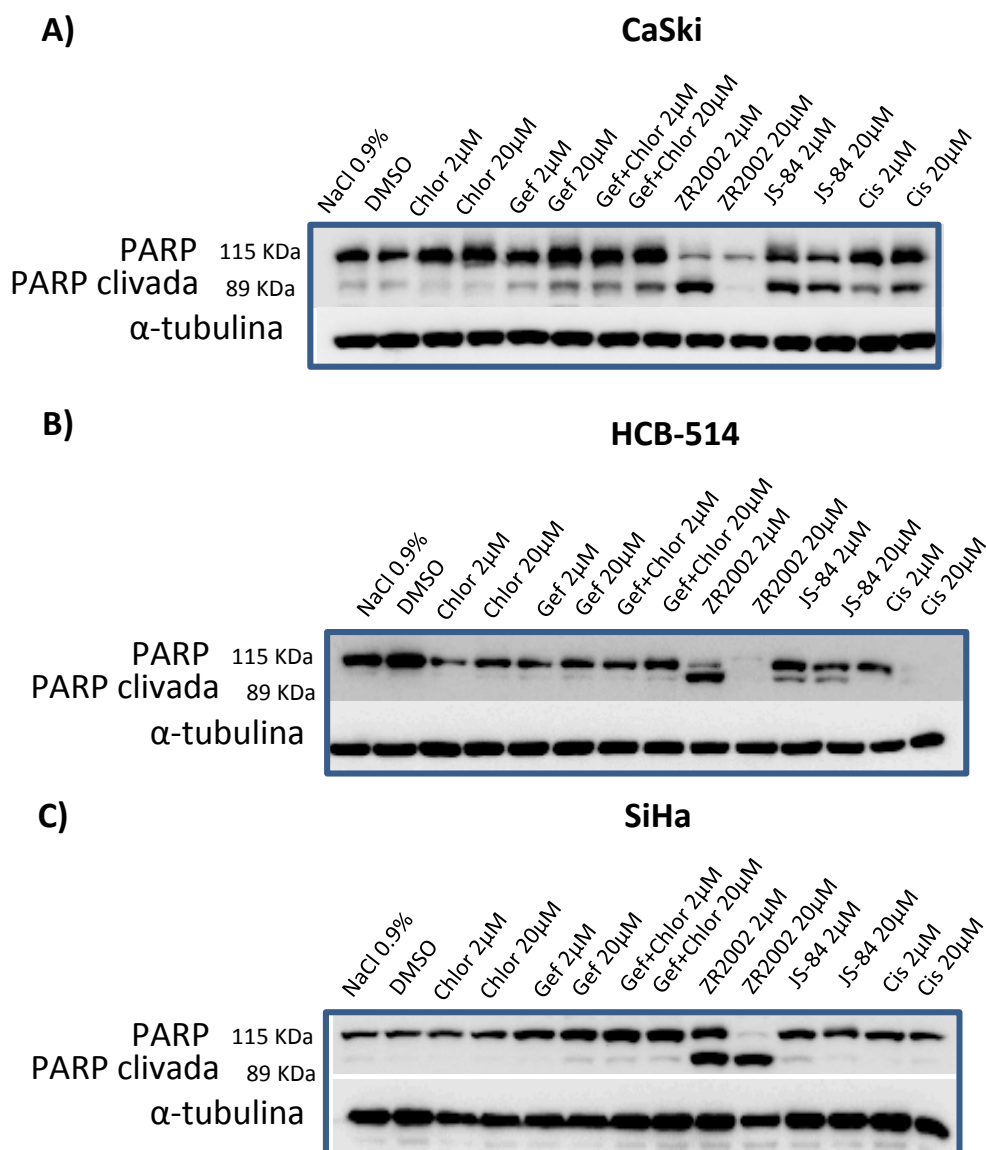


Figura 41- Expressão da proteína PARP em sua forma total (115 KDa) e clivada (89 KDa) nas linhagens CaSki (A), HCB-514 (B) e SiHa (C) após 24 h de tratamento com ZR2002, JS-84 e demais drogas indicadas na figura. As proteínas obtidas foram submetidas a *Western blotting*. Os resultados foram obtidos através de ao menos dois experimentos independentes.

Além de PARP, também foi avaliada a expressão da proteína caspase-3 nas três linhagens, e da caspase-9 na linhagem SiHa. Ambas estão envolvidas no processo de apoptose pela via intrínseca. Os resultados na linhagem CaSki estão descritos à parte, na próxima seção (5.3.7.3.).

Na linhagem HCB-514, houve expressão de caspase-3 clivada após os tratamentos com JS-84 (2 e 20 μ M), Cis (2 e 20 μ M) e ZR2002 (2 μ M), sendo esta expressão mais pronunciada com os tratamentos Cis (20 μ M) e ZR2002 (2 μ M) (Figura 42).

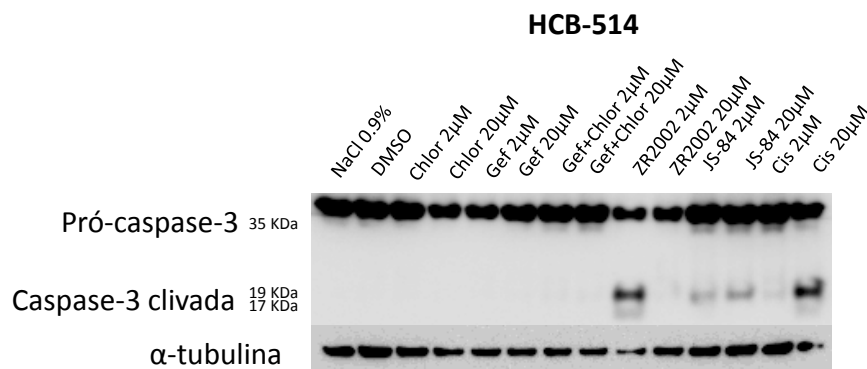


Figura 42 - Expressão da proteína caspase 3 (pró-caspase e clivada) na linhagens HCB-514 após 24 h de tratamento com ZR2002, JS-84 e demais drogas indicadas na figura. As proteínas obtidas foram submetidas a *Western blotting*. Os resultados foram obtidos através de ao menos dois experimentos independentes.

Na linhagem SiHa, a expressão de caspase-3 clivada foi avaliada após tratamentos com ZR2002, JS-84 e Cis, nas doses de 2 e 20 μ M. Após tratamento com ZR2002, houve acentuada expressão da proteína. Também foi possível verificar esta expressão, mais sutil, após tratamento com JS-84. Nesta mesma linhagem, também foi avaliada a expressão de caspase-9 para todos os tratamentos. Após 24h, houve uma acentuada expressão de caspase-9 clivada com ZR2002 (2 e 20 μ M). Com os demais tratamentos, essa expressão foi mais sutil (Figura 43).

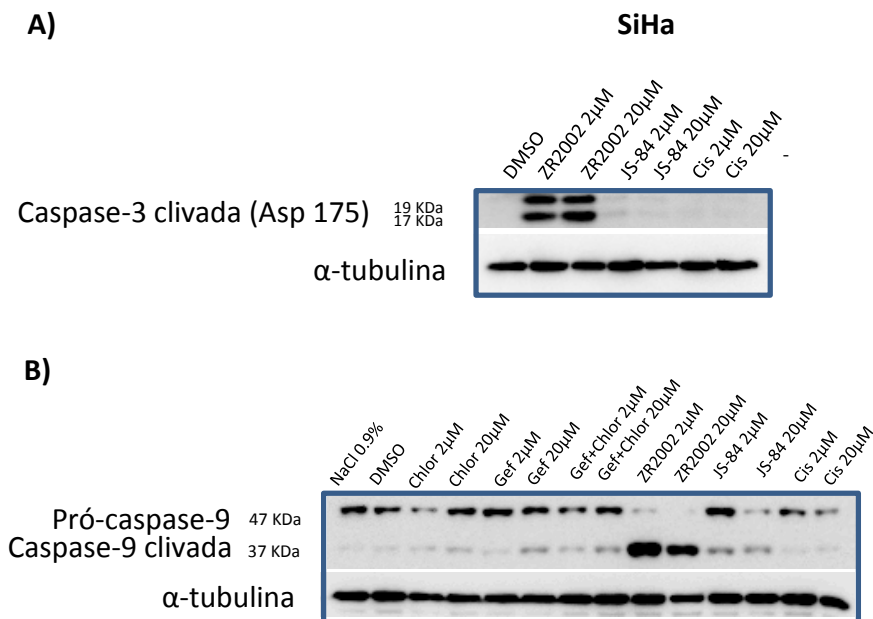


Figura 43- Expressão das proteínas caspase-3 clivada e caspase-9 (pró-caspase e clivada) na linhagem SiHa após 24 h de tratamento com ZR2002, JS-84 e demais drogas indicadas na figura. A) Expressão de caspase-3 clivada; B) Expressão de pró-caspase 9 e caspase-9 clivada.

5.3.7.3. Efeito de ZR2002 na linhagem CaSki após 6, 12 h de tratamento

A partir da ausência de expressão de PARP clivada após tratamento com a maior dose de ZR2002 (20 μ M) tanto na linhagem sensível (CaSki), quanto na de moderada resposta (HCB-514), foi levantada a hipótese de que esta clivagem já teria ocorrido anteriormente ao período de 24 h. Uma vez que esta dose equivale a um valor bastante acima das IC_{50} para estas linhagens, seu efeito poderia ter ocorrido antes das 24 h. Para testar esta hipótese, a linhagem CaSki foi tratada com ZR2002 (2 e 20 μ M) por tempos mais curtos, 6 e 12 h e a análise foi feita através da citometria de fluxo e de *Western blotting*.

Com relação à fosforilação de H2AX, foi observado que após 6h do tratamento com 2 μ M, parece ocorrer o início desta fosforilação, uma vez que a expressão da proteína vai se tornando gradualmente mais acentuada com 12 e 24h. Já na dose de 20 μ M, a expressão já se encontra acentuada após 6 h, aumentando após 12 h e permanecendo aumentada após 24h de tratamento.

A expressão de caspase-3 clivada e PARP clivada apresentou uma cinética um pouco distinta da p-H2AX, atingindo uma expressão mais acentuada 12 h após

tratamento com 2 μM , mas voltando a reduzir em 24 h. Com 20 μM , a expressão é mais acentuada após 6 h, reduzida em 12 h, e ausente em 24 h.

A expressão de PARP clivada seguiu um padrão semelhante ao da caspase-3 clivada, com uma única diferença: 24 h após tratamento com 2 μM , a expressão se manteve como acentuada com em 12

Após 12 h de tratamento o grupo DMSO (controle) apresentou 95,3 \pm 0,8% de células viáveis, 0,6 \pm 0,1% de células em apoptose inicial, 2,6 \pm 1,0% de células em apoptose tardia/necrose e 1,5 \pm 0,1% de células não viáveis. Após tratamento com a maior dose de ZR2002 (20 μM) houve redução significativa na porcentagem de células viáveis para 82,9 \pm 1,0% e aumento na porcentagem de células em apoptose tardia e não viáveis para 11,1 \pm 1,8% e 8,5 \pm 1,7%, respectivamente. Os resultados em 24 h já foram descritos anteriormente. Em 6 h, não houve alterações pelo ensaio realizado por citometria (Figura 44).

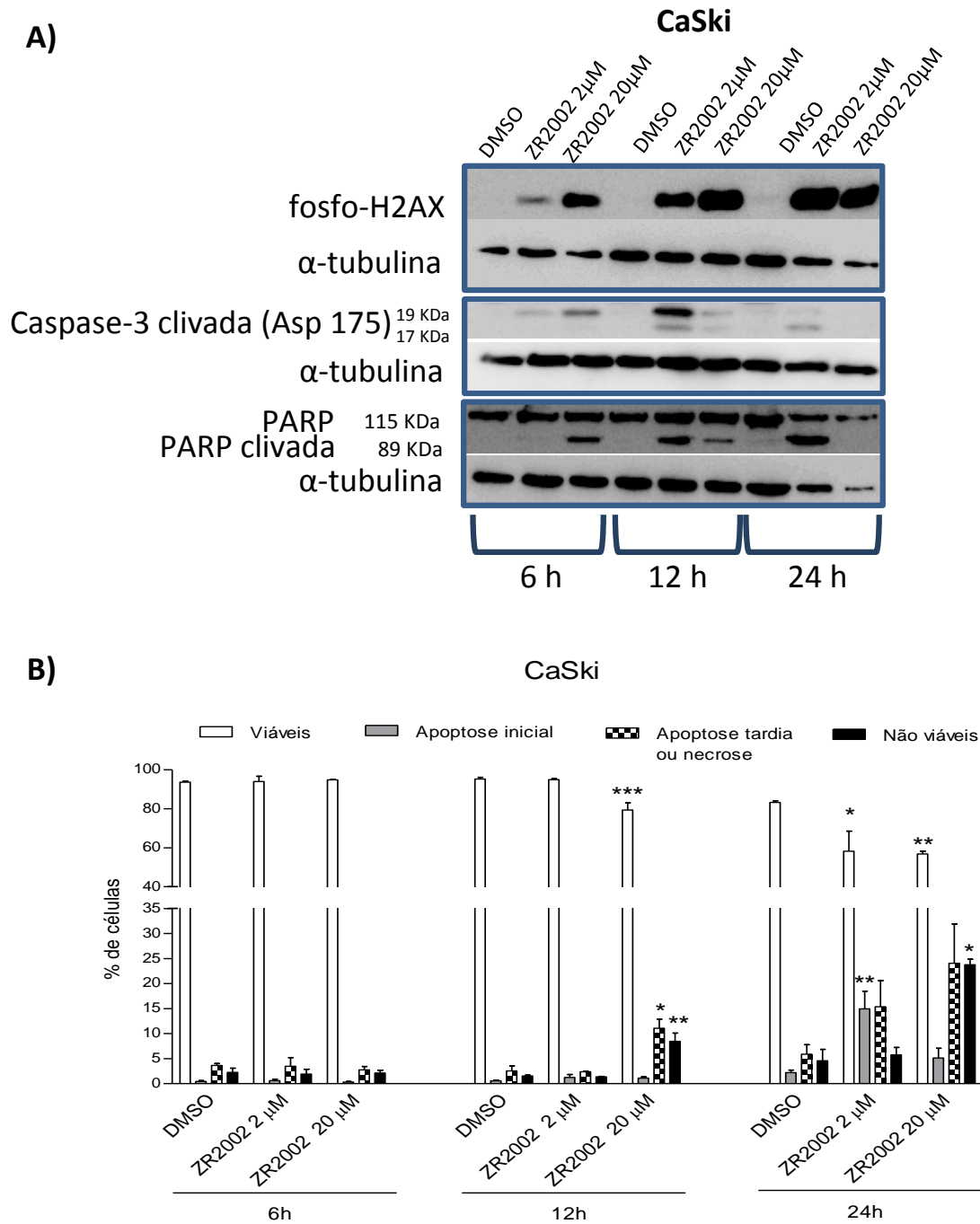


Figura 44- Efeito de ZR2002 (2 e 20 μ M) na linhagem CaSki após 6, 12 e 24 h de tratamento. **A)** Expressão das proteínas H2AX fosforilada, caspase-3 clivada e PARP (total e clivada) na linhagem CaSki após tratamento com ZR2002 ao longo de 6, 12 e 24 h. **B)** Avaliação da morte celular por citometria de fluxo na linhagem CaSki após tratamento com ZR2002 ao longo de 6, 12 e 24 h. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

5.3.8. Avaliação das proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização

Uma vez que as combi-moléculas agem no EGFR e que as linhagens apresentam diferentes características moleculares, o perfil de expressão desta proteína foi avaliado.

Em condições basais, SiHa e HeLa não apresentam expressão de EGFR em sua forma ativa (p-EGFR), enquanto C4-I, HCB-514 e CaSki, a apresentam. A estimulação com o ligante EGF faz com que esta expressão aumente, sendo possível observar p-EGFR mesmo em SiHa e HeLa (Figura 45).

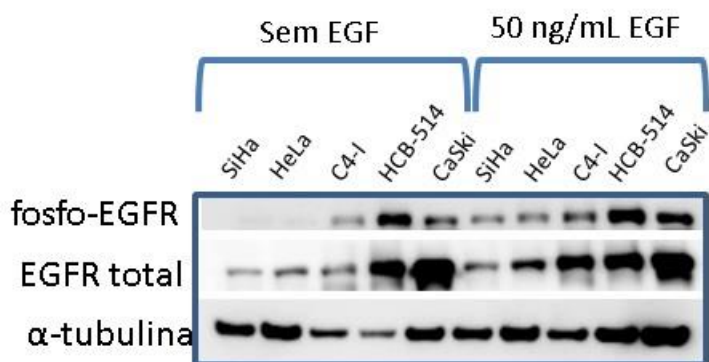


Figura 45- Expressão do receptor de EGF nas linhagens cervicais em condições basais e após estimulação com o ligante por 15 minutos.

Para confirmar se as moléculas de fato são capazes de inibir o receptor EGFR, as linhagens CaSki, HCB-514 e SiHa foram tratadas por 2h. Após este período, houve uma redução quase total dos níveis de EGFR fosforilado em todas as linhagens, incluindo a mais resistente (SiHa), para todas as concentrações e tratamentos, exceto para o Clorambucil, uma vez que ele não é um inibidor deste receptor. Além disso, também houve redução total dos níveis de ERK fosforilada para CaSki e HCB-514, sendo que somente para os tratamentos com 2 μ M de Gef e Gef+Clor é que esta redução, embora acentuada, não foi total. Para HCB-514, a inibição com 2 μ M de JS-84 também não foi total. Para SiHa, também houve redução com todos os inibidores, sendo que a 20 μ M de ZR2002 e JS-84, esta redução foi ainda mais acentuada (Figura 46).

