

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PATOLOGIA**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 7009  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3248.9641 FAX: (31) 3248.9939



Isabella da Terra Borges

**EFEITOS DO CITRATO DE CLOMIFENO E LETROZOL NA TRANSIÇÃO-  
EPITÉLIO-MESENQUIMAL E NA CARGA VIRAL DO HPV DAS CÉLULAS HELA  
(ADENOCARCINOMA CERVICAL HUMANO)**

**Belo Horizonte**

**- 2022 -**

ISABELLA DA TERRA BORGES

**EFEITOS DO CITRATO DE CLOMIFENO E LETROZOL NA TRANSIÇÃO-  
EPITÉLIO-MESENQUIMAL E NA CARGA VIRAL DO HPV DAS CÉLULAS HELA  
(ADENOCARCINOMA CERVICAL HUMANO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia – Área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto

Coorientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

**Belo Horizonte**

**- 2022-**

043

Borges, Isabella da Terra.

Efeitos do citrato de clomifeno e letrozol na transição epitélio-mesenquimal e na carga viral do HPV das células HELA (Adenocarcinoma Cervical Humano) [manuscrito] / Isabella da Terra Borges. – 2022.

104 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto. Coorientador: Prof. Dr. Enio Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Células HeLa. 3. Papillomavirus Humano 18. 4. Letrozol. 5. Clomifeno. I. Puerto, Helen Lima Del. II. Ferreira, Enio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 444 DE ISABELLA DA TERRA BORGES**

Realizou-se, no dia 25 de fevereiro de 2022, às 9 horas, no formato *on-line*, a defesa de Dissertação, intitulada "*Efeitos do citrato de clomifeno e letrozol na transição-epitélio-mesenquimal e na carga viral do HPV das células HeLa (adenocarcinoma cervical humano)*", apresentada por Isabella da Terra Borges, número de registro 2020673686, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Dra. *Maria Gabrielle de Lima Rocha* – Faculdade de Farmácia/UFMG; Profa. Dra. *Marina Gonçalves Diniz* - ICB/UFMG ; Prof. Dr. *Enio Ferreira* – ICB/UFMG – **COORIENTADORA**; Profa. Dra. *Helen Lima Del Puerto* – ICB/UFMG – **ORIENTADORA**.

A Comissão considerou a Dissertação:

- Aprovada**  
 **Reprovada**

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2022.

\* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por Helen Lima Del Puerto, Professora do Magistério Superior, em 25/02/2022, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior, em 25/02/2022, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Maria Gabrielle de Lima Rocha, Professora do Magistério Superior, em 25/02/2022, às 12:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marina Goncalves Diniz, Professora do Magistério Superior, em 08/03/2022, às 08:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1277666 e o código CRC 63EC3BE2.

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=1364201&infra\\_sistema...](https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1364201&infra_sistema...) 1/2

14/03/2022 12:43

SEI/UFMG - 1277666 - Ata de defesa de Dissertação/Tese





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Efeitos do citrato de clomifeno e letrozol na transição-epitélio-mesenquimal e na carga viral do HPV das células HeLa (adenocarcinoma cervical humano)."**

**ISABELLA DA TERRA BORGES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. *Maria Gabrielle de Lima Rocha* - Faculdade de Farmácia/UFMG

Profa. Dra. *Marina Gonçalves Diniz* - ICB/UFMG – ICB/UFMG

Profa. Dra. *Helen Lima Del Puerto* - ICB/UFMG - **ORIENTADORA**

Prof. Dr. *Enio Ferreira*- ICB/UFMG - **COORDENADORA**

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Professora do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Gabrielle de Lima Rocha, Professora do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 08/03/2022, às 08:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1277669 e o código CRC 58D339C9.

Este trabalho foi realizado no Laboratório do Comportamento Celular do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPEMIG.

## DEDICATÓRIA

Ao meu porto-seguro: Jefferson, Miriam e Rose.

Às + 635.000 vítimas do SARS-CoV-2.



## AGRADECIMENTOS

Dedicar-se a ciência e a pesquisa no Brasil, principalmente nos dias de hoje, é um ato de resistência. Após 03 dias de aulas presenciais no PPG de Patologia da UFMG em 2020, fomos surpreendidos por uma pandemia que nos fez trabalhar e estudar de forma remota por mais de ano: vieram o isolamento, as restrições, a urgência por vacinas, a saudade. Vieram também as centenas de milhares de mortes, o negacionismo, os cortes de verbas, o ódio pelo (des)governo. Nesse cenário, um tanto quanto caótico, realizei meu mestrado, e graças a uma enorme rede de apoio que chego a sua conclusão.

Agradeço imensamente à professora Helen, que não só me guiou por todas as adversidades, como me acolheu, acalmou, ensinou! Obrigada por confiar em mim e me incentivar a crescer! Terei sempre você como grande exemplo de profissional e mulher! A todos do LCC: Bárbara, Bruna, Camila, Emerson, Enio, Felipe e Pedro! Obrigada pelos conselhos, suporte, ajudas, trocas e companheirismo. Dividir essa jornada com vocês tornou tudo mais tranquilo!

Aos meus pais, Rose e Jefferson, e minha mãe de coração/dindinha Miriam; devo tudo o que sou a vocês! Não há palavras para agradecer por todo amor, apoio e acolhimento incondicional... Obrigada por toda força, por acreditarem em mim, confiarem em meu potencial! A toda minha família, pelos votos de sucesso e torcida! Em especial, as minhas avós, espero que estejam orgulhosas!

As minhas amigas Débora, Flávia, Jac, Jéssica, Lídia, Marina, Melissa, Paula e Sarah! A amizade, a força, o carinho, a torcida e o estímulo de vocês foram essenciais para chegar até aqui! Lidi, obrigada por estar comigo em todos e a qualquer momento; por me incentivar, confiar e acreditar em mim quando nem eu mesma o fiz. Saiba que você ajudou a tornar tudo mais leve!

A Deus, por toda graça, força e resiliência!

A UFMG e a todos do departamento de Patologia do ICB! Tenho muito orgulho de ter feito parte disso! Obrigada por contribuírem tanto para meu crescimento, profissional e pessoal! Prometo honra-los sempre no exercício da minha profissão aonde estiver.

A Henrietta Lacks, por suas células tão importantes para minha pesquisa; e ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Concluir o Mestrado é a realização de um sonho! MUITÍSSIMO obrigada!

## RESUMO

O câncer cervical é o terceiro tipo de neoplasia mais frequente entre mulheres brasileiras, sendo responsável por 7,5% dos novos casos de câncer em 2020. Sabe-se que os Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco são a principal causa do desenvolvimento dessa neoplasia. Entretanto, há múltiplos fatores associados a prevalência do vírus como o tabagismo, uso de contraceptivo oral a longo prazo, multiparidade, coinfeção com outros agentes sexualmente transmissíveis e desbalanço hormonal. Neste último contexto, a utilização de medicamentos indutores de ovulação em técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA), como o Citrato de Clomifeno (CC) e o Letrozol (LET), encontram-se associadas a promoção e progressão de diversas neoplasias, como a cervical. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do CC e LET na transição epitélio-mesênquima (TEM) e na carga viral do HPV18 em células HeLa (adenocarcinoma cervical). Para isso, realizou-se um tratamento de 24 e 48 horas das células HeLa com 2000 ng/mL de CC e 4000 ng/mL de LE e, em seguida, quantificou-se a expressão de mRNA de ECAD, NCAD, ZEB1, ZEB2 e SNAIL, assim como de DNA de HPV18, por PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que, após 24 horas de tratamento com CC e LET, há uma superexpressão dos fatores de transcrição ZEB1, ZEB2 e SNAIL, que cai significativamente após 48 horas. Já NCAD apresentou expressão aberrante após 48 horas de tratamento com ambas as drogas. Em relação a carga viral de HPV, observa-se que as células HeLa com CC e LET por 24 horas apresentam menor número de cópias do vírus que a condição controle. Porém, após 48 horas, há um aumento da carga viral em ambos os tratamentos. Portanto, com base nos resultados encontrados, sugere-se que o uso de CC e LET estimula a replicação viral ao longo do tempo, além de induzir um comportamento mais agressivo das células neoplásicas cervicais HeLa, uma vez que estimula a TEM ao ativar fatores de transcrição nas primeiras 24 horas de tratamento e, assim, aumentar a expressão de NCAD após 48 horas. Esse perfil é compatível com um fenótipo mesenquimal, que possui alta capacidade invasora, migratória e, conseqüentemente, metastática, associado a um pior prognóstico.