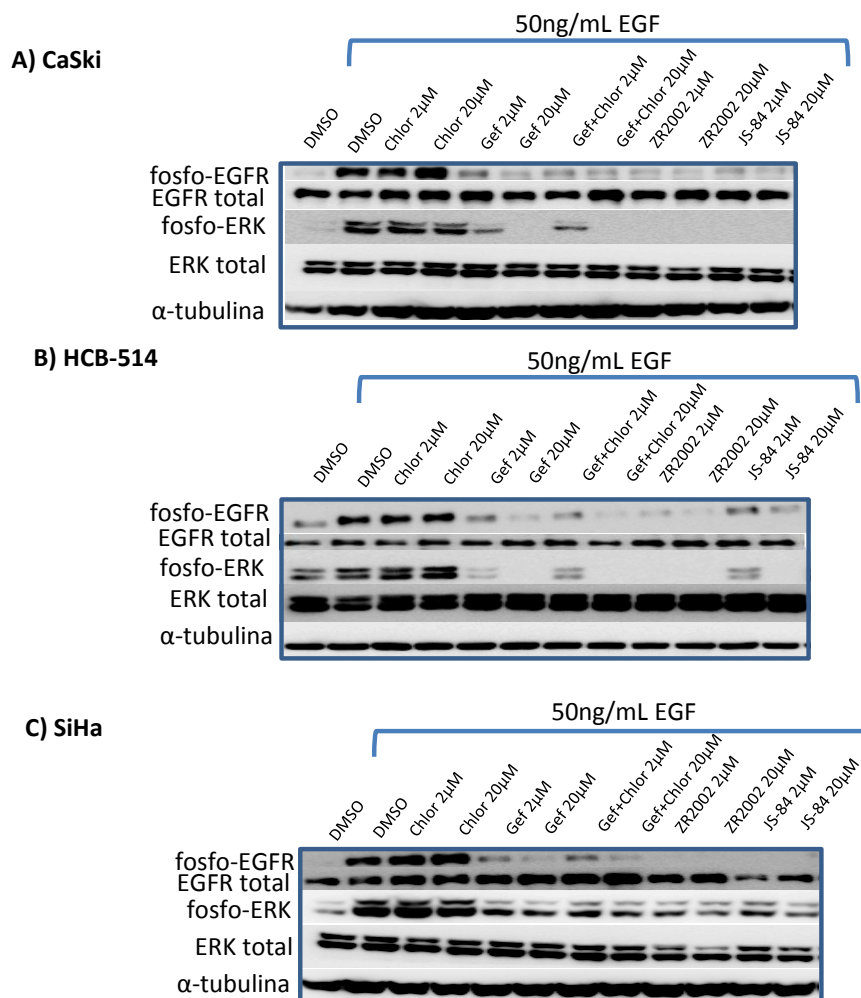


Figura 46- Efeito das combi-moléculas e demais tratamentos na fosforilação de EGFR e de ERK, proteína envolvida na cascata de sinalização após ativação de EGFR. As células foram tratadas por 2 h e estimuladas com EGF por 15 minutos. As proteínas obtidas foram submetidas a *Western blotting*. Os resultados foram obtidos através de ao menos dois experimentos independentes.

Também foi avaliado se as moléculas seriam capazes de promover dano ao DNA. Após 24h de tratamento detectou-se aumento acentuado da H2AX fosforilada nas combi-moléculas, principalmente para ZR2002, e sua ausência nos tratamentos contendo Gef, demonstrando que este dano ao DNA não foi em decorrência somente da inibição de EGFR. Também houve aumento de p-H2AX para Cis, principalmente a 20μM nas linhagens de resposta moderada e resistente (HCB-514 e SiHa) (Figura 47).

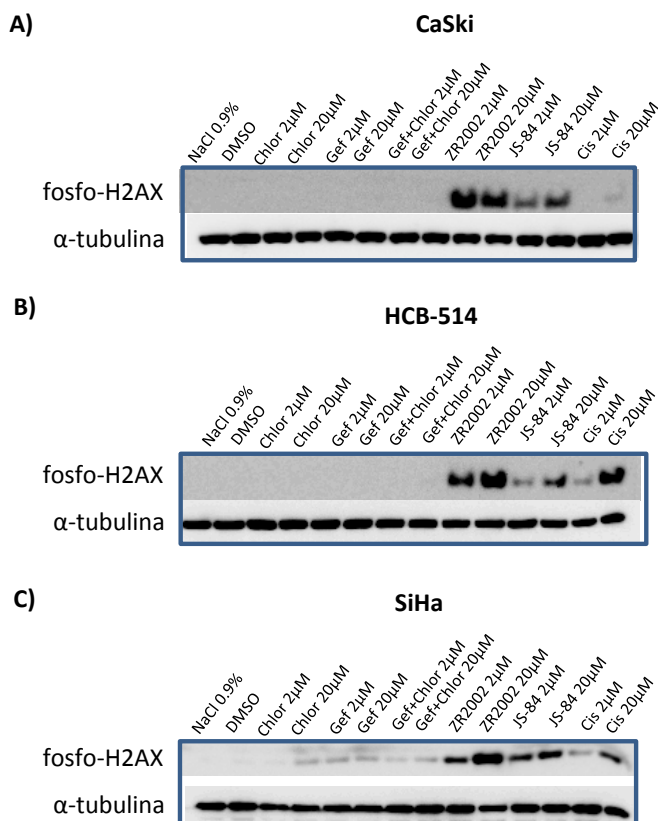


Figura 47- Efeito das combi-moléculas ZR2002 (2 e 20 μM) e JS-84 (2 e 20 μM) e demais tratamentos na fosforilação de H2AX, indicadora de dano ao DNA. Os demais tratamentos estão indicados na figura. As células foram tratadas por 24 h e as proteínas obtidas foram submetidas a Western blotting. Os resultados foram obtidos através de ao menos dois experimentos independentes.

5.3.9. Avaliação do status de *EGFR* na linhagem C4-I

Dentre as linhagens utilizadas neste trabalho, a única da qual não havia informação sobre o status de *EGFR* era a linhagem C4-I. Como ela respondeu de forma moderada aos inibidores de *EGFR*, foram utilizadas duas abordagens, descritas na seção de materiais e métodos, para avaliar este status. A primeira delas foi o arranjo de proteínas de receptores tirosina quinase fosforiladas. Em condições basais (sem estimulação com ligantes), C4-I apresentou forte expressão de p-*EGFR* e uma fraca expressão de p-ROR2. Após estimulação com EGF, verificou-se um aumento da expressão de p-*EGFR* e uma fraca expressão de p-ROR2 e p-HER2 (Figura 48). A segunda abordagem foi a realização da técnica de FISH, para avaliar se *EGFR* estaria amplificado nesta célula. Não houve hibridização indicativa de amplificação, uma vez

que a razão de sondas referentes ao gene *EGFR* (fluorescência verde) não foi maior do que as sondas referentes ao centrômero (fluorescência vermelha) (Figura 49).



Figura 48 - Arranjo de RTK da linhagem C4-I no estado basal (cima) e estimulada (baixo).

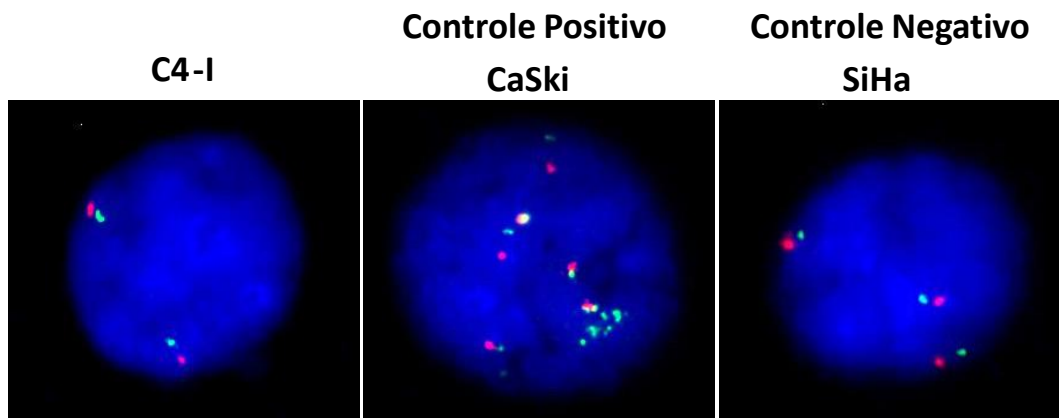


Figura 49- Imagens representativas do FISH. Verde (sonda hibridizada do gene *EGFR*). Vermelho (sonda hibridizada do centrômero)

6. DISCUSSÃO

A discussão desta tese foi dividida em 3 etapas, correspondendo aos 3 objectivos e resultados apresentados nos itens anteriores:

6.1. Estabelecimento e caracterização de uma nova linhagem tumoral de colo uterino proveniente de paciente brasileira

Células tumorais são ferramentas únicas para a compreensão da biologia e resposta tumoral. Até o momento, as linhagens tumorais cervicais disponíveis nos principais repositórios de células, ATCC ou ECACC, representam somente seis tumores cervicais (sem considerar as linhagens derivadas de HeLa), não refletindo o espectro completo da heterogeneidade biológica dos tumores cervicais, nem representando os pacientes da América do Sul. No presente estudo, uma linhagem tumoral de colo uterino, HCB-514, foi estabelecida com sucesso dentre 35 tentativas - uma taxa de sucesso de 3%. O estabelecimento de linhagens cervicais é difícil, com taxas de sucesso variando de 11-30%, o que pode explicar o reduzido número de novas linhagens⁹⁰⁻⁹³..

Diferentes métodos são utilizados para o estabelecimento de culturas primárias. Com relação ao processamento do tumor, na maioria dos trabalhos de cultivo de linhagem primária de colo uterino, a desagregação do tecido é feita com a mistura de colagenase e DNase^{91, 94-96}. Sendo assim, para um dos protocolos testados, também foi feita a escolha por essa solução. No entanto, nas amostras em que foi utilizado o protocolo com tripsina, foi possível verificar um maior número de células aderidas do que nas amostras dissociadas com a solução enzimática citada.. Em nosso estudo utilizamos um meio de cultura suplementado com fatores de crescimento já descritos como importantes para o crescimento de queratinócitos^{97, 98}. Ainda assim, o crescimento de fibroblastos por vezes acaba superando o das células de interesse, sendo necessária a aplicação de técnicas para eliminar a contaminação por células do tecido conjuntivo nas culturas.

Nem todos os mecanismos do crescimento contínuo de células *in vitro* são compreendidos, e a presença da expressão das proteínas E6/E7 do papilomavírus em tumores cervicais HPV-positivos é essencial⁹³. Importante destacar que a linhagem HCB-514 é HPV-16 positiva e expressou a proteína E6. Além disso, tanto na linhagem

quanto em seu respectivo tumor primário, verificou-se a integração do HPV no gene *CDH13*. Este gene negativamente regula a proliferação de queratinócitos e tem sido reportado como um dos genes celulares alvo de integração (ITGs) no câncer cervical ⁹⁹. Embora o papel destes ITGs na carcinogênese não está completamente compreendida, é sugerido que ITGs modulem a expressão de genes vizinhos através de mecanismos de interação de cromatina de longa-distância ⁹⁹. Além disso, a partir da análise filogenética, foi confirmada a variante HPV16 A1 tanto na HCB-514 como no tumor. Esta variante tem sido correlacionada com um risco aumentado de lesões intraepiteliais cervicais e tumores cervicais em mulheres caucasianas ¹⁰⁰. A análise de ancestralidade do DNA da HCB-514 revelou 49% do componente de origem europeu.

A caracterização molecular da linhagem HCB-514 evidenciou mutações em importantes genes relacionados com câncer apresentou, apesar de apresentar um perfil distinto do perfil de carcinoma de células escamosas recentemente reportado pelo TCGA ⁴¹. Um dos genes mutados, *BRCA2*, é um gene já conhecido nos tumores de mama hereditários que codifica para uma proteína relacionada com o reparo de dano ao DNA durante recombinação homóloga ¹⁰¹. As mutações em *BRCA2* ocorrem em aproximadamente 3% dos tumores cervicais, de acordo com base de dados do TCGA (www.cbioportal.org). Notavelmente, há um conhecimento limitado do status mutacional de *BRCA2* nos tumores cervicais, e os atuais estudos focam em mutações germinativas e seus papéis em tumores cervicais não relacionados com HPV, muitos associados com síndromes hereditárias ^{102, 103}. Não há estudos funcionais sobre mutações *BRCA2* em tumores cervicais. Interessantemente, a mutação p.W2830* identificada na HCB-514 foi identificada em outros tipos tumorais como um marcador preditivo para terapias-alvos, tais como inibidores de PARP; seu papel nos tumores cervicais ainda não foi esclarecido.

Também foi verificada uma mutação no gene *TGFBR1*, que codifica um receptor que age na sinalização de via de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) ¹⁰⁴. Esta via está também relacionada ao gene *TGFBR2*, que é um dos mais comumente mutados nos tumores cervicais ⁴¹. Quando TGFBR2 é ativado por seu ligante TGF- β , o receptor TGBR1, uma quinase serina/treonina, é dimerizado com TGFBR2 levando à parada do ciclo celular de células epiteliais e hematopoiéticas, controle da proliferação de células mesenquimais e diferenciação, além de outros processos relacionados com

supressão de crescimento¹⁰⁵. No entanto, em células tumorais, uma vez que as vias a jusante de TGFBR1 regulam inúmeros fatores transcricionais, estas vias podem induzir alterações no receptor que contribuem para a transição epitélio-mesenquimal (EMT)⁴¹. Neste sentido, a avaliação do efeito de inibidores de TGF- β 1, tais como galunisertibe, no contexto dos tumores cervicais, podem emergir como uma nova abordagem para elucidar o papel desta alteração¹⁰⁴.

Outro gene de interesse que foi mutado tanto nas células HCB-514 como no tecido tumoral da paciente foi o *SHKBP1*. Recentemente, o *SHKBP1* foi identificado no TCGA de câncer cervical como um gene significativamente mutado nesse tipo tumoral⁴¹. A superexpressão de SHKBP1 em linhagens celulares levou a um grande atraso na degradação do EGFR após a ativação pelo EGF¹⁰⁶. Este processo ocorreu devido à ligação competitiva de SHKBP1 com a proteína c-Cbl, interrompendo assim o complexo c-Cbl-CIN85, responsável pela endocitose de vesículas contendo EGFR¹⁰⁶.

De acordo com TCGA, uma média de 88 CNV somáticas foram encontradas por neoplasia cervical, incluindo 26 ampliações, 37 deleções e 26 alterações em braços inteiros de cromossomos⁴¹. A linhagem HCB-514 apresentou 30 ampliações e 34 deleções, somando 64 no total. Entre os CNVs, *EGFR* e *YAP1* estão amplificados na HCB-514. Ambas ampliações já foram descritas como recorrentes no câncer cervical⁴¹. Além disso, para confirmar o impacto biológico da amplificação de *EGFR*, realizamos a extração da proteína da HCB-514, que confirmou forte expressão de EGFR fosforilada. Interessantemente, bloquear a proteína tirosina-quinase EGFR é uma abordagem efetiva para tratar tipos específicos de tumores, incluindo colorretal, cabeça e pescoço e pulmão¹⁰⁷. No câncer cervical, um estudo clínico fase II com o inibidor de EGFR Erlotinibe mostrou que sua administração previamente ao tratamento padrão (cisplatina concomitante à radioterapia) foi segura e mostrou significativa atividade antitumoral¹⁰⁸. Além disso, um estudo de nosso grupo demonstrou o efeito promissor do lapatinibe (anti-EGFR e HER-2), em linhagens tumorais cervicais que expressam HER, por meio da redução do número e tamanho de vasos sanguíneos e prevenção do aumento nos níveis de HIF-1 α ⁴⁰.

Com relação à *YAP1*, a proteína codificada pelo gene *YAP1*, ela é negativamente regulada pela via de sinalização Hippo, e é relatado que o aumento de sua atividade induz proliferação celular, migração e sobrevivência em diversos tipos de câncer,

incluindo o cervical^{109, 110}. O aumento da atividade de YAP1 pode ocorrer após TGF α e ampirregulina inibirem a sinalização Hippo, via EGFR¹⁰⁹. Além disso, YAP1 parece exercer uma função-chave na apoptose induzida por TGF- β 1 e EMT através da regulação de EGFR¹¹⁰. No câncer cervical, foi encontrada amplificação de *YAP1* nas amostras no agrupamento EMT dos dados do TCGA, destacando o papel potencial deste gene na progressão tumoral relacionada à EMT. No entanto, mais estudos funcionais sobre a amplificação de YAP1 precisam ser realizados para elucidar seu papel no câncer cervical.

Por último, foi verificado o potencial tumorigêncio desta linhagem, sendo uma característica importante para seu uso em modelos pré-clínico in vivo.

Concluindo, o perfil molecular desta nova linhagem brasileira de colo uterino revelou a desregulação de diversas vias celulares chaves, tais como PI3K-AKT, sinalização de MAPK, reparo de DNA, apoptose, fatores transcricionais e RTK. Esta nova linhagem cervical HPV-16 positiva constitui um importante modelo para a melhor compreensão da biologia tumoral de colo uterino e oferece uma ferramenta promissora adicional para estudos pré-clínicos neste tipo tumoral.

6.2. Avaliação do potencial antineoplásico de extratos naturais em linhagens de colo uterino

A família Annonaceae abriga 136 gêneros e 2500 espécies que estão distribuídas principalmente em zonas tropicais (Aminimoghadamfarouj *et al.*, 2011). As espécies desta família apresentam diferentes classes de químicos, tais como alcaloides, conctituíntes não-alcaloides e acetogeninas, que foram avaliadas para o tratamento de infecções virais, doença de Parkinson e doenças cardiovasculares¹¹¹. *Annona* é o segundo maior gênero desta família, correspondendo a 166 espécies, aproximadamente (Tundis *et al.*, 2017). Entre as espécies de *Annona*, o potencial antitumoral contra diferentes tipos tumorais de *A. squamosa* e *A. muricata* foi encontrado em acetogeninas isoladas de suas sementes ou frutos. Estes compostos são tipicamente encontrados nas espécies de *Annona sp.*, sendo bem relatado que são potentes inibidores do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e da dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase (NADH)¹¹². Além disso, das folhas de

A. vepretorum e *A. sylvatica*, muitos compostos isolados do óleo essencial apresentaram potencial antitumoral contra diferentes tipos tumorais ¹¹².