**PALAVRAS-CHAVES:** Câncer cervical, Citrato de clomifeno, Hela, HPV18, Letrozol, Transição epitélio-mesênquima.

## ABSTRACT

Cervical cancer is the third most frequent type of neoplasm among Brazilian women, accounting for 7.5% of new cancer cases in 2020. It is known that high-risk Human Papillomaviruses (HPV) are the main cause of the development of this disease. However, there are multiple factors associated with the prevalence of the virus, such as smoking, long-term use of oral contraceptives, multiparity, co-infection with other sexually transmitted agents and hormonal imbalance. In this last context, assisted human reproduction techniques use ovulation-inducing drugs to collect ovarian follicles, such as Clomiphene Citrate (CC) and Letrozole (LET). As they act on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis, these drugs lead to a hormonal imbalance and, therefore, are associated with the promotion and progression of various neoplasms, such as cervical cancer. The aim of the present study was to evaluate the effects of CC and LET on epithelial-mesenchymal transition (TEM) and on HPV18 viral load in HeLa cells (cervical adenocarcinoma). A 24- and 48-hours treatment of HeLa cells was performed with 2000 ng/mL of CC and 4000 ng/mL of LE and, then, the mRNA expression of ECAD, NCAD, ZEB1, ZEB2 and SNAIL was quantified, as well as HPV18 DNA, by real-time PCR. The results showed that, after 24 hours of treatment with CC and LET, there was an overexpression of transcription factors ZEB1, ZEB2 and SNAIL, which was reduced significantly after 48 hours. NCAD, on the other hand, showed aberrant expression after 48 hours of treatment with both drugs. Regarding the HPV viral load, it was observed that HeLa cells treated with CC and LET for 24 hours have a lower number of virus copies than the control condition. However, after 48 hours, there was an increase in viral load in both treatments. Therefore, based on these results, it is suggested that the use of CC and LET stimulate viral replication over time, and induce a more aggressive behavior of HeLa cervical cancer cells, since it stimulates EMT by activating transcription in the first 24 hours of treatment and thus increase NCAD expression after 48 hours. This profile is compatible with a mesenchymal phenotype, which has a high invasive, migratory and, consequently, metastatic capacity, associated with a worse prognosis.

**KEYWORDS:** Cervical cancer, Clomiphene citrate, Hela, HPV18, Letrozole, Epithelial-mesenchymal transition.

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

### DISSERTAÇÃO

<b>Figura 1.</b> Marcos do câncer.....	18
<b>Figura 2.</b> Transição Epitélio-Mesênquima.....	22
<b>Figura 3.</b> Progressão de lesões intraepiteliais escamosas até o carcinoma invasor.....	26
<b>Figura 4.</b> Carcinogênese viral pelo HPV.....	32

### ARTIGO

<b>Figura 1.</b> Adenocarcinoma HeLa cells MTT metabolization assay after 24 and 48 hours treatment with CC and LET.....	55
<b>Figura 2.</b> Effects of CC and LET treatment on HeLa cell cycle after 24 hours and 48 hours, assessed by PI-flow cytometry.....	56
<b>Figura 3.</b> <i>ECAD</i> , <i>NCAD</i> , <i>ZEB1</i> , <i>ZEB2</i> and <i>SNAIL</i> mRNA expression in HeLa cells treated with CC (A) and LET (B) for 24 and 48 hours.....	56
<b>Figura 4.</b> HPVs' viral load in HeLa cells after 2000 ng/mL CC and 4000 ng/mL LET for 24 and 48 hours.....	57
<b>Figura 5.</b> Clomiphene Citrate and Letrozole modulate the epithelial-mesenchymal transition target gene expression in HeLa cells.....	58

### ANEXO

<b>Figura 1.</b> Gráfico de amplificação do branco para o gene GAPDH.....	87
<b>Figura 2.</b> Gráfico da curva de <i>melting</i> para o gene GAPDH.....	87
<b>Figura 3.</b> Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene GAPDH.....	88
<b>Figura 4.</b> Gráfico de amplificação do branco para o gene ECAD.....	88
<b>Figura 5.</b> Gráfico da curva de <i>melting</i> para o gene ECAD.....	89
<b>Figura 6.</b> Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene ECAD.....	89
<b>Figura 7.</b> Gráfico de amplificação do branco para o gene NCAD.....	90
<b>Figura 8.</b> Gráfico da curva de <i>melting</i> para o gene NCAD.....	90

<b>Figura 9.</b> Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene NCAD.....	91
<b>Figura 10.</b> Gráfico de amplificação do branco para o gene ZEB1.....	91
<b>Figura 11.</b> Gráfico da curva de <i>melting</i> para o gene ZEB1.....	92
<b>Figura 12.</b> Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene ZEB1.....	92
<b>Figura 13.</b> Gráfico de amplificação do branco para o gene ZEB2.....	93
<b>Figura 14.</b> Gráfico da curva de <i>melting</i> para o gene ZEB2.....	93
<b>Figura 15.</b> Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene ZEB2.....	94
<b>Figura 16.</b> Gráfico de amplificação do branco para o gene SNAIL.....	94
<b>Figura 17.</b> Gráfico da curva de <i>melting</i> para o gene SNAIL.....	95
<b>Figura 18.</b> Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene SNAIL.....	95
<b>Figura 19.</b> Gráfico de amplificação das amostras de DNA para gene GAPDH.....	96
<b>Figura 20.</b> Gráfico de amplificação das amostras de DNA para HPV18.....	96
<b>Figura 21.</b> Gráfico de amplificação das amostras de DNA para GAPDH e HPV18.....	97
<b>Figura 22.</b> Gráfico da curva de <i>melting</i> para HPV18.....	97
<b>Figura 23.</b> Gel de poliacrilamida pós PCR convencional do DNA viral.....	98

## LISTA DE TABELAS

### DISSERTAÇÃO

<b>Tabela 1.</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 para os homens, exceto pele não melanoma.....	17
<b>Tabela 2.</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 para as mulheres, exceto pele não melanoma.....	17
<b>Tabela 3.</b> Primers e respectivas sequências para avaliar TEM.....	43
<b>Tabela 4.</b> Primers e respectivas sequências para avaliar carga viral do HPV.....	44

### ARTIGO

<b>Tabela 1.</b> Primers sequences for RT-PCR and q-PCR.....	52
<b>Tabela 2.</b> Primers sequences for HPV PCR.....	53

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

**ADC:** Adenocarcinoma Cervical

**ACE:** Adenocarcinoma do tipo Endocervical

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BCL-2:** Gene do Linfoma de Célula B 2

**CC:** Citrato de Clomifeno (em inglês, *Clomiphene Citrate*)

**CCE:** Carcinoma de Células Escamosas

**CDK:** Quinase Dependente de Ciclina (em inglês, *Cyclin-dependent kinase*)

**cDNA:** Ácido Desoxirribonucléico Complementar

**CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**CO<sub>2</sub>:** Gás Carbônico

**DMEM:** em inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido Desoxirribonucléico (em inglês, *deoxyribonucleic acid*)