Com relação aos estudos da atividade antitumoral de extratos obtidos de espécies de *Annona crassiflora*, Formagio *et al.* (2015) relataram o potencial do extrato bruto extraído com metanol a partir das folhas desta planta em 10 linhagens humanas. Após 48 horas de tratamento, as doses capazes de inibir o crescimento de 50% das células (GI₅₀) variaram de 2,49 até 44,83 µg/mL, e apenas uma das linhagens mostrou-se resistente mesmo à maior dose testada. Neste mesmo trabalho, os extratos brutos obtidos das sementes mostraram-se ainda mais promissores, com GI₅₀ variando de 0,01 até 8,9 µg/mL ¹¹³. O trabalho de Mesquita *et al.* (2009) também mostrou esta característica em extratos obtidos das cascas de raízes. Os valores de IC₅₀ variaram de 6,00 até 14,90 µg/mL entre (côlon, melanoma, cérebro e leucemia)⁵⁸.

Em nosso estudo, a IC₅₀ de *A crassiflora* após 72 h variou de 8,24 a 42,44 µg/mL. A partir destes dados, a atividade antitumoral deste extrato e de sua partição hexânica em colo uterino foi avaliada por nosso grupo, revelando que ambos os compostos são capazes de reduzir o número de colônias no ensaio clonogênico e induzir dano ao DNA e apoptose por via intrínseca ⁸⁰.

Neste trabalho, dentre as demais partições avaliadas, tanto a partição clorofórmica, quanto a acetato de etila reduziram a viabilidade celular. Neste sentido, ambas foram submetidas ao processo de fracionamento e uma triagem foi realizada. Os valores de IC₅₀ das frações variaram entre 13,90 e 47,97 µg/mL, após 72 horas de tratamento, sendo que 7C24 foi uma das frações que apresentaram menores valores de IC₅₀ e teve seu efeito melhor caracterizado nas linhagens de colo uterino. Esta fração, além de reduzir a viabilidade celular, induziu alterações indicativas de apoptose e dano ao DNA (clivagem de PARP, fosforilação de H2AX) e foi capaz de modular o ciclo celular, como observado com a alteração vista com p21 e parada na fase G0/G1 na linhagem SiHa. A análise de NMR revelou que um de seus principais constituintes foi a molécula kaempeferol-3-O-ramnosídeo. Esta mesma molécula foi identificada em outra planta, *Schima wallichii* (*S. wallichii*) Korth., evidenciando resultados promissores em tumores de mama e próstata, através da indução de apoptose ¹¹⁴.

Através de ciclos de fracionamento guiado por bioatividade foi possível identificar compostos com potencial para desenvolvimento de novas drogas com potencial para tratamento de tumores cervicais.

6.3. Investigação da atividade antineoplásica de combi-moléculas, com dupla função (inibidora de EGFR e alquilante do DNA), em linhagens de colo uterino

No presente estudo, nos propusemos também a explorar uma nova abordagem de terapias-alvo em colo uterino, baseada no conceito de combi-moléculas, em parceria com o grupo liderado pelo Prof. Bertrand Jean-Claude, da McGill University, onde parte dos ensaios foi realizado. Foi demonstrado que ZR2002 e JS-84, ambas contendo uma função inibidora de EGFR e uma alquilante do DNA, foram capazes de reduzir a viabilidade celular em linhagens tumorais de colo uterino e foram seletivas para a maioria destas linhagens, em comparação com um queratinócito normal. Além disso, elas reduziram migração e invasão na maioria das células avaliadas, em 24 h; e inibiram, com uma única dose, a formação de colônia após 14 dias, além de serem capazes de reduzir a viabilidade de esferoides em doses menores do que a cisplatina, após 10 dias. Também foram capazes de modular o ciclo celular das linhagens, bem como a morte celular em todas elas, 24 h após o tratamento.

A investigação sobre o efeito de moléculas híbridas em tumores de colo uterino é rara, com apenas um estudo clínico fases 1/2 concluído com o Tisotumabe Vedotina (HuMax[®]-TF-ADC), um anticorpo conjugado à droga (ADC), em pacientes com câncer cervical recorrente e/ou metastático (Hong *et al.*, 2019). Esta droga é composta por um anticorpo monoclonal específico para o fator tecidual (TF), por um ligante clivável e por um agente indutor de desorganização do microtúbulo (monometil auristatina E). Sua eficácia foi considerada encorajadora, com taxa de sobrevivência livre de progressão em 6 meses de 40%, e seus efeitos colaterais se mostraram gerenciáveis

115

Diferentemente dos ADCs, ZR2002 foi o primeiro tipo de molécula híbrida que não dependia de hidrólise para agir em seus alvos, sendo classificada como "combi-molécula tipo II" ¹¹⁶. Isso significa que, mesmo com sua estrutura intacta, ela tanto pode se ligar ao sítio de ATP do receptor de EGF e impedir sua ativação/ fosforilação,

como pode adicionar um grupo alquil ao DNA, promovendo a formação de adutos e consequente dano ao DNA ¹¹⁶⁻¹¹⁸. JS-84 e JS-61 também são "combi-moléculas tipo II".

A estrutura de ZR2002, JS-84 e JS-61 é composta por uma região quinazolina com adição de meia mostarda nitrogenada, cuja posição ou quantidade difere uma molécula da outra, conforme mencionado na metodologia. Para permitir a comparação dos efeitos destas moléculas híbridas foram utilizadas as drogas Gefitinibe, representando a região quinazolina, e o Clorambucil, uma mostarda nitrogenada completa. Sendo assim, a escolha da combinação de tratamentos Gef+Clor foi baseada exclusivamente na semelhança com a estrutura química das moléculas avaliadas.

A atividade antitumoral do Gefitinibe ocorre a partir de sua afinidade de ligação pelo sítio de ATP no domínio tirosina quinase intracelular dos receptores EGFR, inibindo sua atividade ¹¹⁹. De modo geral, não haverá a propagação da sinalização celular para as proteínas de vias a jusante do receptor, PI3K-mTOR, RAS-ERK e JAK-STAT, que regulam ciclo celular, sobrevivência, angiogênese e proliferação celular ¹²⁰.

Zheng e colaboradores demonstraram a atividade do Gefitinibe em linhagens celulares de colo uterino após 48 h de tratamento e revelaram IC₅₀ de 16,19 µM para HeLa e 11,87 µM para SiHa no ensaio de viabilidade celular CCK-8 ¹²¹. No presente trabalho, em 72 h os valores para as mesmas linhagens foram, respectivamente, 20 e 24 µM, no ensaio de MTS. Aqui, também foi possível observar um padrão de resposta entre as células utilizadas, que correspondeu com a expressão de proteína EGFR fosforilada nas mesmas, com valores de IC₅₀ CaSki<C4-I<HCB-514<HeLa<SiHa.

Nenhuma das linhagens apresenta mutação em *EGFR*. Somente as linhagens CaSki e HCB-514 apresentaram amplificação do receptor. A resposta de C4-I, que apresentou expressão acentuada de p-EGFR, pode ser explicada por uma sensibilização ao Gefitinibe devido à expressão do receptor HER-2 ¹²².

Com tratamento com 20 µM, próximo ao valor de IC₅₀ de 72 h, para a linhagem SiHa não foi detectada apoptose, nem alteração no ciclo celular através da citometria de fluxo. Porém, por *Western blot*, verificou-se um aumento sutil na expressão de caspase-9 clivada, PARP clivada e um aumento acentuado em p27, podendo indicar um início da modulação destes processos. De fato, já foi demonstrado que o bloqueio da atividade quinase em câncer de pulmão de não pequenas células leva a uma parada do

ciclo celular na fase G1¹²³. Além disso, foi demonstrado que Gefitinibe pode regular positivamente p27 e disparar sua translocação para o citoplasma onde p27 se liga ao intermediário p43/p41 clivado da caspase 8 para induzir apoptose na linhagem HCC-827. Nesta mesma dose, Zheng e colaboradores encontraram cerca de 45% de células em apoptose inicial, e um aumento em células em G0/G1 em comparação com o controle, após 48 h tratamento¹²¹.

É importante destacar que, quando avaliada nos ensaios de duração mais longa, como o de formação de colônia e viabilidade da cultura 3D, para esta linhagem é possível verificar que o Gefitinibe ou sua combinação com Clorambucil, são, de fato, eficazes, porém seu mecanismo pode não estar envolvido somente com apoptose. Zhang et al demonstraram que Gefitinibe suprime a EMT através da via de sinalização de Wnt/ β -catenina, reduzindo níveis de expressão das proteínas GSK3 β e β -catenina e de suas atividades em um ensaio de luciferase, além de aumentar E-caderina e reduzir vimentina, por imunofluorescência¹²¹.

Clorambucil é um quimioterápico utilizado para o tratamento de tumores de ovário, doença de Hodgkin, leucemia linfócita crônica e linfossarcoma, mas seu uso na clínica é limitado devido aos vários sintomas adversos¹²⁴. Sua atividade antitumoral ocorre devido à alquilação do DNA, levando à formação de ligação cruzada inter-fitas, impedindo a replicação do DNA e a proliferação celular¹²⁵. No presente estudo, as doses utilizadas não promoveram redução na viabilidade celular.

Foi previamente demonstrado que ZR2002 apresentava um potencial *in vitro* em outros tipos tumorais, tais como mama¹¹⁷, glioblastoma¹¹⁸. Aqui, a citotoxicidade de ZR2002, JS-84 e demais tratamentos foi avaliada e demonstrada em relevantes abordagens pré-clínicas *in vitro*, sendo utilizadas cinco linhagens de colo uterino dos dois principais subtipos histológicos - carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas -; uma linhagem primária, que mantém as características mais próximas ao tumor, e uma linhagem cultivada em esferoide, contemplando interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Além disso, utilizando duas linhagens normais, uma murina do tecido conjuntivo, NIH-3T3, e outra humana de origem no tecido epitelial, HaCat, verificou-se a uma alta seletividade de ZR2002 para linhagens tumorais, uma característica importante para o desenvolvimento de drogas antitumorais.

Verificamos que tanto ZR2002 como JS-84, desempenham o papel para o qual elas foram sintetizadas, inibindo a fosforilação de EGFR e, conseqüentemente, ERK; e promovendo dano ao DNA, evidenciado pela acentuada expressão de H2AX fosforilada. Essas alterações, se mantiveram presentes independente do nível de sensibilidade das linhagens, mesmo na mais resistente (SiHa), mostrando ser uma característica da molécula em si, não tão dependente do contexto celular, ainda que a expressão tenha acompanhado a sensibilidade das linhagens (mais acentuada na CaSki, seguida da HCB-514 e da SiHa). A capacidade de inibição de EGFR pela ZR2002 já foi demonstrada previamente em linhagens tumorais de mama ¹¹⁷, glioblastoma ¹¹⁸, bem como pulmão (Julie *et al.*, 2019, submetido). Estes trabalhos também demonstraram que ZR2002 é um inibidor irreversível de EGFR, além de promover inibição de proteínas a jusante a ele, como ERK, da via das MAPK. Nestes outros trabalhos a partir do ensaio alcalino de cometa, ficou demonstrado o aumento significativo no dano ao DNA, após 2 h de tratamento em concentrações abaixo de 10 uM para mama ¹¹⁷ e a partir de 1 uM para células-tronco gliais ¹¹⁸. No nosso estudo, o dano ao DNA foi avaliado, como mencionado anteriormente, pela fosforilação de H2AX. H2AX é uma histona recrutada quando há quebra de dupla fita do DNA. Diante de um dano como este, a histona H2AX sofre fosforilação de sua Ser-139 e tal evento é uma das modificações de cromatina mais bem estabelecida relacionada ao dano ao DNA e reparo, principalmente na avaliação de resposta a tratamento com radiação ionizante ¹²⁶. Ainda que o dano ao DNA em 24 h tenha sido devido à função alquilante da molécula ZR2002, uma vez que não houve fosforilação de H2AX com Gefitinibe sozinho, já foi demonstrado que o EGFR pode atenuar o dano ao DNA após irradiação, a partir de sua translocação para o núcleo e sua interação com a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKc), envolvida na via de reparo por união de extremidade não-homóloga (NHEJ). Sendo assim, o bloqueio de EGFR eliminaria, conseqüentemente, esta sua modulação no reparo do DNA ¹²⁷.

A quebra de dupla fita do DNA é normalmente reparada por recombinação homóloga (HR) ou por NHEJ. No entanto, dependendo da extensão e duração, este dano pode não ser passível de reparo, levando, como alternativa, à sinalização de p53 - que não se encontra completamente inativa em linhagens cervicais tumorais ^{128, 129} -, que ativará fatores de transcrição pró-apoptóticos, tais como FAS, BAX, PUMA, NOXA

¹³⁰. As alterações que se seguem, no caso de apoptose intrínseca, incluem a despolarização da membrana mitocondrial, seguida pela liberação de fatores como citocromo C e SMAC para o citosol, favorecendo a formação de apoptossoma e a maturação da caspase-9, que poderá catalisar a ativação proteolítica de caspases executoras 3 e 7 ¹³¹. A atividade catalítica de caspases executoras antecipa a morte celular e é responsável por muitas das alterações características da apoptose, como a clivagem de PARP, a fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina e formação de corpos apoptóticos. ¹³¹. Uma vez que a marcada expressão de H2AX fosforilada foi um evento comum às três linhagens de colo uterino tratadas com ZR2002, foi investigado se este tratamento estaria promovendo alterações relacionadas com morte celular. Foi verificado um aumento da clivagem de PARP para todas as linhagens, em 24 h. Também foi verificado o envolvimento de caspases executoras 3 para todas as linhagens; e da caspase iniciadora 9, para a linhagem menos sensível, SiHa. Por citometria, as alterações relacionadas à apoptose tardia ou necrose, indicadas pela externalização da fosfatidilserina concomitante à perda da integridade da membrana plasmática (dupla marcação com anexina V/7-AAD) ocorreram para todas as linhagens, principalmente na maior dose (20 μ M), com alguns dos tratamentos indicando até mesmo a perda da viabilidade (marcação com 7-AAD apenas). Importante ressaltar que, apesar de 20 μ M ser uma dose muito acima dos valores de IC₅₀ para ZR2002 e JS-84, ela foi utilizada neste trabalho para permitir verificar os efeitos de alguns dos demais tratamentos, como Gef e Gef+Clor na linhagem HCB-514 (IC₅₀ 15,4 e 19 μ M, respectivamente) e na linhagem SiHa (24 e 35 μ M, respectivamente).

Na linhagem mais sensível, CaSki, muitas destas alterações indicativas de morte celular por apoptose tiveram início mesmo antes das 24 h de tratamento com 2 μ M de ZR2002. Houve um aumento gradual de fosforilação de H2AX, um pico de clivagem de caspase-3 em 12 h, clivagem de PARP iniciada em 12 h, com aumento em 24 h de tratamento, além de externalização da fosfatidilserina em 24 h.

Na apoptose, a externalização da fosfatidilserina é um mecanismo capaz de sinalizar para os macrófagos que as células devem ser fagocitadas ¹³². Em relação a outros ensaios de apoptose, ZR2002 a 5 μ M também já demonstrou este potencial na

linhagem de mama MDA-MB-468, com um aumento na porcentagem de células em apoptose inicial, de acordo com aumento no tempo de exposição ¹¹⁷.

Com relação às alterações no ciclo celular, houve parada no ciclo celular, mas ao contrário do que é comumente esperado, verificou-se uma marcada redução nos níveis de expressão da proteína p21 nas linhagens avaliadas, CaSki e SiHa. No entanto, a parada no ciclo celular dependente de redução de p21 já foi demonstrada previamente ^{133,134}. A redução nos níveis de expressão de p21 pode estar relacionada com a indução de mecanismos de degradação desta proteína, como o sistema de ubiquitina proteassoma, cuja relação com a degradação de p21 já foi demonstrada em linhagens tumorais de colo uterino por nosso grupo ⁸⁰. Esta redução dos níveis de p21 também pode ter ocorrido devido à clivagem de p21 pela caspase 3, conforme já relatado previamente ¹³⁵. No entanto, não avaliamos o bloqueio destes sistemas para saber se esta redução de p21 seria revertida.

O tratamento com cisplatina é associado com a resistência à droga e efeitos adversos relacionados com infecções e perda auditiva ¹³⁶. Como estratégia para superar estes problemas, o uso de terapias em combinação é cada vez mais promissor e deve ser baseado em um racional biológico, com comprovada vantagem sobre o uso de drogas isoladas ¹³⁷. Ao mesmo tempo em que muitos ensaios clínicos avaliando o efeito dos inibidores de EGFR em tumores de colo uterino emergiram nos últimos anos, os estudos envolvendo monoterapia não impactaram a resposta das pacientes, ainda que tenham mantido a doença estável e tenham sido seguros ¹³⁸⁻¹⁴⁰. Sendo assim, em nosso trabalho, foi possível verificar o impacto de moléculas com mais uma função além da inibição de EGFR, podendo contribuir para o racional de abordagens visando o uso de inibidores de EGFR em combinação com drogas citotóxicas.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados nesta tese, e de acordo com os objetivos propostos, podemos concluir que:

- O estabelecimento de uma cultura primária de colo uterino de pacientes brasileiras foi realizado, bem como sua caracterização fenotípica e molecular. A linhagem nomeada como HCB-514 apresentou características semelhantes às do tumor da paciente, como por exemplo mutações somáticas nos genes *BRCA2*, *TGFBR1* e *CCDC22*, expressão das proteínas p16 e p40 e um mesmo sítio de integração do HPV-16. A linhagem apresentou amplificação em genes relacionados com as vias de sinalização PI3K-AKT e MAPK e alterações nos receptores tirosina-quinase, como amplificação de *EGFR* e *ALK* e deleção de *PDGFRA* e *MET*. Também mostrou potencial tumorigênico após xenotransplante em camundongos. Diante disso, esta nova linhagem tumoral poderá ser usada tanto como modelo em estudos pré-clínicos, como para a melhor compreensão sobre as características dos tumores de colo uterino.

- Dentre 13 espécies de planta típicas do cerrado brasileiro testadas, a *Annona crassiflora* foi a espécie de maior efeito nas linhagens tumorais de colo uterino, capaz de reduzir a viabilidade celular com os menores valores de IC₅₀. Seguindo o fracionamento guiado por bioatividade dos extratos desta planta, verificou-se que sua fração identificada como 7C24 foi capaz de promover dano ao DNA, clivagem da proteína PARP (envolvida no reparo do DNA), bem como alterações na proteína p21 (envolvida no ciclo celular) nas linhagens SiHa e HeLa. Além disso, houve parada do ciclo celular na fase G₀/G₁ na linhagem SiHa. A análise de NMR, indicou que, dentre as moléculas presentes nesta fração está o kampferol-3-O-rhamnoside, que pode ser um dos responsáveis pelo potencial bioativo de 7C24.

- A investigação das combi-moléculas (moléculas híbridas) JS-84 e, principalmente, ZR2002 em linhagens tumorais de colo uterino mostrou que elas reduzem a viabilidade celular com baixas doses, conforme demonstrado pelo ensaio de MTS; além de interferirem na proliferação e viabilidade mesmo a longo prazo,

conforme visto pelo ensaio de formação de colônia e pela cultura em 3D, respectivamente. Estas moléculas também inibiram processos importantes na progressão tumoral, como a capacidade de migração e invasão, bem como promoveram alterações no ciclo celular e morte por apoptose intrínseca. Estes resultados mostraram o potencial terapêutico de combinar, em uma única molécula, a inibição de um alvo específico (EGFR) com um agente alquilante em um tipo tumoral cujas terapias-alvo ainda são tão pouco exploradas ou pouco eficazes quando em monoterapia. Sendo assim, o potencial destas moléculas híbridas em colo uterino deverá ser melhor explorado a partir de ensaios pré-clínicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 1.Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, Lanas F, Lopez-Jaramillo P, Gupta R, et al. *Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study*. **Lancet**. 2019.
- 2.Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2018;68(6):394-424.
- 3.INCA. *Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro ed. **Rio de Janeiro, Brasil**2020.
- 4.INCA. *Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, Brasil ed. **Rio de Janeiro, Brasil**2018 2018.
- 5.WHO. *World health organization: World health statistics 2012*. [Internet]: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2012 [cited 01/09/2015];Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44844/1/9789241564441_eng.pdf.
- 6.Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
- 7.Padma VV. *An overview of targeted cancer therapy*. **Biomedicine (Taipei)**. 2015;5(4):19.
- 8.Wilkes GM. *Targeted Therapy: Attacking Cancer with Molecular and Immunological Targeted Agents*. **Asia Pac J Oncol Nurs**. 2018;5(2):137-55.
- 9.INCA. *Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva*. [Internet] <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer2019> [updated 01 de agosto de 2019; cited 22 de outubro de 2019].
- 10.INCA. *Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil*. Vigilância CGdPe, editor. **Rio de Janeiro, Brasil**2014.
- 11.zur Hausen H. *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. **Virology**. 2009;384(2):260-5.
- 12.Ferreira CG, Rocha JCC. *Oncologia Molecular*2010.
- 13.Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. *Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein*. **Arch Virol**. 2008;153(3):397-408.

14. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. *The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis*. **Kobe J Med Sci**. 2004;50(1-2):9-19.
15. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. *Papillomavirus E6 proteins*. **Virology**. 2009;384(2):324-34.
16. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. *Transcriptional control of human p53-regulated genes*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2008;9(5):402-12.
17. Helt AM, Funk JO, Galloway DA. *Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells*. **J Virol**. 2002;76(20):10559-68.
18. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. **J Natl Cancer Inst**. 2000;92(9):709-20.
19. Galic V, Herzog TJ, Lewin SN, Neugut AI, Burke WM, Lu YS, et al. *Prognostic significance of adenocarcinoma histology in women with cervical cancer*. **Gynecol Oncol**. 2012;125(2):287-91.
20. Acevedo-Rocha CG, Munguía-Moreno JA, Gariglio P, Ocadiz-Delgado R. *A Transcriptome- and Marker-Based Systemic Analysis of Cervical Cancer*: **INTECH Open Access Publisher**; 2012.
21. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Peadarallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. *Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas*. **Nature**. 2014;506(7488):371-5.
22. Jung SH, Choi YJ, Kim MS, Baek IP, Lee SH, Lee AW, et al. *Progression of naive intraepithelial neoplasia genome to aggressive squamous cell carcinoma genome of uterine cervix*. **Oncotarget**. 2015;6(6):4385-93.
23. Wright AA, Howitt BE, Myers AP, Dahlberg SE, Palescandolo E, Van Hummelen P, et al. *Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix*. **Cancer**. 2013;119(21):3776-83.
24. Kelly J. *Taking time-lapse genomic snapshots of cervical cancer*. **Center for Cancer Research Connections**; 2008.
25. Sankaranarayanan R, Thara S, Esmay PO, Basu P. *Cervical cancer: screening and therapeutic perspectives*. **Med Princ Pract**. 2008;17(5):351-64.

26. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. *Cancer of the cervix uteri*. **Int J Gynaecol Obstet**. 2018;143 Suppl 2:22-36.
27. Roque DR, Wysham WZ, Soper JT. *The surgical management of cervical cancer: an overview and literature review*. **Obstet Gynecol Surv**. 2014;69(7):426-41.
28. NCI. *National Cancer Institute*. [Internet]: National Institute of Health; 2014 [cited 01/09/2015]; Available from: <http://www.cancer.gov/>.
29. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. *Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes*. **Pharmacol Rev**. 2012;64(3):706-21.
30. Zou C, Liu H, Feugang JM, Hao Z, Chow HH, Garcia F. *Green tea compound in chemoprevention of cervical cancer*. **Int J Gynecol Cancer**. 2010;20(4):617-24.
31. Seol HJ, Ulak R, Ki KD, Lee JM. *Cytotoxic and targeted systemic therapy in advanced and recurrent cervical cancer: experience from clinical trials*. **Tohoku J Exp Med**. 2014;232(4):269-76.
32. ANVISA. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. [Internet] 2015 [cited 01/12/2015].
33. Peralta-Zaragoza O, Bermudez-Morales VH, Perez-Plasencia C, Salazar-Leon J, Gomez-Ceron C, Madrid-Marina V. *Targeted treatments for cervical cancer: a review*. **Oncol Targets Ther**. 2012;5:315-28.
34. Li H, Wu X, Cheng X. *Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer*. **J Gynecol Oncol**. 2016;27(4):e43.
35. Barra F, Lorusso D, Leone Roberti Maggiore U, Ditto A, Bogani G, Raspagliesi F, et al. *Investigational drugs for the treatment of cervical cancer*. **Expert Opin Investig Drugs**. 2017;26(4):389-402.
36. Soonthornthum T, Arias-Pulido H, Joste N, Lomo L, Muller C, Rutledge T, et al. *Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer*. **Ann Oncol**. 2011;22(10):2166-78.
37. Tian WJ, Huang ML, Qin QF, Chen Q, Fang K, Wang PL. *Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression in Patients with Cervical Cancer: A Meta-Analysis*. **PLoS One**. 2016;11(7):e0158787.
38. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. *EGFR and cancer prognosis*. **Eur J Cancer**. 2001;37 Suppl 4:S9-15.

39. Kersemaekers AM, van de Vijver MJ, Kenter GG, Fleuren GJ. *Genetic alterations during the progression of squamous cell carcinomas of the uterine cervix*. **Genes Chromosomes Cancer**. 1999;26(4):346-54.
40. Martinho O, Silva-Oliveira R, Cury FP, Barbosa AM, Granja S, Evangelista AF, et al. *HER Family Receptors are Important Theranostic Biomarkers for Cervical Cancer: Blocking Glucose Metabolism Enhances the Therapeutic Effect of HER Inhibitors*. **Theranostics**. 2017;7(3):717-32.
41. Cancer Genome Atlas Research N, Albert Einstein College of M, Analytical Biological S, Barretos Cancer H, Baylor College of M, Beckman Research Institute of City of H, et al. *Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer*. **Nature**. 2017;543(7645):378-84.
42. Merayo N, Rachid Z, Qiu Q, Brahimi F, Jean-Claude BJ. *The combi-targeting concept: evidence for the formation of a novel inhibitor in vivo*. **Anticancer Drugs**. 2006;17(2):165-71.
43. Logue JS, Morrison DK. *Complexity in the signaling network: insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy*. **Genes Dev**. 2012;26(7):641-50.
44. von Manstein V, Yang CM, Richter D, Delis N, Vafaizadeh V, Groner B. *Resistance of Cancer Cells to Targeted Therapies Through the Activation of Compensating Signaling Loops*. **Curr Signal Transduct Ther**. 2013;8(3):193-202.
45. Fortin S, Berube G. *Advances in the development of hybrid anticancer drugs*. **Expert Opin Drug Discov**. 2013;8(8):1029-47.
46. Matheson SL, McNamee J, Jean-Claude BJ. *Design of a chimeric 3-methyl-1,2,3-triazene with mixed receptor tyrosine kinase and DNA damaging properties: a novel tumor targeting strategy*. **J Pharmacol Exp Ther**. 2001;296(3):832-40.
47. Fang Y, Wu J, Li T, Luo Y, Qiu Q, Quan X, et al. *Biological effects of novel "combi-targeting" molecule and its effect on DNA repair pathway in hormone-refractory prostate cancer*. **Am J Cancer Res**. 2015;5(8):2387-95.
48. Zheng H, Liang G, Chen Y, Lin S, Liu W, Fang Y. *Potential Anticancer Mechanisms of a Novel EGFR/DNA-Targeting Combi-Molecule (JDF12) against DU145 Prostate Cancer Cells: An iTRAQ-Based Proteomic Analysis*. **Biomed Res Int**. 2017;2017:8050313.
49. Lahlou M. *The Success of Natural Products in Drug Discovery*. **Pharmacology & Pharmacy [Internet]**. 2013; 4:[17-31 pp.].
50. Cragg GM, Newman DJ. *Plants as a source of anti-cancer agents*. **J Ethnopharmacol**. 2005;100(1-2):72-9.

51. Newman DJ, Cragg GM. *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014*. **J Nat Prod**. 2016;79(3):629-61.
52. Butler MS, Robertson AA, Cooper MA. *Natural product and natural product derived drugs in clinical trials*. **Nat Prod Rep**. 2014;31(11):1612-61.
53. Paton AJB, N.; Govaerts, R.; Harman, K.; Hinchcliffe, S.; Allkin, B.; Lughadha, E.N. *Towards Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation: a working list of all known plant species—progress and prospects*. *Taxon* [Internet]. 2008; 57(2):[602–11 pp.].
54. IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Biomas brasileiros*. [Internet] Rio de Janeiro, Brasil 2004; Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>.
55. Luna JdSdS, A. F.; de Lima, M. R. F.; de Omena, M. C.; de Mendonca, F. A.; Bieber, L. W.; Sant'Ana, A. E. *A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil*. **J Ethnopharmacol**. 2005;97(2):199-206.
56. de Melo JG, Santos AG, de Amorim EL, do Nascimento SC, de Albuquerque UP. *Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach*. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2011;2011:365359.
57. Tribess B, Pintarelli GM, Bini LA, Camargo A, Funez LA, de Gasper AL, et al. *Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil*. **J Ethnopharmacol**. 2015;164:136-46.
58. de Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, et al. *Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines*. **J Ethnopharmacol**. 2009;123(3):439-45.
59. Ferreira PM, Farias DF, Viana MP, Souza TM, Vasconcelos IM, Soares BM, et al. *Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants*. **An Acad Bras Cienc**. 2011;83(3):1045-58.
60. Ribeiro SS, de Jesus AM, dos Anjos CS, da Silva TB, Santos AD, de Jesus JR, et al. *Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants*. **Planta Med**. 2012;78(14):1601-6.
61. da Silva TB, Costa CO, Galvao AF, Bomfim LM, Rodrigues AC, Mota MC, et al. *Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil*. **BMC Complement Altern Med**. 2016;16:199.

- 62.Mans DR, da Rocha AB, Schwartzmann G. *Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds*. **Oncologist**. 2000;5(3):185-98.
- 63.Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. *Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives*. **Pharmacol Res**. 2016;112:4-29.
- 64.Costa-Loufo L.V.; Montenegro RCA, A.P.N.N.; Madeira, S.V.F.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Moraes, M.O. *A contribuição de produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará*. *Rev Virtual de Quim [Internet]*. 2010; 2:[47-58 pp.].
- 65.Sharma SV, Haber DA, Settleman J. *Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents*. **Nat Rev Cancer**. 2010;10(4):241-53.
- 66.Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. *The clinical relevance of cancer cell lines*. **J Natl Cancer Inst**. 2013;105(7):452-8.
- 67.Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, et al. *The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments*. **Int J Cancer**. 2015;136(12):2741-51.
- 68.Richter CE, Cocco E, Bellone S, Bellone M, Casagrande F, Todeschini P, et al. *Primary cervical carcinoma cell lines overexpress epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and are highly sensitive to immunotherapy with MT201, a fully human monoclonal anti-EpCAM antibody*. **Int J Gynecol Cancer**. 2010;20(9):1440-7.
- 69.de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR*. **J Gen Virol**. 1995;76 (Pt 4):1057-62.
- 70.Abraham J, Stenger M. *Cobas HPV test for first-line screening for cervical cancer*. **J Community Support Oncol**. 2014;12(5):156-7.
- 71.Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. *Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples*. **Nat Biotechnol**. 2013;31(3):213-9.
- 72.Lai D HGaSS. *HMMcopy: Copy number prediction with correction for GC and mappability bias for HTS data*. [Internet]: R package version 1.8.0; 2012.

- 73.Chandrani P, Kulkarni V, Iyer P, Upadhyay P, Chaubal R, Das P, et al. *NGS-based approach to determine the presence of HPV and their sites of integration in human cancer genome*. **Br J Cancer**. 2015;112(12):1958-65.
- 74.Edgar RC. *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. **Nucleic Acids Res**. 2004;32(5):1792-7.
- 75.Costa JL, Sousa S, Justino A, Kay T, Fernandes S, Cirnes L, et al. *Nonoptical massive parallel DNA sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in a diagnostic setting*. **Hum Mutat**. 2013;34(4):629-35.
- 76.Fernandes GC, Michelli RA, Galvao HC, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, et al. *Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry*. **Oncotarget**. 2016;7(49):80465-81.
- 77.Tsang HF, Xue VW, Koh SP, Chiu YM, Ng LP, Wong SC. *NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics*. **Expert Rev Mol Diagn**. 2017;17(1):95-103.
- 78.Ahn S, Hong M, Van Vrancken M, Lyou YJ, Kim ST, Park SH, et al. *A nCounter CNV Assay to Detect HER2 Amplification: A Correlation Study with Immunohistochemistry and In Situ Hybridization in Advanced Gastric Cancer*. **Mol Diagn Ther**. 2016;20(4):375-83.
- 79.Norton N, Advani PP, Serie DJ, Geiger XJ, Necela BM, Axenfeld BC, et al. *Assessment of Tumor Heterogeneity, as Evidenced by Gene Expression Profiles, Pathway Activation, and Gene Copy Number, in Patients with Multifocal Invasive Lobular Breast Tumors*. **PLoS One**. 2016;11(4):e0153411.
- 80.Silva VAO, Alves ALV, Rosa MN, Silva LRV, Melendez ME, Cury FP, et al. *Hexane partition from Annona crassiflora Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines*. **Invest New Drugs**. 2019;37(4):602-15.
- 81.Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. *Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research*. **Cancer Lett**. 2012;327(1-2):123-33.
- 82.Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. *Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer*. **J Natl Cancer Inst**. 2005;97(9):643-55.
- 83.Crisafulli R. *Estudo fitoquímico de plantas do nordeste: Annona squamosa. Obtenção de derivados reacionais do ácido caurenóico*. Fortaleza-CE: Universidade Federal do Ceará; 2007.
- 84.Chen Y, Chen Y, Shi Y, Ma C, Wang X, Li Y, et al. *Antitumor activity of Annona squamosa seed oil*. **J Ethnopharmacol**. 2016;193:362-7.

85.RANA VS. *Fatty Oil and Fatty Acid Composition of Annona squamosa Linn. Seed Kernels. International Journal of Fruit Science.* 2015;15:79-84.

86.SIQUEIRA NLSAASDBSCACÂLBSACSJMd. *ANTI-INFLAMMATORY, ANTINOCICEPTIVE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE HYDROMETHANOLIC FRACTION FROM ANNONA NUTANS LEAVES. Bioscience Journal.* 2019;35(5):1599-613.

87.Mohamed Gamaleldin Elsadig Karar AR, Omnia Tag Alkhatim Abdalla, Amna Ahmed Yousif, Ebrahim, Matthias S Ullrich and Nikoli Kuhnert. *Antimicrobial, Antiparasitic and Antioxidant Activities of Medicinal Plants from Sudan. J Complement Med Alt Healthcare.* 2017;2(5):01-9.

88.TITIK SUNARNI IF, MARIA IMMACULATA IWO, KOMAR RUSLAN WIRASUTISNA. *CONSTITUENT AND ANTIHYPERURICEMIC ACTIVITY OF STELECHOCARPUS BURAHOL LEAVES SUBFRACTIONS. Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(4):435-9.

89.Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. *Antiplatelet aggregation constituents from Annona purpurea. J Nat Prod.* 1998;61(12):1457-61.

90.Javed S, Sharma BK, Sood S, Sharma S, Bagga R, Bhattacharyya S, et al. *Significance of CD133 positive cells in four novel HPV-16 positive cervical cancer-derived cell lines and biopsies of invasive cervical cancer. BMC Cancer.* 2018;18(1):357.

91.Kelland LR, Burgess L, Steel GG. *Characterization of four new cell lines derived from human squamous carcinomas of the uterine cervix. Cancer Res.* 1987;47(18):4947-52.

92.Ku JL, Kim WH, Park HS, Kang SB, Park JG. *Establishment and characterization of 12 uterine cervical-carcinoma cell lines: common sequence variation in the E7 gene of HPV-16-positive cell lines. Int J Cancer.* 1997;72(2):313-20.

93.Magaldi TG, Almstead LL, Bellone S, Prevatt EG, Santin AD, DiMaio D. *Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. Virology.* 2012;422(1):114-24.