**ECAD:** gene CHD1, relativo à proteína E-caderina

**E-cad:** Proteína E-caderina

**EGF:** Fator de Crescimento Epidérmico (em inglês, *Epidermal growth factor*)

**EOC:** Estimulação Ovariana Controlada

**ER $\alpha$ :** Receptores de estrógeno *alpha*

**FAPEMIG:** Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FGF:** Fator de crescimento de fibroblastos (em inglês, *Fibroblast Growth Factor*)

**FGFR:** Receptor do Fator de crescimento de fibroblastos (em inglês, *Fibroblast Growth Factor Receptor*)

**FIV:** Fertilização *In Vitro*

**FSH:** Hormônio do Folículo Estimulante (em inglês, *Follicle Stimulating Hormone*)

**FT:** Fatores de transcrição (em inglês, *Transcriptional Factors*)

**GnRH:** Hormônio Liberador de Gonadotrofina

**HFS:** do ingles, *Hypotonic Fluorochrome Solution*

**HPV:** Papilomavírus Humano (em inglês, *Human Papiloma Virus*)

**HSIL:** Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau (em inglês, *High grade Squamous Intraepithelial Lesions*)

**IARC:** Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (em inglês, *International Agency for Research on Cancer*)

**ICB:** Instituto de Ciências Biológicas

**ICSI:** Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (em inglês, *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*)

**IIU:** Inseminação Intrauterina

**ILK:** Quinase ligada a Integrina

**INCA:** Instituto Nacional de Câncer

**ISTs:** Infecções Sexualmente Transmissíveis

**JEC:** Junção Escamo-Colunar

**kDa:** quilodáltons

**LCC:** Laboratório do Comportamento Celular

**LEEP:** Procedimento de excisão eletrocirúrgica de loop (em inglês, *Loop electrosurgical excision procedure*)

**LET:** Letrozol (em inglês, *Letrozole*)

**LGEX:** Laboratório de Genética Experimental

**LH:** Hormônio Luteinizante

**LSIL:** Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau (em inglês, *low grade squamous intraepithelial lesion*)

**MEC:** Matriz Extracelular (em inglês, *extracellular matrix*)

**mg:** Miligrama

**mL:** Mililitro

**MMP:** Metaloproteinases (em inglês, *Matrix Metalloproteinases*)

**MTT:** Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5difeniltetrazolio]

**NCAD:** gene CDH2, relativo à proteína N-caderina

**N-cad:** proteína N-caderina

**NCBI:** Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (em inglês, *National Center for Biotechnology Information*)

**ng:** Nanograma

**NIC:** Neoplasia Intraepitelial Cervical (em inglês, *Cervical Intraepithelial Neoplasia*)

**nm:** Nanômetro

**O<sub>2</sub>:** Oxigênio

**°C:** Graus Celsius

**OD:** Densidade Óptica (do inglês, *density optical*)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde (em inglês, *World Health Organization - WHO*)

**p53:** Inibidor de Ciclina Dependente de Proteína Quinase 53

**PBS:** Tampão Fosfato (em inglês, *Phosphate-Buffered Saline*)

**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

**PI:** Iodeto de Propídeo

**PI3K:** Proteína Quinase B ou Fosfatidilinositol 3-quinase



**pRB:** Proteína Retinoblastoma

**q-PCR:** PCR em tempo real

**RHA:** Reprodução Humana Assistida

**RHO:** proteína G da família *Rodopsina*

**RNA:** Ácido Ribonucléico (em inglês, *ribonucleic acid*)

**RPM:** Rotações por minuto

**RT-PCR:** PCR de Transcriptase Reversa

**SFB:** Soro Fetal Bovino

**SMA- $\alpha$ :** Actina  $\alpha$  do músculo liso (em inglês, *Smooth Muscle Actin  $\alpha$* )

**SNAIL:** do inglês, *Zinc Finger Factor Snail*

**TEM:** Transição Epitélio-mesênquima (em inglês, *Epithelial-Mesenchymal Transition*)

**TGF- $\beta$ :** Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$  (em inglês, *transforming growth factor  $\beta$* )

**TIMP:** Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (em inglês, *tissue metalloproteinase inhibitors*)

**TME:** Transição Mesênquima-Epitélio (em inglês, *Mesenchymal-Epithelial Transition*)

**TWIST:** do inglês, *Twist-related protein*

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**WCRF:** Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer (em inglês, *World Cancer Research Fund*)

**ZEB1:** *Zinc-finger Homeobox 1* de ligação a E-box (em inglês, *Zinc Finger E-box-binding homeobox 1*)

**ZEB2:** *Zinc-finger Homeobox 2* de ligação a E-box (em inglês, *Zinc Finger E-box-binding homeobox 2*)

**$\mu$ g:** Micrograma

**$\mu$ L:** Microlitro

## SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
1.1. INTRODUÇÃO.....	14
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.2.1. CÂNCER.....	15
1.2.1.1. PROMOÇÃO E PROGRESSÃO TUMORAL.....	18
1.2.1.2. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMA.....	19
1.2.2. CÂNCER CERVICAL.....	25
1.2.2.1. MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> : CÉLULAS HELA.....	28
1.2.2.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	29
1.2.3. ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA (EOC).....	33
1.2.3.1. CITRATO DE CLOMIFENO.....	34
1.2.3.2. LETROZOL.....	36
1.2.3.3. EOC x CÂNCER.....	37
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. GERAL.....	39
3.2. ESPECÍFICOS.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. LINHAGEM CELULAR E CULTIVO.....	40
4.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MTT.....	40
4.3. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	41
4.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS HELA.....	42
4.4.1. EXTRAÇÃO DE RNA.....	42
4.4.2. RT-PCR E Q-PCR.....	42
4.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA VIRAL (HPV).....	44
4.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL.....	44
4.5.2. PCR CONVENCIONAL E Q-PCR.....	44
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
5. ARTIGO.....	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8. ANEXOS.....	87

<b>8.1. CURVAS Q-PCR.....</b>	<b>87</b>
<b>8.2 GEL DE POLIACRILAMIDA – PCR CONVENCIONAL DNA VIRAL.....</b>	<b>98</b>

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1. INTRODUÇÃO

De acordo com a *American Cancer Society*, uma em cada três pessoas será diagnosticada com câncer durante sua vida (Society 2022). Há várias causas externas (relacionadas ao meio ambiente) e internas (relacionadas ao material genético, sistema imunológico e balanço hormonal) que influenciam no aparecimento e desenvolvimento do câncer. Cerca de 80 a 90% de seus casos estão associados a causas externas, uma vez que hábitos e comportamentos como o consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, infecções virais e bacterianas, má alimentação, desbalanço hormonal e obesidade são fatores de risco para diferentes neoplasias (INCA 2021). Sendo assim, o rastreamento de câncer deve ser regular para que os testes de triagem detectem lesões pré-malignas ou tumores logo no início de seu desenvolvimento e direcionem um tratamento apropriado. A detecção precoce aumenta as chances de cura e melhor prognóstico do paciente, uma vez que as células tumorais tendem a responder mais efetivamente aos tratamentos (Society 2022).

O Câncer Cervical é um dos tipos de câncer passíveis de detecção precoce através de programas de triagem, como por exemplo o exame Papanicolaou, utilizado no Brasil. Além disso, a vacina quadrivalente, que protege contra os tipos mais prevalentes do HPV (6, 11, 16 e 18), tem um importante papel na prevenção de lesões e desenvolvimento neoplásico, já que tal neoplasia está fortemente associada aos HPV 16 e 18. Mesmo sendo ofertada gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, nota-se uma não adesão da vacina contra o HPV, fazendo com que a incidência de lesões pré-neoplásicas e do câncer de colo de útero mantenha-se constante ao passar dos anos.

É sabido que alterações nos níveis de hormônios endógenos, como, por exemplo, as causadas pelo uso de contraceptivos via oral a longo prazo, aumentam a prevalência da infecção por HPV e, conseqüentemente, levam à maior progressão tumoral (INCA 2022). Por este motivo, nos últimos anos, vem-se estudando a correlação entre a progressão de lesões malignas e o uso de medicamentos indutores de ovulação, como o Citrato de Clomifeno (CC) e o Letrozol (LET). Estes medicamentos são muito utilizados em procedimentos de reprodução assistida para a manutenção da fertilidade e/ou tratamento da infertilidade. Neles, as mulheres precisam passar por múltiplos protocolos de Estimulação Ovariana Controlada (EOC) que promovem um aumento na produção e liberação de hormônios endógenos podendo, assim, atuar como fator facilitador do surgimento de lesões pré-neoplásicas (Rossing, Daling *et al.* 1995).

Alguns estudos de coorte desenvolvidos na tentativa de avaliar a influência destes medicamentos (CC e LET) na progressão de tumores, tiveram os resultados postos em dúvida pela influência de vieses como o controle e acompanhamento a longo prazo adequado das pacientes, as condições em que as análises foram feitas, e os diversos carcinógenos aos quais as pacientes foram expostas após a EOC e o diagnóstico da neoplasia (Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016). Portanto, tornam-se necessários estudos experimentais que avaliem em condições controladas e específicas, como medicamentos indutores de ovulação atuam em células já iniciadas no processo neoplásico, facilitando e garantindo uma melhor interpretação e discussão dos dados.

O presente trabalho propôs-se a avaliar os efeitos do citrato de clomifeno e do letrozol em uma linhagem imortalizada de células de adenocarcinoma endocervical (HeLa), observando seus efeitos sobre diferentes processos, como a Transição Epitélio-Mesênquima (TEM), a expressão de fatores de transcrição e outras proteínas (ECAD, NCAD, ZEB1, ZEB2 e SNAIL) e a replicação viral, sem os múltiplos vieses de uma avaliação epidemiológica. Desta forma, preenche-se a lacuna existente na ciência básica sobre como o CC e LET comportam-se sobre a promoção e progressão tumoral *in vitro* e se elucida o que é visto *in vivo*.

## **1.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.2.1. CÂNCER**

O termo “neoplasia” refere-se a lesões constituídas por massa de tecido anormal, cujas células proliferam-se de maneira excessiva, autônoma e descontrolada, em geral com redução ou perda de diferenciação, e persistem mesmo após o findar do estímulo que as induziram (Cotran 2010, Bogliolo 2016). Toda neoplasia é constituída pelo parênquima (células neoplásicas clonais), através do qual se classifica os tumores e seu comportamento biológico, e pelo estroma (vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, leucócitos, citocinas, fatores de crescimento), que dita o crescimento e disseminação tumoral. Dos pontos de vista morfológico, comportamental, evolutivo e clínico, as neoplasias são divididas em benignas e malignas (Bogliolo 2016).

Os tumores benignos, em geral, possuem células bem diferenciadas (assemelham-se às normais do sítio de origem), que crescem unidas entre si, sem infiltrar no tecido adjacente. A baixa taxa de replicação celular faz com que esses tumores apresentem crescimento lento, sendo raro encontrar necroses, hemorragias e degenerações. Por isso, são também baixas as probabilidades de o tumor causar complicações ou ser letal ao paciente (Bogliolo 2016). Já os tumores

malignos, chamados coletivamente de “câncer”, apresentam células pleomórficas, com redução ou perda de diferenciação e alto índice mitótico, o que promove um crescimento acelerado e, conseqüentemente, graves perturbações homeostáticas como hemorragias, necroses, úlceras e degenerações. Graças à perda de adesão celular e ganho de motilidade, as células neoplásicas malignas são capazes de infiltrar tecidos e estruturas adjacentes, e de se disseminarem para sítios que não estão em continuidade ao sítio primário tumoral (metastatização) (Cotran 2010).

Para que ocorra a formação de células neoplásicas é necessário que elas passem por um processo complexo e multifásico, conhecido como carcinogênese, no qual influenciam fenômenos genéticos e epigenéticos. Como fatores influenciadores de fenômenos epigenéticos, os fatores ambientais são responsáveis por, aproximadamente, 80% dos casos de câncer, dentre eles agentes químicos, físicos e biológicos, como: ingestão de alimentos e água contaminados por pesticidas e/ou agrotóxicos, uso de bebidas alcoólicas e cigarros, uso de medicamentos, exposição à radiação e a fumaça, sedentarismo, má alimentação e obesidade, infecções por vírus e bactérias, entre outros. Já as causas genéticas correlacionam o aparecimento de tumores à fatores hereditários, familiares e étnicos, uma vez que ditam a capacidade do organismo em se defender de agentes ambientais. Além disso, há o envelhecimento natural do organismo e inevitavelmente de suas células, tornando-as mais susceptíveis a alterações neoplásicas, devido ao maior tempo de exposição a agentes carcinogênicos ambientais (INCA 2021).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (em inglês, International Agency for Research on Cancer – IARC), foram registrados aproximadamente 19,3 milhões de novos casos em 2020, ao redor do mundo (10,1 milhões em homens e 9,2 milhões em mulheres), sendo responsável por quase 10 milhões de óbitos. Segundo o Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer (em inglês, *World Cancer Research Fund – WCRF*), a incidência de câncer no mundo cresceu 20% da década 1990 para a de 2000, e com este crescente fardo global, a prevenção do câncer é um dos desafios mais significativos em saúde pública do século XXI e vem promovendo alterações nos hábitos e modo de vida das pessoas, inclusive dos mais jovens. Busca-se, portanto, viver de maneira saudável para prevenir o câncer através da mudança dos padrões alimentares, reduzindo o consumo de álcool, aumentando a atividade física, alcançando e mantendo um peso corporal saudável (Fund 2021).

Por afetar qualquer parte do corpo e possuir diferentes subtipos moleculares, é importante analisar a distribuição, a ocorrência e a evolução dos cânceres para se estabelecer um perfil epidemiológico capaz de nortear ações de prevenção e controle da doença. A incidência dos

vários tipos de câncer varia de acordo com o sexo. No Brasil, para os homens, os cânceres de próstata, cólon e reto, traqueia, brônquios e pulmão são mais comuns, nesta ordem, excluindo os de pele não melanoma, conforme a **Tabela 1** (Câncer 2020).

**Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 para os homens brasileiros, exceto pele não melanoma**

Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%
Cólon e Reto	20.540	9,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%
Estômago	13.360	5,9%
Cavidade Oral	11.200	5,0%
Esôfago	8.690	3,9%
Bexiga	7.590	3,4%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%
Laringe	6.470	2,9%
Leucemias	5.920	2,6%

**Homens**




(Fonte: Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2022)

Já para as mulheres brasileiras, os cânceres de mama, cólon e reto e colo uterino são, nessa ordem, os de maior incidência, excluindo-se também os de pele não melanoma, conforme a **Tabela 2**.