94.Han X, Lyle R, Eustace DL, Jewers RJ, Parrington JM, Das A, et al. *XH1--a new cervical carcinoma cell line and xenograft model of tumour invasion, 'metastasis' and regression. Br J Cancer.* 1991;64(4):645-54.

95.Koopman LA, Szuhai K, van Eendenburg JD, Bezrookove V, Kenter GG, Schuurin E, et al. *Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45, and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. Cancer Res.* 1999;59(21):5615-24.

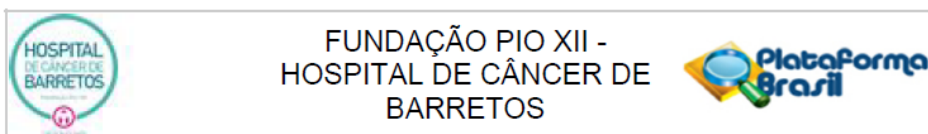
- 96.Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, et al. *Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer.* **J Virol.** 1999;73(7):5402-10.
- 97.Stanley MA, Parkinson EK. *Growth requirements of human cervical epithelial cells in culture.* **Int J Cancer.** 1979;24(4):407-14.
- 98.Stern PW, C.; Burt, D. *Culture of cervical carcinoma tumor cell lines.* In: Freshney RPaRI, editor. *Culture of Human Tumor Cells: John Wiley & Sons, Inc;* 2004.
- 99.Zhang R, Shen C, Zhao L, Wang J, McCrae M, Chen X, et al. *Dysregulation of host cellular genes targeted by human papillomavirus (HPV) integration contributes to HPV-related cervical carcinogenesis.* **Int J Cancer.** 2016;138(5):1163-74.
- 100.Mirabello L, Yeager M, Cullen M, Boland JF, Chen Z, Wentzensen N, et al. *HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women.* **J Natl Cancer Inst.** 2016;108(9).
- 101.Nesic K, Wakefield M, Kondrashova O, Scott CL, McNeish IA. *Targeting DNA repair: the genome as a potential biomarker.* **J Pathol.** 2018;244(5):586-97.
- 102.Constantinou P, Tischkowitz M. *Genetics of gynaecological cancers.* **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** 2017;42:114-24.
- 103.Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, et al. *Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian.* **Cancer.** 2015;121(2):269-75.
- 104.Herbertz S, Sawyer JS, Stauber AJ, Gueorguieva I, Driscoll KE, Estrem ST, et al. *Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway.* **Drug Des Devel Ther.** 2015;9:4479-99.
- 105.Pasche B, Pennison MJ, Jimenez H, Wang M. *TGFBR1 and cancer susceptibility.* **Trans Am Clin Climatol Assoc.** 2014;125:300-12.
- 106.Feng L, Wang JT, Jin H, Qian K, Geng JG. *SH3KBP1-binding protein 1 prevents epidermal growth factor receptor degradation by the interruption of c-Cbl-CIN85 complex.* **Cell Biochem Funct.** 2011;29(7):589-96.
- 107.Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. *Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy.* **Expert Opin Ther Targets.** 2012;16(1):15-31.

108. Nogueira-Rodrigues A, Moralez G, Grazziotin R, Carmo CC, Small IA, Alves FV, et al. *Phase 2 trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer.* **Cancer**. 2014;120(8):1187-93.
109. He C, Mao D, Hua G, Lv X, Chen X, Angeletti PC, et al. *The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression.* **EMBO Mol Med**. 2015;7(11):1426-49.
110. Liu Y, He K, Hu Y, Guo X, Wang D, Shi W, et al. *YAP modulates TGF-beta1-induced simultaneous apoptosis and EMT through upregulation of the EGF receptor.* **Sci Rep**. 2017;7:45523.
111. Aminimoghadamfarouj N, Nematollahi A, Wiart C. *Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery.* **J Asian Nat Prod Res**. 2011;13(5):465-76.
112. Tundis R, Xiao J, Loizzo MR. *Annona species (Annonaceae): a rich source of potential antitumor agents?* **Ann N Y Acad Sci**. 2017.
113. Formagio AS, Vieira MC, Volobuff CR, Silva MS, Matos AI, Cardoso CA, et al. *In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae.* **Braz J Med Biol Res**. 2015;48(4):308-15.
114. Halimah E, Diantini A, Destiani DP, Pradipta IS, Sastramihardja HS, Lestari K, et al. *Induction of caspase cascade pathway by kaempferol-3-O-rhamnoside in LNCaP prostate cancer cell lines.* **Biomed Rep**. 2015;3(1):115-7.
115. Hong DS, Concin N, Vergote I, de Bono JS, Slomovitz BM, Drew Y, et al. *Tisotumab Vedotin in Previously Treated Recurrent or Metastatic Cervical Cancer.* **Clin Cancer Res**. 2019.
116. Rachid Z, Brahimi F, Domarkas J, Jean-Claude BJ. *Synthesis of half-mustard combi-molecules with fluorescence properties: correlation with EGFR status.* **Bioorg Med Chem Lett**. 2005;15(4):1135-8.
117. Brahimi F, Rachid Z, Qiu Q, McNamee JP, Li YJ, Tari AM, et al. *Multiple mechanisms of action of ZR2002 in human breast cancer cells: a novel combi-molecule designed to block signaling mediated by the ERB family of oncogenes and to damage genomic DNA.* **Int J Cancer**. 2004;112(3):484-91.
118. Sharifi Z, Abdulkarim B, Meehan B, Rak J, Daniel P, Schmitt J, et al. *Mechanisms and Antitumor Activity of a Binary EGFR/DNA-Targeting Strategy Overcomes Resistance of Glioblastoma Stem Cells to Temozolomide.* **Clin Cancer Res**. 2019;25(24):7594-608.
119. Tiseo M, Bartolotti M, Gelsomino F, Bordi P. *Emerging role of gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC).* **Drug Des Devel Ther**. 2010;4:81-98.

- 120.Yarden Y, Sliwkowski MX. *Untangling the ErbB signalling network*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2001;2(2):127-37.
- 121.Zheng J, Yu J, Yang M, Tang L. *Gefitinib suppresses cervical cancer progression by inhibiting cell cycle progression and epithelial-mesenchymal transition*. **Exp Ther Med**. 2019;18(3):1823-30.
- 122.Hirata A, Hosoi F, Miyagawa M, Ueda S, Naito S, Fujii T, et al. *HER2 overexpression increases sensitivity to gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, through inhibition of HER2/HER3 heterodimer formation in lung cancer cells*. **Cancer Res**. 2005;65(10):4253-60.
- 123.Ahn SH, Jeong EH, Lee TG, Kim SY, Kim HR, Kim CH. *Gefitinib induces cytoplasmic translocation of the CDK inhibitor p27 and its binding to a cleaved intermediate of caspase 8 in non-small cell lung cancer cells*. **Cell Oncol (Dordr)**. 2014;37(5):377-86.
- 124.Chen Y, Jia Y, Song W, Zhang L. *Therapeutic Potential of Nitrogen Mustard Based Hybrid Molecules*. **Front Pharmacol**. 2018;9:1453.
- 125.Panasci L, Paiement JP, Christodoulopoulos G, Belenkov A, Malapetsa A, Aloyz R. *Chlorambucil drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: the emerging role of DNA repair*. **Clin Cancer Res**. 2001;7(3):454-61.
- 126.Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. *gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair*. **Leukemia**. 2010;24(4):679-86.
- 127.Chen DJ, Nirodi CS. *The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage*. **Clin Cancer Res**. 2007;13(22 Pt 1):6555-60.
- 128.Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP. *Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000;97(15):8501-6.
- 129.Butz K, Shahabeddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullmann A, Hoppe-Seyler F. *Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells*. **Oncogene**. 1995;10(5):927-36.
- 130.Roos WP, Kaina B. *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. **Trends Mol Med**. 2006;12(9):440-50.
- 131.Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. **Cell Death Differ**. 2018;25(3):486-541.

- 132.Segawa K, Nagata S. *An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure*. **Trends Cell Biol.** 2015;25(11):639-50.
- 133.Gartel AL, Radhakrishnan SK. *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. **Cancer Res.** 2005;65(10):3980-5.
- 134.Liu G, Lozano G. *p21 stability: linking chaperones to a cell cycle checkpoint*. **Cancer Cell.** 2005;7(2):113-4.
- 135.Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. *Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis*. **Oncogene.** 1999;18(5):1131-8.
- 136.Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H, Joseph JM, Uddin S, Mraiche F. *Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway*. **J Transl Med.** 2018;16(1):96.
- 137.Goltsov A, Langdon SP, Goltsov G, Harrison DJ, Bown J. *Customizing the therapeutic response of signaling networks to promote antitumor responses by drug combinations*. **Front Oncol.** 2014;4:13.
- 138.Goncalves A, Fabbro M, Lhomme C, Gladieff L, Extra JM, Floquet A, et al. *A phase II trial to evaluate gefitinib as second- or third-line treatment in patients with recurring locoregionally advanced or metastatic cervical cancer*. **Gynecol Oncol.** 2008;108(1):42-6.
- 139.Schilder RJ, Sill MW, Lee YC, Mannel R. *A phase II trial of erlotinib in recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group Study*. **Int J Gynecol Cancer.** 2009;19(5):929-33.
- 140.Cetina L, Crombet T, Jimenez-Lima R, Zapata S, Ramos M, Avila S, et al. *A pilot study of nimotuzumab plus single agent chemotherapy as second- or third-line treatment or more in patients with recurrent, persistent or metastatic cervical cancer*. **Cancer Biol Ther.** 2015;16(5):684-9.

ANEXO A - Parecer de aprovação do CEP



Continuação do Parecer: 1.570.328

Outros	Responsabilidade.jpg	15:33:17		Aceito
Outros	Declaração financiamento.jpg	27/07/2015 15:32:48		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.jpg	27/07/2015 15:31:20		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 01 de Junho de 2016

Assinado por:
Thiago Buosi Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br

ANEXO A - Parecer de aprovação do CEUA



ha
hospital
de amor
barretos

002/2019

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização in vitro e in vivo do potencial antineoplásico de extratos naturais de plantas e derivados em linhagens tumorais de colo uterino comerciais e primárias", sob responsabilidade do Dr. Rui Manuel Reis, na qualidade de orientador e Marcela Nunes Rosa, discente do programa Pós Doutorado vinculada a Pós Graduação - HCB, envolvendo a utilização e manutenção de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de experimentação animal (CONCEA), foi aprovado em reunião ordinária no dia 04 de junho de 2019 sob protocolo 002/2019, por unanimidade da Comissão de ética no uso de animais (CEUA), do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos - SP.

Vigência do Projeto: agosto/2019 à Julho/2020

Espécie/Linhagem: *mus musculus* / NOD Scid Gamma - NSG

Nº de animais: 16

Peso/idade: 8 semanas

Origem: Biotério do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, do Hospital de Câncer de Barretos.

Barretos, 07 de agosto de 2019


Dr. Rui Manuel Reis
Coordenador - CEUA/CPOM-HCB

FONE/FAX - (17) 3321-6600
END: RUA ANTENOR DUARTE VILELLA, 1331
CEP - 14784-400 - BARRETOS/SP - BRASIL
WWW.HCANCERBARRETOS.COM.BR

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Establishment, molecular and biological characterization of HCB-514: a novel human cervical cancer cell line

Received: 6 September 2018
 Accepted: 19 December 2018
 Published online: 13 February 2019

Marcela Nunes Rosa¹, Adriane Feijó Evangelista¹, Letícia Ferro Leal¹,
 Cristina Mendes De Oliveira¹, Viviane Aline Oliveira Silva¹, Carla Carolina Munari¹,
 Fernanda Franco Munari¹, Graziela De Macêdo Matsushita², Ricardo Dos Reis³,
 Carlos Eduardo Andrade³, Cristiano de Pádua Souza³ & Rui Manuel Reis^{1,4,5}

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women. Although cure rates are high for early stage disease, clinical outcomes for advanced, metastatic, or recurrent disease remain poor. To change this panorama, a deeper understanding of cervical cancer biology and novel study models are needed. Immortalized human cancer cell lines such as HeLa constitute crucial scientific tools, but there are few other cervical cancer cell lines available, limiting our understanding of a disease known for its molecular heterogeneity. This study aimed to establish novel cervical cancer cell lines derived from Brazilian patients. We successfully established one (HCB-514) out of 35 cervical tumors biopsied. We confirmed the phenotype of HCB-514 by verifying its epithelial and tumor origin through cytokeratins, EpCAM and p16 staining. It was also HPV-16 positive. Whole-exome sequencing (WES) showed relevant somatic mutations in several genes including *BRCA2*, *TGFBR1* and *IRX2*. A copy number variation (CNV) analysis by nanostring and WES revealed amplification of genes mainly related to kinases proteins involved in proliferation, migration and cell differentiation, such as *EGFR*, *PIK3CA*, and *MAPK7*. Overexpression of *EGFR* was confirmed by phospho RTK-array and validated by western blot analysis. Furthermore, the HCB-514 cell line was sensitive to cisplatin. In summary, this novel Brazilian cervical cancer cell line exhibits relevant key molecular features and constitutes a new biological model for pre-clinical studies.

Cervical cancer is a major public health problem worldwide, making it the fourth most common type of cancer among women. In 2018, there were 570,000 new cases reported and 311,000 related deaths¹. Women between the ages of 50 and 60 years-old are most affected by cervical cancer². Persistent infection of the basal layer of cervical epithelium with high-risk human papillomavirus (HPV), such as 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68, is considered the main risk factor for the development of cervical cancer precursors, known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN 1, 2, and 3), and invasive cervical cancer³.

Cervical cancer can be histologically classified as squamous cell carcinoma (SCC), adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma, with a prevalence of 77%, 17% and 6%, respectively⁴. Many efforts have been undertaken to determine the molecular profile of this heterogeneous disease. Recently, The Cancer Genome Atlas (TCGA) integrated information from CNV, methylation, mRNA, and miRNA profiles. Through clustering, the TCGA revealed three molecular subtypes of cervical cancer: SCC keratin-high, SCC keratin-low and adenocarcinoma. Differences observed in the three major subtypes included the enriched expression of some genes such as *PIK3CA*, *ADH7* and *SPRR3* in the SCC keratin-high compared with the SCC keratin-low cluster; more frequent CNVs including common *EGFR* amplifications in SCCs; a high number of aberrations in tumor-suppressor genes

¹Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil. ²Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil. ³Department of Gynecologic Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil. ⁴Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal. ⁵3B's—PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.M.R. (email: ruireis.hcb@gmail.com)

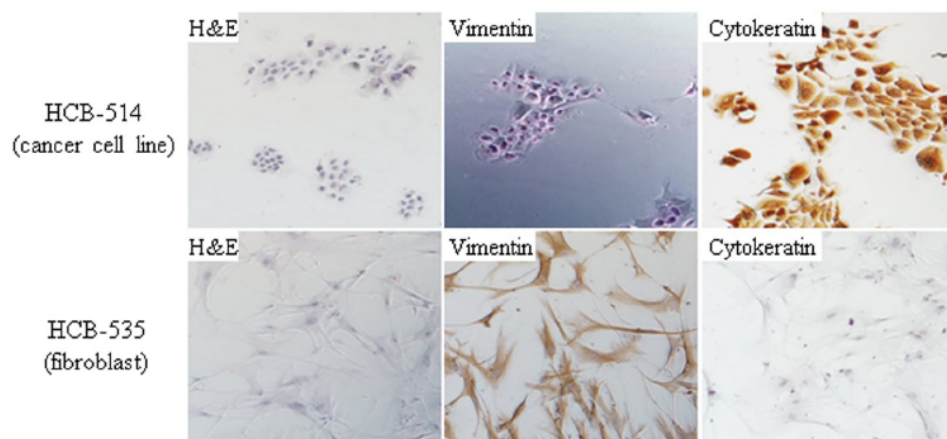


Figure 1. Representative images of immunocytochemistry of cervical cancer cell line HCB-514 (top images) and the fibroblast cells (HCB-535) (bottom images). All pictures were taken at 100x magnification.

Regions	Blood	Tumor	HCB-514
Amelogenin	X	X	X
CSF1PO	10,12	10,12	12
D13S317	9,11	9,11	9,11
D16S539	9	9	9
D5S818	10,12	10,12	10
D7S820	11,13	11,13	13
THO1	7,9	7,9	7,9
TPOX	8,12	8,12	8,12
WA	16	16	16

Table 1. STR profile of cell culture, blood and frozen tissue of the patient.

related with TGF- β pathway in adenocarcinomas including *SMAD4* and *TGFBR2* deletions, and increased DNA methylation in adenocarcinomas^{4,5}.

Cervical cancer treatment is based on the stage of disease. For early stage disease, surgery is the primary treatment modality, cure rates are high, and 5-year overall survival is up to 92%⁶. For advanced disease, which includes recurrent or metastatic disease, the mainstay of therapy is chemoradiation with a platinum-based agent and unfortunately, treatment responses are poor⁷. To improve outcomes for patients with advanced disease, recent findings on the molecular profile of this tumor type is valuable.

To facilitate the discovery of new antineoplastic agents, many research centers and teams have been carrying out screenings with a multitude of compounds, testing them in *in vitro* models, using immortalized human cancer cell lines⁸. This approach provides controlled conditions to evaluate the efficacy of drugs, and enables the unrestricted availability of human source material. However, there is a very low number of cervical cancer cell lines commercially available in comparison with other tumors, such as breast and lung tumors, which currently provides a limited representation of known subtypes and tumor heterogeneity. Therefore, the aim of this study was to establish and to characterize a new human cervical tumor cell line derived from a Brazilian patient.

Results

Clinical characterization and establishment of a primary cell culture. From March 2016 to June 2017, 35 cervical tumor biopsies were processed (Suppl. Table 1). Only one (2,9%) of the cell cultures, named HCB-514, survived for more than 12 months and continued to grow after several freeze-thaw cycles. This cell line was derived from a 30 year-old patient diagnosed with stage IIB squamous cell carcinoma of the cervix. The patient was treated with concurrent chemoradiation with cisplatin from October 10 to November 17, 2016, and was disease-free through her most recent follow-up appointment, on April 25, 2018. The cell culture HCB-514 grew attached to the flask, with cells forming an irregular island pattern with a cobblestone morphology, characteristic of epithelial cells (Fig. 1). When the cell line became confluent, cells were frozen in 5% DMSO in fetal bovine serum (FBS) solution in liquid nitrogen for further assays. After the fourth passage, immunophenotypic characterization was performed. The HCB-514 cell line presented stable outgrowing for more than 6 months, reaching 26 passages, and it was HPV-positive, supporting a spontaneous immortalization process. The cell line was negative for mycoplasma, and a short tandem repeat (STR) analysis showed that the HCB-514 cell line, tumor tissue and peripheral blood shared the same markers, confirming cell line identity (Table 1).

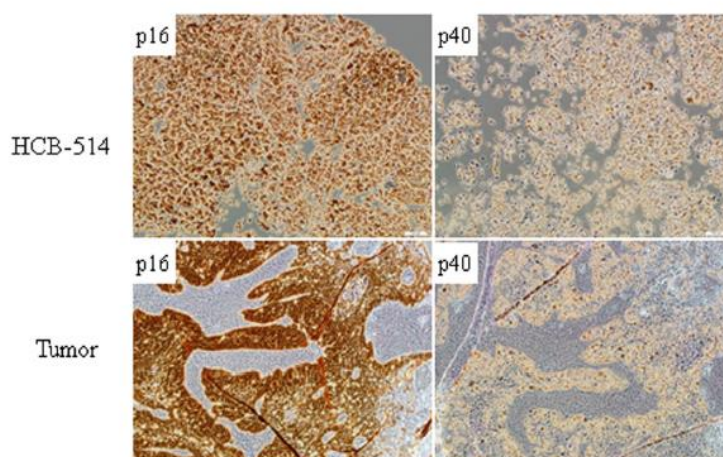


Figure 2. Representative immunohistochemistry images of HCB-514 cell block slices (top images) and the tumor patient tissue (bottom images) depicting expression of p16 (cervical cancer marker) and p40 (squamous cell carcinoma marker). All pictures were taken at 100x magnification.

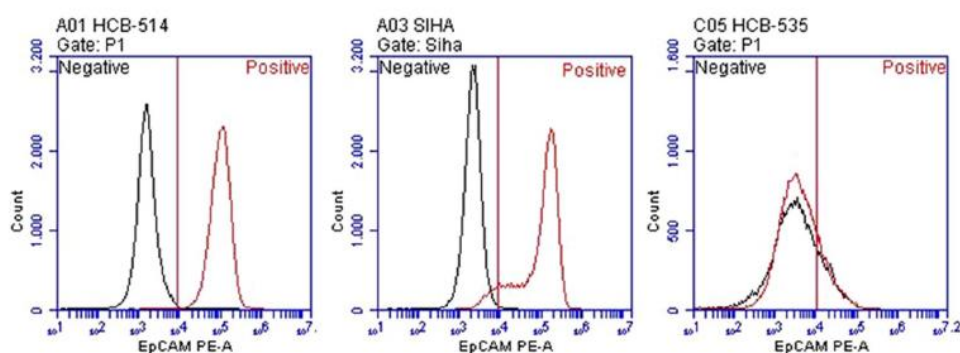


Figure 3. Evaluation of epithelial cellular adhesion molecule (EpCAM) expression in HCB-514. HCB-514 (left), SiHa (center) and HCB-535 (right) cell lines were stained with antibody anti-EpCAM and evaluated in flow cytometry. SiHa, a fibroblast cell line (HCB-535) were used as positive and negative controls, respectively. Black graphs represent unstained cells; red graphs represent stained cells.

Immunophenotypic characterization. Immunocytochemistry of HCB-514 showed strong cytokeratin expression, but no vimentin expression, similar to SiHa, indicating that HCB-514 is an epithelial cell line (Fig. 1). On the other hand, HCB-535 fibroblast presented the opposite staining pattern, with strong vimentin expression but no cytokeratin expression (Fig. 1). Furthermore, immunohistochemistry from HCB-514 cell block was in accordance with the expression pattern of formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tumor tissue taken in parallel from the patient at the time of biopsy. Both HCB-514 and FFPE tumor tissue were positive for p40, a squamous cell marker, and p16, a marker for cervical cancer (Fig. 2), confirming its squamous cell origin.

In addition, flow cytometry analysis showed high expression of EpCAM in HCB-514, with 100% of cells staining positive. Expression of EpCAM was present in 92% of SiHa cells and in 19% of the fibroblast cell line (Fig. 3).

Doubling-time. The growth curve for HCB-514 during exponential cell growth showed a doubling time of 18 h in 10% FBS media, and 24 h in 5% FBS media. To evaluate whether this growth was faster or slower than other cell lines largely used for *in vitro* assays, SiHa was also evaluated and showed a doubling-time of 17 h in 10% FBS media and 21 h in 5% FBS. Thus, the time was similar among cell lines, with a faster doubling-time in 10% than in 5% media (Fig. 4).

HPV status and genotyping. HPV infection is present in almost all cervical tumors, therefore we evaluated the presence of the virus in the HCB-514 cell line. For this purpose, GP5+/GP6+ primers were used to amplify the highly conserved region of the HPV L1 gene by PCR. The band correspondent to this region was found in HCB-514, confirming the presence of HPV (Suppl. Fig. 1a). To identify which high-risk HPV type was present, a genotyping test was performed with the COBAS[®] HPV assay, confirming HPV type 16. Furthermore,

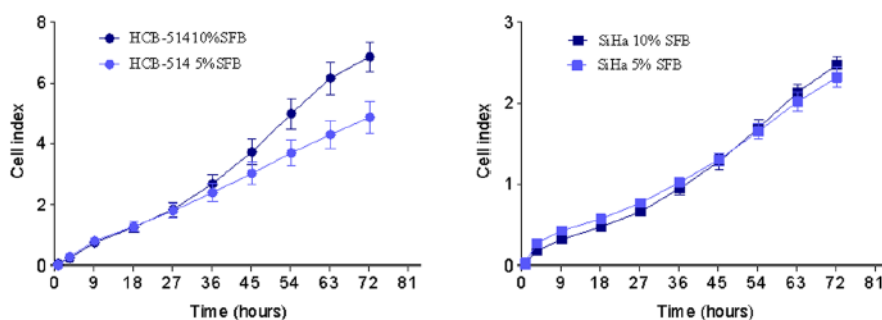


Figure 4. Growth curves of HCB-514 obtained from real time impedance-based technology cell analyzer system (xCELLigence). Different media conditions were assessed. Data represent the mean of 3 independent experiments done in duplicate.

Chromosome	Position	Gene	Reference allele	Variant allele	Aminoacid	Zygoty
1	228335177	GUK1	C	T	p.R129W	Heterozygous
2	69049563	ARHGAP25	G	A	p.G431E	Heterozygous
5	140793112	PCDHGA10	G	A	p.E124K	Heterozygous
7	77408339	RSBN1L	A	C	p.K799Q	Heterozygous
9	101900171	TGFBR1	C	T	p.A202V	Heterozygous
10	51130414	PARG	G	A	p.L59F	Heterozygous
12	99194813	ANKS1B	C	G	p.E1053Q	Heterozygous
12	109201563	SSH1	G	A	p.R193W	Heterozygous
13	32945095	BRCA2	G	A	p.W2830*	Heterozygous
15	39874463	THBS1	G	A	p.R46H	Heterozygous
15	43545745	TGM5	G	A	p.R215W	Heterozygous
19	41084418	SHKBP1	G	A	p.R129W	Heterozygous
20	4163484	SMOX	G	A	p.G431E	Heterozygous
20	23066708	CD93	G	A	p.E124K	Heterozygous
21	47421214	COL6A1	G	C	p.K799Q	Heterozygous
22	17590484	IL17RA	C	G	p.A202V	Heterozygous
22	19213831	CLTCL1	C	T	p.L59F	Heterozygous
X	49105196	CCDC22	G	T	p.E1053Q	Heterozygous

Table 2. Somatic non-silent mutations found in both HCB-514 and tumor.

to confirm that HPV16 infection was present, we evaluated and confirmed the presence of E6 oncoprotein, an important protein responsible for HPV oncogenicity (Suppl. Fig. 1b).

Furthermore, WES allowed us to determine whether the HPV genome integrated into host genomic DNA of HCB-514 and in primary tumor. The results showed two integration sites, one into the *MICU2* and the other into *CDH13* genes, the last being also found in the WES of patient's primary tumor.

Moreover, it is hypothesized that HPV genetic variation co-evolves with hosts of certain ethnic groups, which influences disease development and outcome⁸. Therefore, to identify the variant of HPV in HCB-514 and in the primary cervical cancer, phylogenetic analysis was performed. Both the HCB-514 cell line and the patient's primary tumor showed the presence of the sublineage HPV16 A1 (Suppl. Fig. 2).

HCB-514 and tumor mutational profile. The WES analysis of paired cell line/blood revealed 520 somatic mutations. The analysis of the most significant non-silent mutations identified 93 mutated genes (Suppl. Table 3), such as *HPS-3*, *IRX2*, *XPO5*, *CBWD1*, *TGFBR1*, *CUBN*, *TRHDE*, *BRCA2*, *THBS1*, *TGM5*, *CCDC22*, which were previously described as pathogenic, or likely pathogenic in tumors (Suppl. Table 3).

Regarding the analysis of paired primary tumor/blood, 863 mutations were found, with 68 non-silent mutations identified (Suppl. Table 4). Among them, 18 mutations were shared with HCB-514 (Table 2), including mutations in the *BRCA2*, *TGFBR1*, *CCDC22* and *SHKBP1* genes.

Several studies have reinforced the putative impact of APOBEC family of cytidine deaminases enzymes in altered nucleotides found in cervical cancer⁹. Therefore, mutational signatures from cell line and tumor were analyzed. Both samples showed similar mutation signatures, with C to A and C to T being the most predominant (Suppl. Fig. 3).

The *BRCA2* mutation (p.W2830*) identified was further confirmed by Sanger sequencing (Fig. 5).



Figure 5. IGV image from the whole-exome sequencing (WES) result of *BRCA2* gene (left) and electropherogram of exon 20 from *BRCA2* gene that harbors mutation (G → A) (right).

Copy number variation. Nanostring analysis for CNV was performed for both the cell line and constitutive DNA. Among all evaluated genes, 44 somatic alterations were discovered, including 30 regions with amplification, containing genes such as *MYC*, *TP53*, *EGFR*, *TERT*, *AKT3*, *MAPK7*, *BIRC2*, *YAP1* and 14 losses, containing genes including *KIT*, *RB1*, *BRCA2* and *APC* (Tables 3 and 4).

To expand the analysis beyond the 87 genes of the NanoString panel, CNV was also investigated from WES data. The WES showed 64 chromosomal regions harboring a large number of genes with CNV. There were 30 amplified regions, with 9 of them presenting high amplification, harboring genes such as *MYCN*, *ALK*, *PIK3CA*, *BIRC3*, *ERCC4* and *PALB2* (Table 3). Deletions were found in 34 regions, harboring genes such as *MLH1*, *PDGFRA*, *APC*, *MET* and *RB1*. Homozygous deletions were found in 5 regions (Table 4).

Many of the amplified genes identified are related with PI3K-AKT and MAPK signaling pathways. Other altered regions harbored genes mostly related with the DNA repair process, apoptosis and transcriptional factors. Moreover, the cell line presented alterations in tyrosine-kinase receptors, such as *EGFR* and *ALK* amplification and *PDGFRA* and *MET* deletion.

Regarding the CNV present in patient's primary tumor, the number of CNVs was reduced compared with the HCB-514 cell line, with 4 amplification regions and 10 deletion regions. Again, both primary tumor and cell line shared some of these alterations, such as *MYCN* and *ALK* amplification and *PDGFRA*, *KIT*, *IL2*, *FBXW7*, *MET* and *ATM* deletion (Suppl. Table 4). Figure 6 summarizes CNV in the HCB-514 cell line and primary tumor.

Phospho-RTK expression. The characterization of RTK expression in HCB-514 revealed basal protein levels of activated EGFR and ROR2 (Fig. 7a, top). Upon EGF stimulation, the only new receptor activated was ALK (Fig. 7a, bottom). Activation of EGFR was also confirmed by the presence of phosphorylated EGFR in *Western blot* analysis (Fig. 7b), with 3.5-fold more expression in HCB-514 than in SiHa (Fig. 7c).

Response to Cisplatin. To evaluate the sensitivity of HCB-514 to the chemotherapeutic agent cisplatin, commonly used in clinical practice for cervical cancer treatment, HCB-514 was treated for 72 hours and a MTS assay was performed. The response to cisplatin was dose-dependent and the inhibitory concentration for 50% cells (IC_{50}) value for HCB-514 was $3 \pm 0.42 \mu\text{M}$, while IC_{50} value for SiHa was $39 \pm 4.07 \mu\text{M}$, a 13-fold increase (Fig. 8).

Discussion

Cancer cell lines are unique tools for understanding biology and tumor response. At present, immortalized cervical cancer cell lines available in major cell repositories, including ATCC or ECACC, represents only six cervical cancers (not considering HeLa-derived cell lines), not reflecting the whole spectrum of cervical cancer biological heterogeneity, neither representing patients from South America.

In the present study, we successfully established a cervical cancer cell line, HCB-514, out of 35 attempts - a successful rate of 3%. It is difficult to establish cervical cell lines, with success rates ranging from 11–30%, which may explain the reduced number of new cell lines^{9–12}.

Not all mechanisms of continuous cell growth *in vitro* are known, but, at least for HPV-positive cervical cancers, the presence of papillomavirus E6/E7 expression is an important requirement¹². Importantly, the HCB-514 cell line was HPV-16 positive and expressed E6 oncoprotein. Moreover, in our cell line and respective primary tumor, we showed that HPV integrates into the *CDH13* gene. This gene negatively regulates keratinocyte proliferation and has been reported as one of the integration-targeted cellular genes (ITGs) in cervical cancer¹³. Although the role of these ITGs in carcinogenesis is not completely understood, it is suggested that ITGs modulate the expression of nearby genes through a long-distance chromatin interaction mechanism¹³. In addition, we used phylogenetic analysis to confirm the HPV16 A1 variant in both HCB-514 and primary tumor. This variant has been correlated with a high risk of precancer and cancer in Caucasian women¹⁴.

The molecular characterization of the HCB-514 cell line showed mutations in important cancer-related genes, yet exhibited a distinct profile compared to the profile for cervical squamous cell carcinomas recently reported by TCGA⁴. One of the mutated genes, *BRCA2*, is a well-known hereditary breast cancer gene that encodes a protein related to DNA damage repair during homologous recombination¹⁵. Mutations in *BRCA2* occur in approximately

Chromosome Region	CNV	Cytoband	Cancer genes
chr1	Amplification	p36.33; q32.1	
chr1	High amplification	q32.1 - q43	<i>H3F3A, FH</i>
chr1	Amplification	q43 - q44	<i>AKT3</i>
chr2	High amplification	p25.3 - p22.3	<i>MYCN, C2orf44, NCOA1, DNMT3A, ALK</i>
chr2	High amplification	p22.3 - p21	<i>EML4</i>
chr2	Amplification	p21 - q33.1	<i>MSH2, MSH6, FBXO11, BCL11A, REL, XPO1, IGL@, TTL, PAX8, ERCC3, CHN1, HOXD13, HOXD11, NFE2L2, PMS1, SF3B1</i>
chr2	Amplification	q37.3	
chr3	High amplification	q11.1 - q26.1	<i>TFG, CBLB, GATA2, RPN1, FOXL2, WWTR1, GMPS, MLF1</i>
chr3	High amplification	q26.1 - q29	<i>EVII, PIK3CA, SOX2, ETV5, EIF4A2, BCL6, LPP, DCUN1D1, PRKCI</i>
chr3	High amplification	q29	<i>TFR3</i>
chr5	Amplification	p15.33 - p11	<i>IL7R, LIFR, SKP2, TERT</i>
chr6	Amplification	q12	
chr7	Amplification	p22.3 - q11.21	<i>CARD11, PMS2, ETV1, HNRNPA2B1, HOXA9, HOXA11, HOXA13, JAZF1, IKZF1, EGFR</i>
chr8	Amplification	p23.3 - q24.3	<i>PCMI, WRN, WHSC1L1, FGFR1, HOOK3, TCEA1, PLAG1, CHCHD7, NCOA2, HEY1, COX6C, EXT1, MYC, NDRG1, RECQL4, C8orf33, C8orf4</i>
chr9	Amplification	q32	
chr11	Amplification	q12.3 - q13.4	<i>MEN1, CCND1, ORAOV1, FADD</i>
chr11	Amplification	q13.4 - q22.1	<i>NUMA1, PICALM, MAML2, GAB2, YAP1</i>
chr11	High amplification	q22.1 - q22.3	<i>BIRC2, BIRC3</i>
chr12	Amplification	p13.33	
chr12	Amplification	q23.1 - q24.33	<i>ALDH2, PTPN11, BCL7A</i>
chr14	Amplification	q11.1 - q32.33	<i>BCL2L2, CCNB1P1, TRA@, NKX2-1, NIN, KTN1, GPHN, TSHR, TRIP11, GOLGA5, DICER1, TCL6, TCL1A, BCL11B, AKT1, IGH@</i>
chr15	Amplification	q21.3 - q26.3	<i>IGF1R, FLJ27352, TCF12, PML, NTRK3, IDH2, CRTCL3, BLM</i>
chr16	Amplification	p13.3	
chr16	High amplification	p13.3 - p11.2	<i>TSC2, CREBBP, CIITA, SOCS1, TNFRSF17, ERCC4, MYH11, PALB2, IL21R, FUS</i>
chr17	Amplification	p13.3 - q11.2	<i>MAPK7, YWHAE, USP6, TP53, PER1, GAS7, MAP2K4, NF1, SUZ12</i>
chr18	High amplification	p11.31	
chr18	Amplification	p11.31 - p11.23	
chr18	Amplification	p11.1 - q23	<i>DCC, ZNF521, SS18, MALTI, BCL2</i>
chr19	Amplification	p13.2	
chr20	Amplification	p13 - q13.33	<i>BCL2L1, NCOA3, AURKA, ZNF217, EEF1A2, ASXL1, MAFB, TOP1, SDC4, GNAS, SS18L1</i>

Table 3. Copy number amplification regions in HCB-514 cell line.