**Tabela 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 para as mulheres brasileiras, exceto pele não melanoma**

	Localização primária	Casos	%
<b>Mulheres</b>	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e Reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.710	7,5%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
	Glândula Tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%



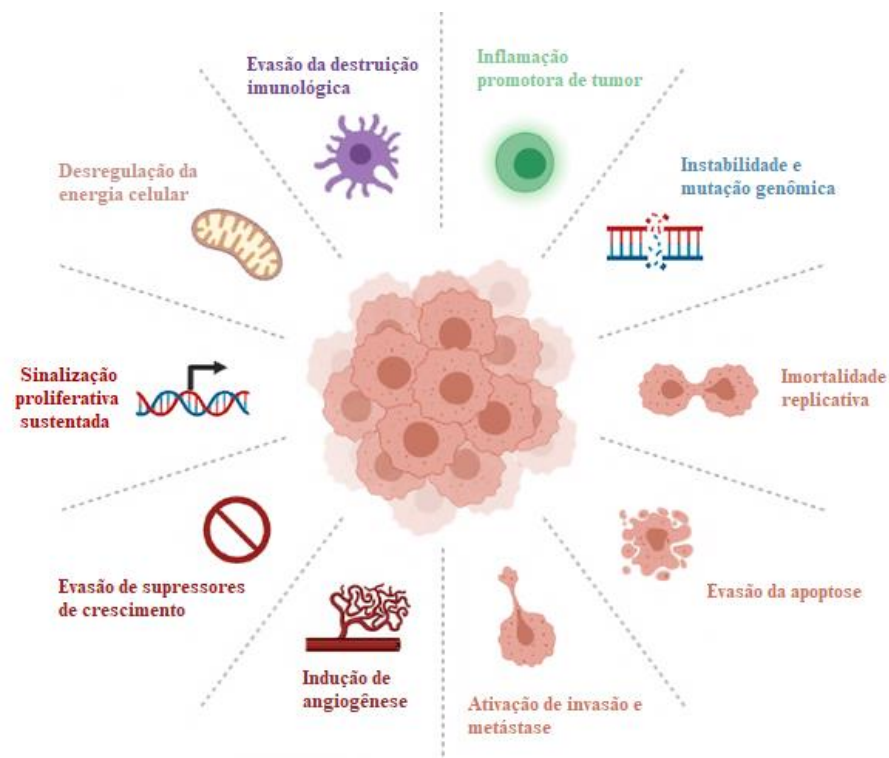
(Fonte: INCA, 2022)

### 1.2.1.1. PROMOÇÃO E PROGRESSÃO TUMORAL

A formação de neoplasias malignas demanda que as células já iniciadas no processo tumoral passem por fenômenos conhecidos como promoção e progressão. Promoção é o nome dado ao processo de proliferação ou expansão das células tumorais, de modo que as mutações sofridas se tornem permanentes ao serem transmitidas para as células filhas. Um promotor é capaz de irritar tecidos e provocar reações inflamatórias e proliferativas, como exemplo, fenóis, hormônios, medicamentos, calor, traumatismos, etc (Bogliolo 2016).

Já a progressão tumoral consiste na aquisição de características neoplásicas específicas, denominadas coletivamente como os “marcos do câncer” (Hanahan and Weinberg 2000), que tornam as células mais agressivas e resistentes a mecanismos fisiológicos antitumorais. Dentre a autonomia de proliferação e sobrevivência, adaptações metabólicas, instabilidade genômica, evasão da apoptose, do sistema imune e da senescência replicativa, deve-se destacar os mecanismos que conferem as células tumorais a capacidade de invasão e metastatização (Bogliolo 2016), uma vez que promovem sua disseminação pelo organismo. Os marcos do câncer estão esquematizados na **Figura 1**.

**Figura 1 – Marcos do câncer**





**Figura 1.** “Marcos do Câncer” propostos por Hanahan e Weinberg, em 2011. Fonte: (Hanahan and Weinberg 2011) BioRender (modificado por Isabella da Terra Borges).

Os marcos do câncer descritos na figura 1 são provocados por diversas alterações genômicas que consistem na ativação de oncogenes, por exemplo, leva a produção de fatores de crescimento pelas próprias células tumorais, garantindo a autonomia de sinais de proliferação, não sendo mais necessária a estimulação externa. Como resultado, as células neoplásicas se proliferam indefinidamente (Hanahan and Weinberg 2011). Por outro lado, há alterações que caracterizam a insensibilidade das células neoplásicas aos sinais inibidores de mitose, como: a mutação com perda de função de genes supressores de tumor, como a proteína do retinoblastoma (pRB); a mutação em genes como RAS, comprometendo a atividade GTPase da proteína RAS, que fica permanentemente ativada; a perda de inibição por contato do sistema caderina/ $\beta$ -catenina; e a modificação na atividade de fatores de crescimento inibidores de mitose, como TGF- $\beta$ , permitindo proliferação crônica (Burkhart and Sage 2008, Zhou, Der *et al.* 2016, Gu and Feng 2018).

A inibição de genes pró-apoptóticos, a hiperexpressão de genes anti-apoptóticos (como BCL-2) e/ou a inativação de genes cujas proteínas conferem o DNA em busca de danos, como a p53 são exemplos de mecanismos genéticos que as células neoplásicas apresentam para evadir a apoptose, tornando permanentes os erros genéticos decorrentes de mutações (Solomon, Madar *et al.* 2011, Sharma, Boise *et al.* 2019). Além disso, as células neoplásicas são capazes de invadir e migrar através dos tecidos, locomovendo-se ativamente graças à ativação de genes que favorecem a produção de metaloproteinases (MMP); à inibição de genes que estimulam inibidores de MMP, os TIMP; e a alterações nos mecanismos de adesão celular. O deslocamento celular é favorecido pela ação de enzimas hidrolíticas do grupo de MMP que desestruturam a matriz extracelular (MEC), produzidas pelas próprias células tumorais ou por fibroblastos e macrófagos estimulados pelas células malignas (Turunen, Tatti-Bugaeva *et al.* 2017). A menor adesão entre as células tumorais, e entre elas e a MEC ocorre devido às modificações e irregularidades na membrana citoplasmática, a diminuição ou ausência de estruturas juncionais, a redução de moléculas de adesão entre células (como caderinas), e a diminuição de fibronectina (Bogliolo 2016).

### 1.2.1.2. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMA

Em tumores epiteliais, as células podem se destacar do sítio primário de maneira isolada ou em blocos graças ao fenômeno de Transição Epitélio-Mesênquima (TEM). A TEM é um

mecanismo celular gradual de conversão de um fenótipo epitelial imóvel para um mesenquimal móvel, no qual se perde características epiteliais como junções celulares, polaridade basoapical, adesão das células a MEC e perda de E-caderina (E-cad), e se adquire características mesenquimais como mobilidade celular, polarização anteroposterior, expressão de R- e N-caderinas, actina do músculo liso  $\alpha$  (SMA- $\alpha$ ), vimentina e proteínas G da família Rodopsina (RHO) (Bogliolo 2016, Pastushenko and Blanpain 2019, Scott and Omilusik 2019). O deslocamento se dá, então, pelo movimento amebóide, em que os pseudópodes são orientados por agentes quimiotáticos da própria célula neoplásica ou de células do estroma (De Craene and Berx 2013).