3% of cervical cancers according to the TCGA dataset www.cbioportal.org. Notably, there is limited knowledge of *BRCA2* mutational status in cervical cancer, and current literature focuses on germline mutations and its role on non-HPV related cervical cancers, mostly associated with hereditary syndromes^{16,17}. There are no functional studies about *BRCA2* mutation in cervical cancer. Interestingly, the pathogenic p.W2830* *BRCA2* mutation identified in HCB-514 has been identified in other cancers as a predictive marker for targeted therapies, such as PARP inhibitors; its role in cervical cancers remains unclear.

We also observed a mutation in the *TGFBR1* gene, which encodes a receptor that acts on the TGF- β signaling pathway. This pathway is also related to the *TGFBR2* gene, which is one of the most commonly mutated genes in cervical cancer⁴. When TGBR2 is activated by a TGF- β ligand, TGBR1, a serine/threonine kinase, is dimerized, leading to the cell cycle arrest of epithelial cells, control of mesenchymal cell proliferation and differentiation, and other cell processes related to growth suppression¹⁸. In this sense, TGF- β inhibitors, such as galunisertib, may emerge as a new approach for the treatment of cervical cancer in *TGFBR1*-mutated tumors¹⁹.

We also observed the presence of a mutation in the *IRX2* gene. The *IRX2* belongs to the iroquois homeobox gene family and encodes a transcription factor known to play multiple roles during embryo development²⁰. In breast cancer, low expression of *IRX2* has been observed and shown to be associated with the presence of disseminated tumor cells²¹. In this line, cell lines edited to overexpress *IRX2* exhibited lower cellular motility and reduced secretion of pro-metastatic chemokines²⁰. Moreover, the methylation of the *IRX2* promoter region has been correlated with pleural anthracosis disease in lung adenocarcinomas²². Controversially, in primary human osteosarcoma tissues, *IRX2* expression was observed to be significantly increased in comparison with normal tissues, and was significantly associated with tumor progression and prognosis²³. *In vitro* assays showed that *IRX2*

Chromosome Region	Event	Cytoband	Cancer genes
chr1	Deletion	p11.2 - q21.1	
chr2	Deletion	q33.1 - q37.3	<i>CREB1, IDH1, ATIC, FEV, PAX3, ACSL3</i>
chr3	Deletion	p26.3 - p12.3	<i>SRGAP3, FANCD2, VHL, PPARG, RAF1, XPC, MLH1, MYD88, CTNNB1, SETD2, BAP1, PBRM1, FHIT, MTF, FOXPI</i>
chr3	Deletion	q26.1	
chr4	Deletion	p16.3 - p16.1	<i>FGFR3, WHSC1</i>
chr4	Deletion	p16.1 - q22.1	<i>SLC34A2, PHOX2B, FIP1L1, PDGFRA, CHIC2, KIT, KDR</i>
chr4	Homozygous deletion	q22.1	
chr4	Deletion	q22.1 - q26	<i>RAP1GDS1, TET2</i>
chr4	Deletion	q26 - q35.2	<i>IL2, FBXW7</i>
chr5	Deletion	p15.33	
chr5	Deletion	q11.1 - q13.2	<i>IL6ST, PIK3R1</i>
chr5	Homozygous deletion	q13.2	
chr5	Deletion	q13.2 - q31.3	<i>APC</i>
chr5	Deletion	q31.3 - q35.3	<i>PDGFRB, CD74, ITK, EBF1, RANBP17, TLX3, NPM1, NSD1</i>
chr7	Deletion	q11.21 - q22.1	<i>SBDS, ELN, HIP1, AKAP9, CDK6</i>
chr7	Homozygous deletion	q22.1	
chr7	Deletion	q22.1 - q35	<i>MET, SMO, CREB3L2, KIAA1549, BRAF</i>
chr7	Deletion	q35 - q36.3	<i>EZH2, MLL3, SHH</i>
chr9	Homozygous deletion	p13.2 - p13.1	
chr9	Deletion	p13.1 - p12	
chr9	Homozygous deletion	p12 - p11.2	
chr9	Deletion	p11.2 - q13	
chr9	Deletion	q13	
chr9	Deletion	q21.11	
chr9	Deletion	q21.32	
chr11	Deletion	q22.3 - q25	<i>ATM, DDX10, POU2AF1, SDHD, PAFAH1B2, PCSK7, MLL, DDX6, CBL, ARHGAP2, FLII</i>
chr13	Deletion	q11 - q34	<i>CDX2, FLT3, BRCA2, LHFPL, LCPI, RBL, ERCC5, FOXO1, GPCS, IRS2</i>
chr18	Deletion	p11.32 - p11.31	
chr18	Deletion	p11.23 - p11.21	
chr18	Deletion	p11.21	
chr19	Deletion	q13.42	
chr21	Deletion	q11.2 - q22.12	<i>OLIG2, RUNX1</i>
chr21	Deletion	q22.2 - q22.3	<i>TMPRSS2, U2AF1</i>
chrX	Deletion	q24	

Table 4. Copy number deletion regions in HCB-514 cell line.

upregulated MMP-9 and VEGF in a PI3K/AKT-dependent manner, and that knockdown of IRX2 in osteosarcoma cell lines inhibited cell proliferation and invasion^{23,24}.

Another gene of interest that was mutated in both the HCB-514 cells and patient's tumor tissue was *SHKBP1*. Recently, *SHKBP1* was identified in the cervical cancer TCGA, as a significantly mutated gene in this tumor type⁴. Overexpression of *SHKBP1* in cell lines led to a strong delay in the degradation of EGFR upon EGF activation²⁵. This process occurred due to competitive binding of *SHKBP1* with protein c-Cbl, thereby interrupting the complex c-Cbl-CIN85, which is responsible for endocytosis of EGFR containing vesicles²⁵.

According to TCGA, an average of 88 somatic CNV was found per cervical tumor, including 26 amplifications, 37 deletions and 26 alterations in whole chromosome arms⁴. The HCB-514 cell line presented 30 amplifications and 34 deletions, showing 64 alterations in total. Among these CNVs, *EGFR* and *YAP1* genes were amplified in the HCB-514 cell line. Both amplifications have already been described as recurrent in cervical cancer⁴. In addition, to confirm the biological impact of *EGFR* gene amplification we analyzed and observed EGFR protein phosphorylation in the HCB-514 cell line. Interestingly, blocking the EGFR tyrosine-kinase protein is an effective approach to treat specific types of tumors, including colorectal, head and neck and lung cancers²⁶.

In cervical cancer, a phase II clinical study with EGFR inhibitor Erlotinib showed that administering it prior to receiving the standard of treatment (cisplatin concurrent with radiotherapy) was safe and showed significant antitumor activity²⁷. In addition, a recent study demonstrated a promising effect of lapatinib (anti-EGFR and

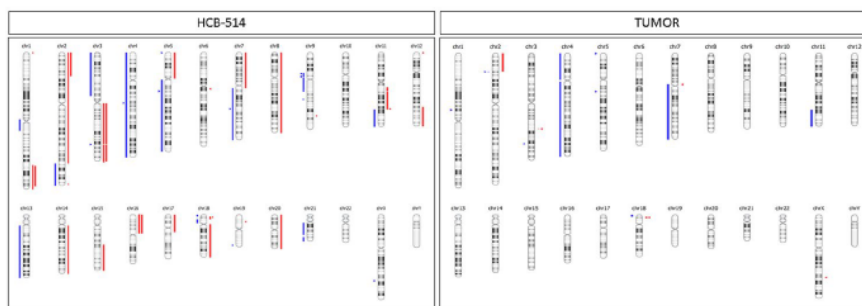


Figure 6. Copy number variations from whole-exome sequencing (WES) of HCB-514 (left) and tumor (right) were compared with patient's blood DNA. Amplifications are shown in red markers and deletions in blue markers.

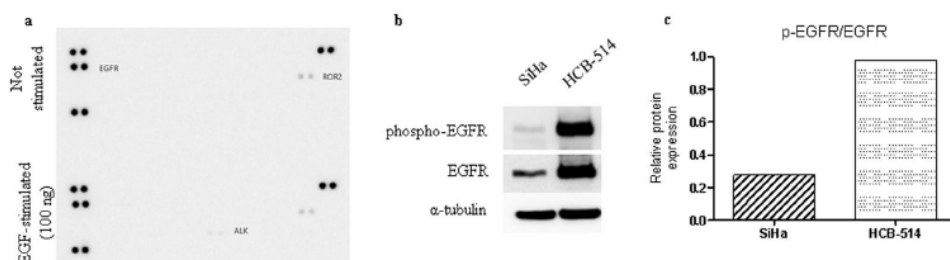


Figure 7. (a) Phospho-RTK arrays of HCB-514 were done at basal conditions (up) and upon EGF-stimulation (down). Each RTK is represented in duplicate in the arrays (two spots side-by-side), and three pairs of phosphotyrosine positive controls are located in the corners of each array. (b) *Western blot* of EGFR phosphorylation, showing the different amount of phospho-EGFR and total EGFR compared to the SiHa cell line. Alpha-tubulin was used as endogenous control. (c) Quantification of phospho-EGFR normalized with total EGFR.

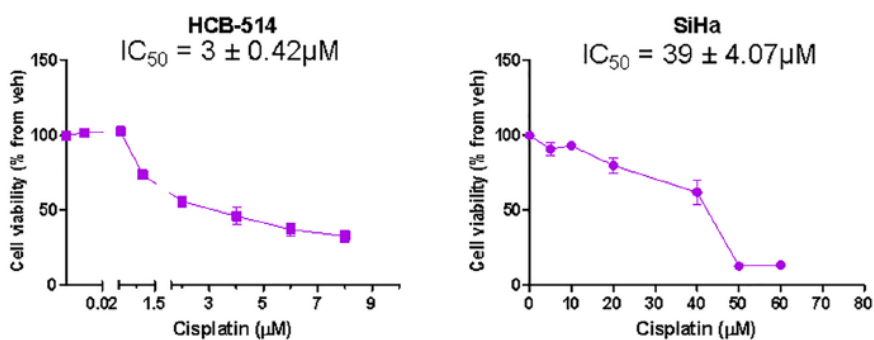


Figure 8. Cell viability of HCB-514 and SiHa after 72 h of cisplatin treatment. Results were obtained using the MTS assay. Data represent a mean of 3 independent experiments done in triplicate.

HER-2), in HER-expressing cervical cancer cells by reducing the number and size of blood vessels and preventing increased HIF-1 α levels²⁸. Regarding YAP1, the protein encoded by *YAP1* gene, it is negatively regulated by the Hippo signaling pathway, and its enhanced activity is believed to induce cell proliferation, migration and survival in several cancer types including cervical cancer^{29,30}. Increased activity of YAP1 can occur after TGF α and amphiregulin inhibit the Hippo signaling via EGFR³⁰. Furthermore, *YAP1* seems to play a key role in TGF- β 1-induced apoptosis and EMT through EGFR regulation³⁰. In cervical cancer, *YAP1* was amplified in the EMT cluster samples from TCGA data highlighting the potential role of this gene in EMT-related tumor progression⁴. However, more functional studies on *YAP1* amplification need to be conducted to elucidate its role in cervical cancer.

Finally, we showed the sensitivity of HCB-514 to cisplatin, in line with the patient's clinical response to cisplatin (with concurrent radiotherapy).

In conclusion, the molecular profile of the novel Brazilian cervical cancer cell line HCB-514 reveals disruption of several key cellular pathways, such as PI3K-AKT, MAPK signaling, DNA repair, apoptosis, transcriptional factors and RTK. This new HPV-16 positive cervical cancer cell line constitutes an important model to better understand the cancer biology of cervical cancer and offers an additional promising tool for cervical cancer pre-clinical studies.

Materials and Methods

Establishment of cervical cancer cell lines. Blood and tumor tissue samples were collected from participants with cervical cancer during routine visits in the Gynecologic Oncology Department of BCH after informed consent was obtained. The collected tumor tissue was maintained in PBS buffer in the refrigerator until processing, which occurred before 24 hours. The sample was initially placed in a petri dish and fragmented with scalpels and incubated for 30 min at 37 °C in a 15 mL falcon containing 5 mL of an enzymatic solution (0.14% collagenase type I [Sigma, Brazil] and 0.01% DNase [2,000 kilounits/mg] [Sigma]) in RPMI 1640 as previously described³¹. Then, RPMI medium was supplemented with 1% penicillin and streptomycin (P/S; Sigma) and 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma) was added to inactivate the enzyme. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in FAD media³² adapted by Dr. Matias Melendez (personal communication), which was comprised by three parts of Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM; Sigma) to one part Ham's F12 media (F12; Sigma). The media was then supplemented with 1% P/S, 0.4 µg/mL hydrocortisone, 2.5 µg/mL insulin, 13 ng/mL liothyronine, 5 µg/mL transferrin, 2.5 µg/mL insulin and 0.1 µg/mL cholera enterotoxin and 5% FBS (all supplements were purchased from Sigma). Cells were maintained in a T25 flask at 37 °C, 5% CO₂. One week after processing, the media was replaced and cell growth was monitored. Controlled trypsinizations were done to preferentially remove the contaminating fibroblasts. Afterwards, the culture media was replaced every 72 h and the cell culture was routinely subcultured once it was confluent. Stock vials were frozen in FBS + 5% DMSO solution for storage in liquid nitrogen. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and were approved by the Ethics and Research Committee from Barretos Cancer Hospital (BCH) (985/2015 - CAAE 1,252,699).

Cell lines. For molecular and functional characterization, the immortalized cervical squamous cell carcinoma cell lines, SiHa, was kindly provided by Dr. Luisa Villa (INCT-HPV, Brazil) and a human short-term primary culture of lung fibroblast, named HCB-535, was obtained from BCH. SiHa was grown in DMEM media supplemented with 1% P/S and 10% FBS and HCB-535 in RPMI media supplemented with 1% P/S and 10% FBS.

Immunophenotypic characterization. To confirm cell origin, immunocytochemistry was performed with antibodies against vimentin (positive for fibroblasts) and cytokeratin (positive for epithelial cells). When cells reached the fourth passage, they were plated in a 24-well plate (5×10^5 in 3 DMEM:1 F12 media + 5% FBS) and, upon reaching 80% confluence, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, washed 3 times with PBS, permeabilized with Triton X-100 (0.1% in water) for 4 min and washed as described. Endogenous peroxidase activity was inhibited for 10 min with H₂O₂ (3% in methanol). Blockage for non-specific labeling was performed through incubation with 50 µL of the Ultra V Block reagent (Thermo Scientific detection kit) for 10 min and, after washes, primary antibodies cytokeratin AE1/AE3 (Dako, ready to use) or vimentin (Dako, ready to use), incubation was done for 60 min and then washed. A biotinylated goat polyvalent antibody incubation for 10 min was performed, followed by washing. Streptavidin peroxidase incubation was next performed for 10 min and washed. Afterwards, the DAB chromogen (ThermoFisher Scientific) was applied for 10 min for staining. Finally, hematoxylin was used for counterstaining and the cells were photographed with a photographic camera coupled to a microscope (Olympus). The immortalized cell line SiHa, a grade II squamous cell carcinoma and HPV-16 positive, was used as a positive control for the cytokeratin and HCB-535 was used as positive control for vimentin.

The markers p40 (Biocare Medical, dilution 1:100) and p16 (Roche, Ventana Systems, ready to use), commonly used in the routine pathology for determination of cervical cancer histology subtype³³, were evaluated by immunohistochemistry in the cell block of the new cervical cancer cell line established in this work and in FFPE tumor tissue from the cervical cancer patient. Moreover, expression of EpCAM (CD326, BD Biosciences)³⁴, another marker of cervical carcinoma cells, was analyzed in the HCB-514 cell line by flow cytometry. Briefly, 5×10^5 cells were harvested, washed twice in BSA 0,2% in DPBS (centrifugation between the washes was 1500 rpm for 5 min), then 10 µL of EpCAM PE-conjugate were added and incubated for 20 min. Afterwards, cells were washed and analyzed by flow cytometry (Accuri BD). SiHa was used as positive control for EpCAM expression and HCB-535 was used as negative control.

Cell line doubling-time. Growth characteristics of the cell line were analyzed by doubling-time evaluation. Doubling-time was determined through real time impedance-based technology cell analyzer system (RTCA, xCELLigence, Roche), according to manufacturer's instructions. Firstly, 5,000 cells were plated into E-plate (xCELLigence, Roche) and proliferation rate was evaluated for 72 h. The new cervical cancer was maintained in supplemented media above described in establishment section, with 5% FBS or 10% FBS. SiHa was maintained in DMEM 1% P/S and 5 or 10% FBS. This assay results in a cell index, which considers cell viability, cell number, morphology and adhesion. At the end of assay, a cell growth curve is produced and the doubling-time was calculated from the selected interval, which is basically the interval selected when the cell index doubled inside the log-phase³⁵.

DNA isolation. For molecular characterization, DNA was isolated from 1×10^6 tumor cell pellet in the sixth passage using silica column from Biopur Mini Spin Plus 250 Extraction kit (Biopur), as described by the

manufacturer. Blood total DNA was automatically isolated from buffy coat of patient through Mini Kit DNA and Qiasymphony instrument (both from Qiagen) at BCH Biobank Department, according to the manufacturer. This technology combines silica-based extraction with magnetic particles purification. The protocol Blood 200 with an elution volume of 50 μ L was used. Tumor DNA was isolated from a biopsy sample obtained from the patient through the Mini Kit DNA and Qiasymphony instrument (Qiagen). For tumor-isolated DNA, macrodissection was performed by an experienced pathologist and up to 25 mg of the sample containing at least 60% tumor area and up to 20% necrosis area were fragmented and submitted to digestion and homogenization procedures, according to the manufacturer's instructions. The protocol Tissue 200 with an elution volume of 50 μ L was used.