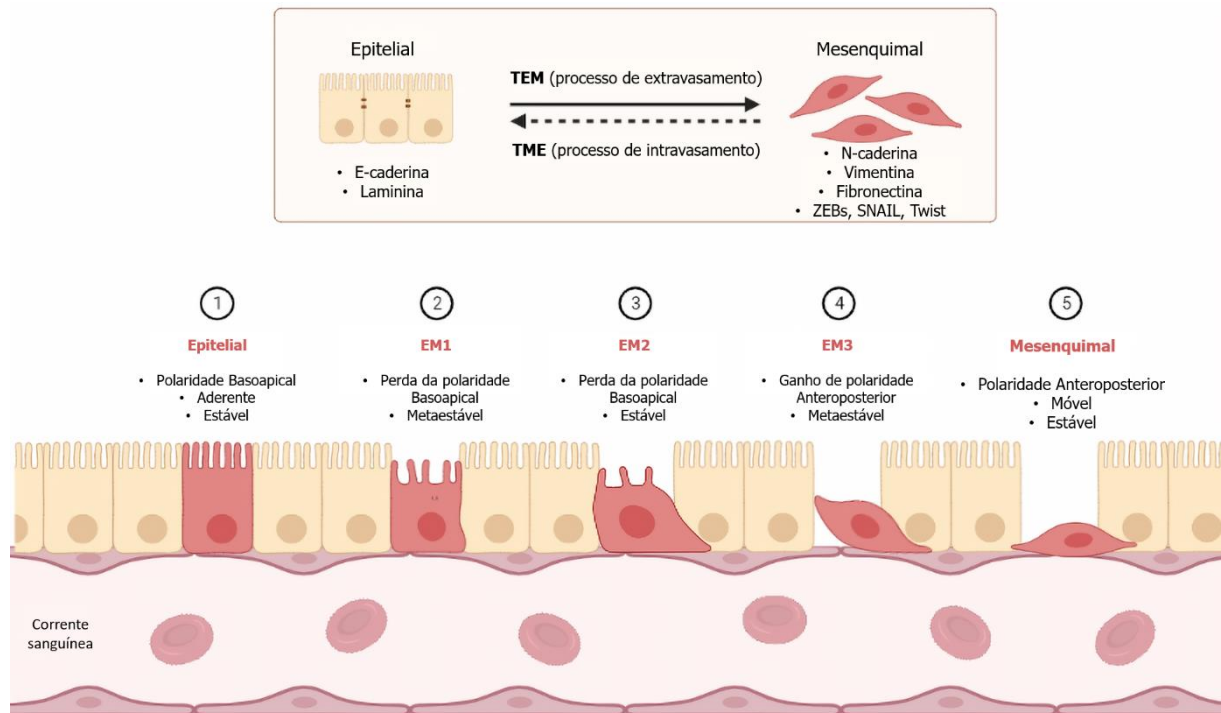
Característico da TEM, o processo “troca de caderina” contribui para a malignidade das células neoplásicas, pois envolve a redução da expressão gênica e proteica de E-cad e o aumento de N-caderina, levando a uma reorganização do citoesqueleto e, conseqüentemente, menor resistência a deformação e características migratórias e invasivas aprimoradas (motilidade celular) (Loh, Chai *et al.* 2019). A proteína madura E-caderina é uma glicoproteína transmembrana dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , de 120 kDa, presente em células epiteliais, que as liga na superfície lateral através de junções aderentes. Sua região amino-terminal possui cinco domínios extracelulares entre os quais os íons  $\text{Ca}^{2+}$  se ligam, aonde sua estabilidade e atividade adesiva célula-célula reside (Wong, Fang *et al.* 2018). No citoplasma, a E-cad é associada a várias cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , p120), que se ligam ao citoesqueleto, mediando efeitos de sinalização, como TGF- $\beta$ , NF-kB, Hippo, Wnt, e outros fatores de crescimento. Por facilitar a separação celular do sítio primário tumoral e assim a invasão e migração das células para sítios distantes, a perda da expressão de E-cad é associada à progressão tumoral e metastatização (Mendonsa, Na *et al.* 2018, Na, Schecterson *et al.* 2020). Entretanto, estudos prévios relatam que o inverso também ocorre: a re-expressão ou super expressão de E-cad em células neoplásicas podem prevenir sua dissociação inicial do tumor original e reduzir sua proliferação, através da sinalização por contato. Dessa forma, a E-cad pode inibir a progressão e invasão tumoral, sendo considerada um supressor de tumor clássico (Mendonsa, Na *et al.* 2018, Na, Schecterson *et al.* 2020).

A N-caderina (caderina neuronal ou caderina-2, N-cad) também é uma glicoproteína transmembrana expressa em tecidos neuroectodérmicos e derivados do mesênquima, atuando na embriogênese, gastrulação, neurulação, adesão célula-célula, migração e invasão (Luo, Yu *et al.* 2018). No contexto tumoral, foi relatado que a expressão suprarregulada de N-cad em células neoplásicas promove migração, invasão e metástase ao mediar a adesão à células

estromais que também expressam N-cad (como fibroblastos e células endoteliais vasculares); ao estimular a ligação do fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, *fibroblast growth factor* – FGF) em seu receptor (FGFR), e produzir uma cascata de sinalizações que ativa a mobilidade celular; e ao promover a sobrevivência das células, protegendo-as da apoptose através da ativação da proteína quinase B (PI3K/AKT), que estabiliza a  $\beta$ -catenina e inativa o fator pró-apoptótico Bad (Li, Satyamoorthy et al. 2001, Luo, Yu et al. 2018). Além disso, consta na literatura que o aumento de N-cad foi observado em outro tipo de neoplasia, como melanoma, e associada a maior graus histológicos mais avançados da doença e tendência metastática, apresentando, portanto, uma função oposta à de E-cad (Li, Satyamoorthy et al. 2001).

Inicialmente vista como um evento binário, sabe-se hoje que a TEM ocorre de maneira gradual, apresentando diversos estágios de transição na progressão tumoral, conhecidos coletivamente como TEM parcial, intermediária ou híbrida (Pastushenko and Blanpain 2019), como demonstrando na **Figura 2**. Nesses estágios, as células cancerosas expressam concomitantemente características genotípicas, fenotípicas e morfológicas de células epiteliais e mesenquimais, o que permite, ainda nesta fase, que as células infiltrem e migrem de maneira efetiva para outros tecidos do corpo. Além disso, devido ao caráter epitelial remanescente, elas possuem a plasticidade necessária para migrarem de maneira coletiva, representando um risco metastático maior, assim como de recorrência do tumor e resistência à terapia (Saitoh 2018, Aiello and Kang 2019). A coexpressão de marcadores epiteliais e mesenquimais foi observada em diversos cânceres primários humanos, como de mama, colorretal, cabeça e pescoço, pulmão, pancreático, bem como em carcinossarcomas como pulmonar, renal, mamário, esofágico e de pele. *In vitro*, o estado híbrido também está associado ao aumento da invasão, migração e sobrevivência celular (Pastushenko and Blanpain 2019).

**Figura 2 – Transição Epitélio-Mesênquima**



**Figura 2.** Esquemática da Transição Epitélio-Mesênquima (TEM). A TEM é um processo gradual, em que as células perdem características epiteliais e adquirem características mesênquimais. Os diversos estágios (1 a 5) entre o fenótipo epitelial e mesênquimal, que mesclam as características das células, são conhecidos coletivamente de TEM híbrida, parcial ou intermediária. Legenda: TEM (Transição Epitélio-Mesênquima), TME (Transição Mesênquima-Epitélio), EM1, EM2 e EM3 (fases em que as células coexpressam características dos fenótipos epiteliais e mesênquimais). Fonte: BioRender (modificado por Isabella da Terra Borges)

Descrita primeiramente no desenvolvimento embrionário, observou-se que a TEM também desempenha papéis cruciais na homeostase do tecido adulto e diversos processos fisiopatológicos como a cicatrização de feridas, regeneração cardíaca e fibrose (Saitoh 2018). No contexto tumoral, já foi associada a vários processos como iniciação do tumor, escape da vigilância do sistema imunológico, estabelecimento de lesões precursoras, progressão tumoral, migração, invasão, metástases e resistência a terapias (Pastushenko and Blanpain 2019). Todos esses estágios são amplamente mediados por um conjunto de fatores de transcrição (FT), que inclui Homeobox 1 de ligação de E-box de dedo de zinco (do inglês, *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1* – ZEB1), Homeobox 2 de ligação de E-box de dedo de zinco (do inglês, *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2* – ZEB2), SNAIL (também conhecido como SNAI1),

SLUG (também conhecido como SNAI2) e *Twist-related protein 1* (TWIST1) (Stemmler, Eccles *et al.* 2019).

O fator de transcrição ZEB1 contém dois domínios de dedo de zinco, pelos quais se ligam independentemente a sequências CACCT(G) em regiões promotoras de genes envolvidos na diferenciação e desenvolvimento (Vandewalle, Comijn *et al.* 2005). É codificado pelo gene TCF8 e atua na diminuição de E-cad e no aumento de vimentina, uma proteína do citoesqueleto, modificando assim o mecanismo de adesão celular. Entretanto, deve-se salientar que sua atuação como ativador ou inibidor da transcrição gênica depende da sua conformação, nível de expressão e sobre qual gene está atuando (Ran, Lin *et al.* 2015). Apesar da maneira pela qual as células neoplásicas cervicais adquirem a capacidade de invadir tecidos e migrar para sítios distantes não ser totalmente compreendida, especula-se que ZEB1 desempenhe um papel importante, particularmente em TEM (Chen, Li *et al.* 2013, Ran, Lin *et al.* 2015). Segundo Zheng e colegas, a progressão e a metastatização de diversos carcinomas, como o carcinoma renal de células claras, carcinoma endometrióide, carcinoma de mama invasivo e adenocarcinoma de pulmão, estão intimamente relacionadas à regulação positiva da expressão de ZEB1 (Ma, Zheng *et al.* 2015).

O ZEB2, membro da família de fatores de transcrição do homeodomínio de dedo de zinco, atua como um mediador da desdiferenciação epitelial através da regulação direta de diversos constituintes de junções aderentes, apertadas, comunicantes e desmossomas, que são características marcantes do fenótipo epitelial, incluindo a polaridade baso-apical (Vandewalle, Comijn *et al.* 2005). Logo, alterações em sua expressão desempenha papéis cruciais na ocorrência e desenvolvimento do câncer, uma vez que regula diversos processos patológicos como ciclo celular, apoptose, proliferação, angiogênese, quimiorresistência e TEM (Feng, Liu *et al.* 2019). A ligação de ZEB2 ao promotor do gene de ECAD regula negativamente a expressão dessa proteína e, geralmente, está associada à perda da capacidade de adesão celular e a aquisição de propriedades invasivas, como já foi relatado anteriormente em células epiteliais e em várias linhagens tumorais (Comijn, Berx *et al.* 2001).

Sabe-se que ZEB2 é superexpresso em vários tipos de câncer humano, como câncer gástrico, câncer de bexiga, câncer de ovário, câncer colorretal, câncer de pulmão e, inclusive, câncer cervical (Ye, Hu *et al.* 2019). Tal superexpressão foi associada à invasão e metástases em cânceres de estágio mais avançado e, conseqüentemente, a um pior prognóstico dos pacientes, como observado em carcinomas de células escamosas (CCE) (Maeda, Chiba *et al.* 2005,

Sakamoto, Imanishi *et al.* 2012, Yoshida, Morita *et al.* 2015), gástrico (Okugawa, Inoue *et al.* 2013), de ovário e mama (Elloul, Elstrand *et al.* 2005) e hepatocelular (Miyoshi, Kitajima *et al.* 2004). Foi observado também que a perda de ZEB2 em células NK, num estudo experimental de metástase, resultou em um aumento drástico da formação de nódulos de melanoma nos pulmões e fígados (Goossens, Vandamme *et al.* 2017); e no melanoma, inibiu o início do tumor e sua progressão metastática (Denecker, Vandamme *et al.* 2014, Stemmler, Eccles *et al.* 2019). ZEB2 desempenha, portanto, papéis opostos durante a progressão tumoral: por um lado, contribui para iniciação, disseminação e resistência a terapia, mas por outro lado, é crucial para uma boa imunovigilância do sistema imunológico contra células neoplásicas (Goossens, Vandamme *et al.* 2017).

Já o fator de transcrição SNAIL teve sua atividade descrita por Batlle e colegas, em 2000, após observarem que sua ligação ao E-box promotor da CHD1 (ECAD) levava a repressão transcricional de E-cad (Batlle, Sancho *et al.* 2000). Além disso, outros trabalhos mostram que a regulação positiva de SNAIL induz a recorrência tumoral e resistência à quimioterapia e radioterapia; estimula metástases ao induzir imunossupressão; controla o metabolismo celular; ativa a TEM em células de fenótipo epitelial ao reprimir diretamente a expressão de claudina e ocludina (proteínas constituintes das junções de oclusão) e assim diminuir suas junções celulares; altera a polaridade celular; e capacita as células a migrarem e invadirem tecidos (Vandewalle, Comijn *et al.* 2005, Chen, Li *et al.* 2013, Wang, Shi *et al.* 2013). Sendo assim, a superexpressão de SNAIL está relacionada a um alto potencial metastático e mau prognóstico em muitos tipos de carcinoma, principalmente do CCE do colo uterino (Tian, Qi *et al.* 2020).

O SNAIL é regulado por diversas vias de sinalização a nível transcricional: através de regulação direta por diferentes fatores do crescimento (FC), como TGF- $\beta$ , FGF2 e EGF; por diferentes moléculas de sinalização como quinase ligada a integrina (ILK), H-ras, v-Akt e NF- $\kappa$ B/p65; e por ele mesmo, onde Snail se liga e reprime seu próprio promotor, indicando a existência de um feedback negativo (Wang, Shi *et al.* 2013). Não obstante, estudos em linhagens de câncer de mama demonstram que a presença de receptores de estrógeno *alpha* (ER $\alpha$ ) resultam em expressão aberrante de SNAIL, ao passo que o *knockdown* de ER $\alpha$  reduziu significativamente sua expressão (Ye, Xiao *et al.* 2010). Fora do contexto da TEM, SNAIL está implicado em vários outros processos, como desenvolvimento, diferenciação neural, apoptose, sobrevivência e destino celular, e assimetria esquerda-direita (De Craene and Berx 2013, Wang, Shi *et al.* 2013).

### 1.2.2. CÂNCER CERVICAL

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres que vivem em países subdesenvolvidos. Em 2020, foram contabilizados mais de 604.000 novos casos de câncer cervical ao redor do mundo, sendo responsável por, aproximadamente, 342.000 óbitos. Estes números vêm diminuindo em países desenvolvidos graças a programas de triagem, prevenção, diagnóstico e tratamento de lesões pré-malignas (Koeneman, Kruitwagen *et al.* 2015, Kudela, Holubekova *et al.* 2016, Sato, Kawana *et al.* 2017). Entretanto, no Brasil, devido à falta de adesão a vacina contra o HPV, a incidência do câncer cervical mantém-se constante ao passar dos anos, sendo que em 2020 estimou-se cerca de 17.743 casos novos (WHO 2020).

O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) e o Adenocarcinoma Cervical (ADC) são os tipos de neoplasias de colo de útero mais comuns, sendo responsáveis por 71% e 25% dos casos, respectivamente (Nicoletti, Migliorati *et al.* 1991). Sabe-se que a infecção persistente por HPV's de alto risco é a principal causa do desenvolvimento de tais lesões (Wipperman, Neil *et al.* 2018, Stolnicu, Hoang *et al.* 2019). Porém sabe-se que alterações epigenéticas – como metilação do DNA e modificação das histonas (Fang, Zhang *et al.* 2014) –, baixa imunidade, coinfeção com outras Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), tabagismo, uso prolongado de anticoncepcional oral, paridade, idade e múltiplos parceiros sexuais são apontados como fatores de risco que facilitam a prevalência do HPV e promoção do câncer cervical (Petry 2014, Wipperman, Neil *et al.* 2018). Questiona-se, então, se alterações nos níveis de hormônios endógenos participariam de alguma forma no desenvolvimento desta neoplasia.

A incidência de CCE vem diminuindo ao longo dos anos em países desenvolvidos devido a programas de triagem de mulheres, que possibilita o diagnóstico precoce de lesões pré-cancerosas e malignas do ectocérvice. Entretanto, esse exame não é totalmente efetivo para detectar ADC pré-invasivo e invasivo, já que se localizam no canal endocervical e são menos descritos e menos identificados (Fujiwara, Yokota *et al.* 2014, Park 2020).