All DNA samples were quantified by both NanoDrop[®] 2000 (Thermo Scientific) and Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Life Technologies) and were then stored at -20°C for further genetic analysis. Blood DNA was used as reference to distinguish somatic from germline mutations.

Assessment of human papilloma virus (HPV). The presence of HPV in HCB-514 cell line was evaluated by in house PCR using GP5+ and GP6+ primers, able to amplify a fragment of ~142 pb of the HPV conserved region L1³⁶. For this, it was used 5 μ L of DNA extracted from HCB-514, 20 mM of Tris-HCl buffer (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.25 U of Platinum Taq DNA polymerase, 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 0.6 μ M of each primer (GP5+ and GP6+). Amplifications were performed in the equipment Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) and the cycle was as described: 94 $^{\circ}\text{C}$ for 4 min followed by 40 cycles of 1 min at 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min at 40 $^{\circ}\text{C}$, and 1 min 30 seg at 72 $^{\circ}\text{C}$. Then, a cycle of 72 $^{\circ}\text{C}$ for 7 min and the PCR products were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ before electrophoresis on a 2% agarose gel. DNA HPV-positive was used as positive control and water was used as negative control. PCR reagents were pursued from Invitrogen.

Moreover, the COBAS[®] 4800 HPV System (Roche) was used for genotyping HPV, according with manufacturer's instruction. This assay utilizes DNA target amplification through real time PCR to detect 14 high-risk HPVs in a single assay. It genotypes HPVs 16 and 18 and simultaneously detects other non-16 and 18 high-risk types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) as a pool result in cases of infection.

In addition, because E6 oncoprotein is required for the oncogenic transformation of HPV-infected cervical epithelial cells and the most common high-risk HPVs associated with cervical cancer are 16 and 18, the presence of their E6 oncoprotein was assessed through an immunochromatographic test, using OncoE6TM Cervical Test (Arbor Vita), according with manufacturer's instructions. Briefly, the lysate of 1×10^6 HCB-514 cells was incubated with monoclonal antibodies to oncoprotein E6 of HPV types 16 and 18 conjugated with alkaline phosphatase. Then, using a nitrocellulose test strip, this mix migrates up the test strip and if the protein is present, it is possible to observe a purple line in the strip. The position of the line indicates if E6 is from HPV-16 or HPV-18.

Cell line authentication by short tandem repeat (STR) profiling analysis. The STR analysis was carried out in DNA from cell culture, FFPE tumor tissue and blood from the patient as previously described for authenticity confirmation^{37,38}.

Whole exome sequencing (WES) analysis. The DNA from the HCB-514 cell line, the patient's primary tumor and paired blood sample were used for WES, with input of 50 ng on the Illumina HiSeq2500 System by a commercial company (Mendelics, São Paulo, Brazil). Sequence reads were aligned to the human reference genome build 37 (hs37d5-decoy) using BWA-MEM with Burrows-Wheeler Aligner version 0.7.10-r789³⁹. Duplicate reads were marked with Picard-Tools 1.92 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). MuTect version 1.1.4; (<http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>) and VarScan2⁴⁰ were used to call somatic SNVs and indels in tumor-normal pairs, respectively. MuTect was run using default parameters with files from COSMIC version 54 and dbSNP version 132 included as input^{41,42}. We used Ensembl Variant Effect Predictor (VEP)⁴³ to annotate and determine functional consequences of tumor specific variants. The results from SIFT, Polyphen-2, ClinVar were considered. It was also excluded variants that were likely to be germline, i.e., listed in ESP6500 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), 1000Genome or ExAC^{44,45}. The candidate mutations were validated visually using the Integrated Genomics Viewer (IGV)⁴⁶. Copy number abnormalities (CNA) were identified using Nexus Copy Number version 9.0 (BioDiscovery; El Segundo, CA; <https://www.biobase.com/products/Nexus-Copy-Number>) with default parameter for BAM ngCGH (matched) input with homozygous frequency threshold and value at 0.97 and 0.8 respectively, hemizygous loss threshold at -0.18 , single copy gain at 0.18 and high copy gain at 0.6.

Mutational signature was defined using the package SomaticSignatures of Bioconductor Software, as described by Gehring *et al.*⁴⁷.

Integration of HPV viral DNA into the human genome was performed through integration mode of the program HPVDetector, as previously described⁴⁸. The phylogenetic analysis of HPV sequence was performed using the fasta consensus sequences of HPV16 (one from tumor sample and the other from cell culture) obtained from deep sequencing and a group of HPV16 complete genome sequences retrieved from GenBank were aligned with Muscle⁴⁹ and edited with Se-AL v2.0a11 (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/sea/>). Phylogenetic reconstructions were performed by maximum likelihood (ML) criterion using RAxML version 8.0.0⁵⁰. The best fit model used for the ML reconstruction was GTR + Γ model without partitions. Node support was evaluated using 1,000 bootstraps cycles.

BRCA2 Sanger sequencing. To validate the mutation identified in WES in BRCA2, the HCB-514 cell and patient's blood DNAs were submitted to PCR amplification of BRCA2 exon 20, using Hot Start Taq enzyme (Qiagen), as described by Costa *et al.*⁵¹. After amplification, PCR products were purified with the ExoSap enzyme (USB Affymetrix), and submitted to sequencing protocol using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Kit (Applied Biosystems). Sequencing was performed in 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), as described by Fernandes *et al.*⁵².

Copy number variation analysis. HCB-514 chromosomal alterations were also analyzed by the Nanostring platform, using the nCounter[®] v2 Cancer CN Assay panel (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA). This panel counts the CNV of 87 involved genes commonly amplified or deleted in various cancers (www.nanostring.com/products/CNV). As control, the genomic DNA from the HCB-514 patient's peripheral blood was used. The DNA input was 600 ng for HCB-514, and 473 ng for peripheral blood.

The raw data was captured by the nSolverAnalysis Software v3.0[®] program (NanoString Technologies). For the normalization of the results, 54 probes were used for regions of the genome that do not usually present CNV. After the data normalization, the mean of the counts from the 3 probes per each gene was calculated and the number of copies per gene was calculated as previously described^{53,54}.

Human-receptor tyrosine kinase (RTK) array and Western blot. To characterize HCB-514 protein expression, the Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit (#ARY001, R&DSystems) was used, according to the manufacturer's instructions, and basal and epidermal growth factor (EGF)-stimulated protein expression were evaluated. Briefly, cells were grown in two T75 flask until confluence. Then, for EGFR stimulation, EGF diluted in 10 mL of free-serum media (final concentration 10 ng/mL) was firstly added to the cells and incubated for 15 min. After, proteins were collected using lysis buffer (50 mM Tris pH7.6–8, 150 mM, NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1% NP-40, and protease cocktail inhibitors) and 500 µg of protein lysates were incubated as previously described⁵⁵. Membranes were revealed with ECL Western Blotting Detection Reagents (RPN2109, GE Healthcare) and the chemiluminescent signal was detected by ImageQuant LAS 4000 mini documentation system (GE Healthcare).

For *Western blot*, protein lysates were separated in 8% SDS-PAGE gel, transferred, incubated in phospho-EGFR^{Y1068} (1:1000), EGFR (1:1000) or α-tubulin (1:2000) primary antibody and revealed, as detailed described by Silva-Oliveira *et al.*⁵⁶. Antibodies were purchased from Cell Signaling company.

Viability evaluation. The cell viability of the HCB-514 cell line to cisplatin was evaluated by MTS assay as previously reported³⁸. Briefly, 6,000 cells were plated in 96-wells, allowed to adhere, and then treated with a range from 0.01 to 8 µM of cisplatin (Sigma). After 72 h, the Cell Titer 96 Aqueous Cell Proliferation Assay (MTS reagent, Promega) was added and incubated for 3 h. Absorbance values were normalized with absorbance of DMSO 1%-treated cells and the IC₅₀ (inhibitory concentration for 50% cells) was calculated through non-linear regression.

Statistical analysis. GraphPad Prism was used to determine IC₅₀ in drug-response assays and to plot the cell index data from doubling-time assay and the relative protein expression from *Western blot* analysis.

Data Availability

Genetic data has been deposited at the European Genome-phenome Archive (EGA, <http://www.ebi.ac.uk/ega/>), which is hosted by the EBI, under accession number EGAS00001003343.

References

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. (Rio de Janeiro, Brasil 2014).
3. zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* **384**, 260–265 (2009).
4. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* **543**, 378–384 (2017).
5. Meijer, C. J. L. M. & Steenberg, R. D. M. Gynaecological cancer: Novel molecular subtypes of cervical cancer - potential clinical consequences. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 397–398 (2017).
6. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2018. Atlanta: American Cancer Society; 2018.
7. Wolford, J. E. & Tewari, K. S. Rational design for cervical cancer therapeutics: cellular and non-cellular based strategies on the horizon for recurrent, metastatic or refractory cervical cancer. *Expert Opinion on Drug Discovery* **13**(5), 445–457 (2018).
8. Sharma, S. V., Haber, D. A. & Settleman, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 241–253 (2010).
9. Javed, S. *et al.* Significance of CD133 positive cells in four novel HPV-16 positive cervical cancer-derived cell lines and biopsies of invasive cervical cancer. *BMC Cancer* **18**, 357 (2018).
10. Kelland, L. R., Burgess, L. & Steel, G. G. Characterization of four new cell lines derived from human squamous carcinomas of the uterine cervix. *Cancer Res.* **47**, 4947–4952 (1987).
11. Ku, J. L., Kim, W. H., Park, H. S., Kang, S. B. & Park, J. G. Establishment and characterization of 12 uterine cervical-carcinoma cell lines: common sequence variation in the E7 gene of HPV-16-positive cell lines. *Int. J. Cancer* **72**, 313–320 (1997).
12. Magaldi, T. G. *et al.* Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. *Virology* **422**, 114–124 (2012).
13. Zhang, R. *et al.* Dysregulation of host cellular genes targeted by human papillomavirus (HPV) integration contributes to HPV-related cervical carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **138**, 1163–1174 (2016).
14. Mirabello, L. *et al.* HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *J. Natl. Cancer Inst.* **108** (2016).
15. Nestic, K., Wakefield, M., Kondrashova, O., Scott, C. L. & McNeish, I. A. Targeting DNA repair: the genome as a potential biomarker. *J. Pathol.* **244**, 586–597 (2018).
16. Constantinou, P. & Tischkowitz, M. Genetics of gynaecological cancers. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **42**, 114–124 (2017).

17. March, J. et al. Cancer Associated with BRCA1 and BRCA2 Mutations other than Breast and Ovarian. *Cancer* **121**, 269–275 (2015).
18. Pasche, B., Pennington, M. L., Jimenez, H. & Wang, M. TGFBR1 and cancer susceptibility. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **125**, 300–312 (2014).
19. Herberich, S. et al. Clinical development of palmaricicb (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug. Discov. Des.* **9**, 4479–4489 (2015).
20. Werner, S. et al. Inositol hexoformin 2 suppresses cellular motility and chemokine upregulation in breast cancer cells. *BMC Cancer* **15**, 896 (2015).
21. Werner, S. et al. Suppression of early hematogenous dissemination of human breast cancer cells to bone marrow by retinoic Acid-induced 2. *Cancer Discov.* **5**, 508–519 (2015).
22. Sato, T. et al. Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissues. Its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Cancer* **135**, 319–324 (2014).
23. Liu, T. et al. Knockdown of RUC1 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by the Akt/EMMP9 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **10**, 169–174 (2014).
24. Liu, T. et al. RUC1-mediated upregulation of MMP-9 and VEGF in a PI3K/AKT-dependent manner. *Mol. Med. Rep.* **12**, 4348–4351 (2015).
25. Feng, L., Wang, J.-T., Jin, H., Qian, K. & Gong, J.-G. SH3BP1 binding protein 1 prevents epidermal growth factor receptor degradation by the interruption of c-Cbl-CIN85 complex SH3BP1 prevents EGFR degradation by the interruption of c-Cbl-CIN85 complex. *Cell Biochem. Biophys.* **70**, 589–596 (2011).
26. Sathyanarayana, P. et al. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 15–31 (2012).
27. Nogueira-Rodriguez, A. et al. Phase 2 trial of selastrol combined with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Cancer* **120**, 1187–1193 (2014).
28. Martins, O. et al. HER Family Receptors are Important Therapeutic Biomarkers for Cervical Cancer: Blocking Glucosyl Metabolism Enhances the Therapeutic Effect of HER Inhibition. *Theranostics* **7**, 717–732 (2017).
29. Ha, C. et al. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *JEMO Mol. Med.* **7**, 1435–1449 (2015).
30. Liu, Y. et al. YAP modulates TGF- β -induced simultaneous apoptosis and EMT through upregulation of the EGFR receptor. *Sci. Rep.* **7**, 45523 (2017).
31. Santin, A. D. et al. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J. Virol.* **73**, 5402–5410 (1999).
32. Wu, Y. J. et al. The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and nonkeratinizing epithelia. *Cell* **51**, 693–703 (1982).
33. Bergeron, C. et al. The clinical impact of using 16 (INK4a) immunohistochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int. J. Cancer* **136**, 2741–2751 (2015).
34. Eichler, C. E. et al. Primary cervical carcinoma cell lines overexpress epithelial cell adhesion molecules (EPCAM) and are highly sensitive to immunotherapy with MT201, a fully human monoclonal anti-EPCAM antibody. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **20**, 1440–1447 (2010).
35. Witzel, F., Fritsche-Guenther, R., Lohmann, N., Sieber, A. & Hiltlges, N. Analysis of impedance-based cellular growth assays. *Bioinformatics. Exp. Appl.* **31**, 2705–2712 (2015).
36. de Jonga-Huizen, A.-M., Walboomers, J. M. M., van den Brule, A. J. C., Meijer, C. J. L. M. & Snijders, P. J. F. The use of general primer GPs and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* **76**, 1057–1062 (1995).
37. Dieks, W. G., Fahrenrich, S., Estrella, J. A. J. & Drexler, H. G. Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. *ALTEX* **22**, 103–109 (2005).
38. Silva-Oliveira, R. J. et al. Cytotoxicity of aflitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker. *Cell. Oncol. Doord.* **38**, 253–263 (2016).
39. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics. Exp. Appl.* **26**, 589–595 (2010).
40. Koboldt, D. C., Larson, D. E. & Wilson, R. K. Using VarScan 2 for Germline Variant Calling and Somatic Mutation Detection. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **44**, 15.4.1–17 (2013).
41. Forbes, S. A. et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* **45**, 10777–10780 (2017).
42. Sherry, S. T. et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 308–311 (2001).
43. McLaren, W. et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* **17**, 122 (2016).
44. 1000 Genomes Project Consortium. et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
45. Lek, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 61,708 humans. *Nature* **526**, 285–291 (2016).
46. Robinson, J. T. et al. Integrative Genomics Viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).
47. Gohring, J. S., Fischer, E., Lawrence, M. & Huber, W. Somatic Signatures: Inferring mutational signatures from single-nucleotide variants. *Bioinformatics* **31**, 3673–3675 (2015).
48. Chandrasekhar, P. et al. NGS-based approach to determine the presence of HPV and their sites of integration in human cancer genome. *Br. J. Cancer* **112**, 1958–1965 (2015).
49. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
50. Stamatakis, A., Ludwig, T. & Meier, H. RAxML-III, a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics. Exp. Appl.* **21**, 456–463 (2005).
51. Costa, J. L. et al. Nonoptical Massive Parallel DNA Sequencing of BRCA1 and BRCA2 Genes in a Diagnostic Setting. *Hum. Mutat.* **34**, 628–635 (2013).
52. Fernandez, G. C. et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget* **7**, 80465–80481 (2016).
53. Alm, S. et al. A cCounter CNV Assay to Detect HER2 Amplification: A Correlation Study with Immunohistochemistry and In Situ Hybridization in Advanced Gastric Cancer. *Mol. Diagn. Ther.* **20**, 375–383 (2016).
54. Norton, N. et al. Assessment of Tumor Heterogeneity, as Evidenced by Gene Expression Profiles, Pathway Activation, and Gene Copy Number, in Patients with Multifocal Invasive Lobular Breast Tumors. *PLoS One* **11**, e0153411 (2016).
55. Martins, O. et al. In Vitro and In Vivo Analysis of RTK Inhibitor Efficacy and Identification of Its Novel Targets in Glioblastomas. *Transl. Oncol.* **6**, 187–196 (2013).
56. Silva-Oliveira, R. J. et al. Akt can modulate the in vitro response of HNSCC cells to irreversible EGFR inhibitors. *Oncotarget* **8**, 53286–53301 (2017).

Acknowledgements

The authors would like to thank Barretos Cancer Hospital Research Support Department (NAP) for sample collection, Barretos Cancer Hospital Biobank for sample processing, Dr. Flávia de Paula and Gabriela Fernandes for technical support of STRs and *BRCA2* Sanger validation, respectively, and Dr. Laura Musselwhite (Duke University) for revising the manuscript. This study was supported by grants from the FINEP (MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT-01/2013 - FPXII- BIOPLAT - Process number 01.13.0469.00) and Barretos Cancer Hospital. PhD scholarship from FINEP (Grant numbers 384088/2014-7 and 380434/2015-6) and Barretos Cancer Hospital to MNR. Post-doctoral scholarship from FINEP to CCM (Grant number 383968/2015-1). Master degree scholarship from CAPES/FAPESP to FFM (Grant number 2015/20077-3). Post-doctoral scholarship from Bill and Melinda Gates Foundation to CMO (Grant number 1151345). LFL is supported by Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention and Education of Occupational Cancer) in Campinas, Brazil.

Author Contributions

Conceptualization: M.N.R., R.M.R.; Experiments: M.N.R., L.F.L., C.M.O., V.A.O.S., C.C.M., F.F.M.; Data analysis/Patient material/Clinical information: M.N.R., A.F.E., L.F.L., C.M.O., V.A.O.S., G.M.M., R.R., C.E.A., C.P.S.; Writing original draft: M.N.R., A.F.E., L.F.L., C.M.O., R.M.R.; Review & Editing: M.N.R., A.F.E., L.F.L., C.M.O., V.A.O.S., C.C.M., F.F.M., G.M.M., R.R., C.E.A., C.P.S., R.M.R.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38315-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019