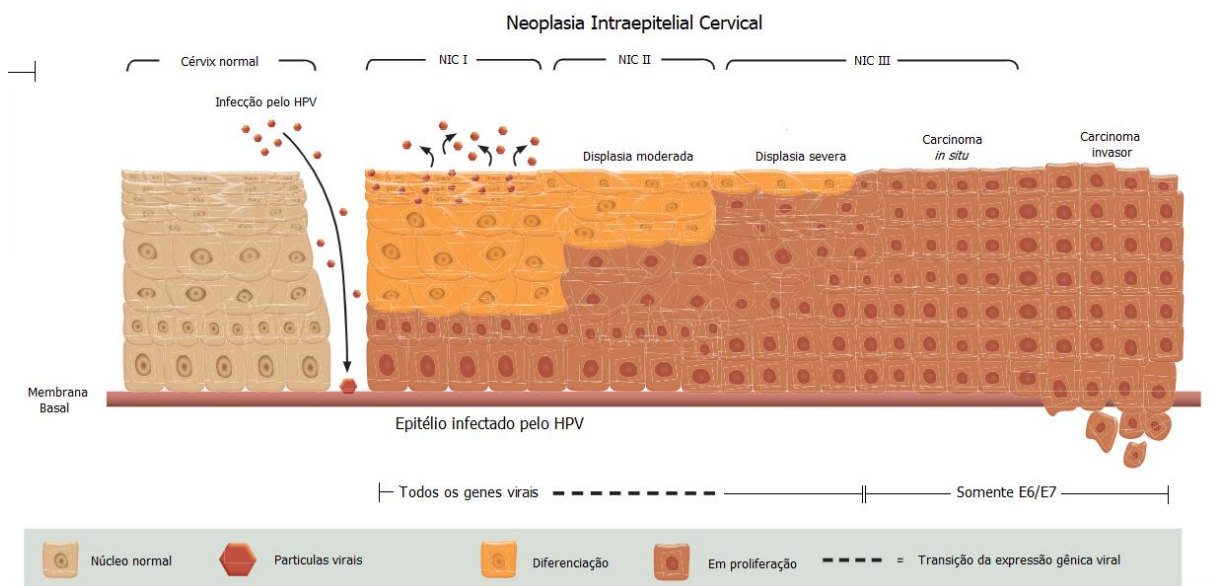
- Carcinoma de Células Escamosas

O CCE origina-se a partir de um processo progressivo de lesões pré-cancerosas, caracterizadas por seus graus leve (Neoplasia Intraepitelial Cervical I ou NIC I), moderado (NIC II) e grave (NIC III), de acordo com a classificação histológica de Richart, criada em 1975 (Richart 1975).

Em NIC I, observa-se lesão displásica leve, bem diferenciada, que se assemelha ao epitélio de origem, sendo visualizadas alterações em células maduras no terço superior do epitélio (camada superficial), pérolas córneas e grande produção de queratina (paraceratose). NIC II apresenta atipias celulares nas camadas superficial e intermediária, caracterizando uma displasia moderadamente diferenciada, com células mais pleomórficas e menos queratinizadas. Já em NIC III, observa-se alterações significativas em células parabasais, basais e metaplásicas, com pouca diferenciação e alta taxa de proliferação. As camadas superficial, intermediária e basal estão comprometidas, levando a perda da estratificação do epitélio, sendo por isso caracterizado como uma displasia acentuada e/ou carcinoma *in situ*, como apresentado na **Figura 3** (Berman and Schiller 2017).

O sistema Bethesda foi introduzido em 1988 com o intuito de incorporar os avanços do conhecimento sobre a carcinogênese cervical e unificar as terminologias citológicas em todo o mundo. Sendo assim, NIC I foi admitida como uma lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL, do inglês *low grade squamous intraepithelial lesion*), e NIC II e III, como lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL, do inglês *high grade squamous intraepithelial lesion*) (Crosbie, Einstein *et al.* 2013).

**Figura 3 – Progressão de lesões intraepiteliais escamosas até o carcinoma invasivo.**



**Figura 3.** Representação do processo de infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) em células basais do epitélio estratificado escamoso e da progressão de lesões intraepiteliais escamosas, até carcinoma cervical invasor. A partir do Carcinoma *in situ* somente as proteínas



virais E6 e E7. Legenda: NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical), HPV (Papilomavirus Humano). Fonte: (Berman and Schiller 2017) modificado por Isabella da Terra Borges.

A maioria das lesões pré-malignas e malignas de células escamosas cervicais aparece na zona de transição, a região que sofreu metaplasia escamosa entre a junção escamo-colunar original e a junção escamo-colunar (JEC). Essas lesões apresentam perda de diferenciação, distúrbios de maturação e maturação celular, assim como atipias nucleares variadas. À medida que a lesão avança em gravidade, atipias nucleares se intensificam e a relação núcleo/citoplasma aumenta (Williams, Werner *et al.* 2015).

Quando as alterações celulares não regridem espontaneamente, o que acontece na maioria dos casos, ou quando o sistema imune é incapaz de eliminar o vírus do organismo, a infecção pelo HPV e as lesões tornam-se persistentes, podendo evoluir para a malignidade (Crosbie, Einstein *et al.* 2013). A invasão das células neoplásicas no estroma, graças a perda de adesão e maior motilidade, marca a transição do Carcinoma *In Situ* para o Invasor (Hanahan and Weinberg 2011).

O CCE invasor acomete pacientes de 30 a 50 anos, com pico entre 45 e 50 anos, sendo diagnosticado por exame citológico (Papanicolau), colposcopia ou biópsia do tecido (Waggoner 2003). Seus sintomas dependem do tamanho e estágio do tumor, podendo ser assintomático quando pequeno, e causando corrimento e sangramento genital quando maior, chegando até mesmo a deformar o colo uterino (Lim, Landy *et al.* 2016). O tratamento das lesões intraepiteliais pode incluir cauterização por alta frequência (CAF), crioterapia ou eletrocirurgia de alça (LEEP). Porém, para o carcinoma invasor é necessária cirurgia de remoção da lesão, que por não ter margens bem definidas macroscopicamente, facilita a recorrência do tumor. O prognóstico depende da dimensão, profundidade e estadiamento da lesão, da idade da paciente, e se há ou não invasão da bexiga ou intestino, e metástases, sejam elas linfonodais (sacrais, ilíacas, para-aórticas e inguinais, principalmente) e/ou sistêmicas (acometendo geralmente medula óssea, pulmões e fígado) (Waggoner 2003)

- Adenocarcinoma Cervical

Segundo os Critérios e Classificação Internacional de Adenocarcinoma Endocervical (critérios IECC), os adenocarcinomas são subclassificados em variantes histológicas: usual, viloglandular, mucinoso, iSMILE, micropapilar e seroso-like (Stolnicu, Barsan *et al.* 2018, Hodgson, Olkhov-Mitsel *et al.* 2019, Hodgson, Park *et al.* 2019). Adenocarcinoma do tipo

endocervical (ACE), também conhecido como usual, representa cerca de 70% de todos os diagnósticos de ACC, (Pirog 2017) estando comumente associado ao CCE. Origina-se em células de reserva do epitélio glandular e acomete o endocérvice, sendo por esse motivo menos detectado em programas de triagem (Williams, Werner *et al.* 2015).

Assim como o CCE, o ACE é precedido por lesões endocervicais, como lesão intraepitelial glandular de baixo e alto grau e o adenocarcinoma *in situ*. A literatura aponta que a obesidade, multiparidade, uso de contraceptivo oral como terapia para reposição hormonal e a o câncer endometrial são fatores de risco para o desenvolvimento dessas lesões displásicas e, conseqüentemente, desse tipo de tumor (Fujiwara, Yokota *et al.* 2014).

O ACE pode ser bem, moderadamente ou pouco diferenciado e exibe diferentes padrões de invasão (infiltrativa/destrutiva, glandular ou papilífera/viloglandular). A invasão infiltrativa, geralmente observada em tumores bem diferenciados, caracteriza-se por glândulas malignas irregulares e interconectadas que invadem o estroma, levando a desmoplasia, edema e/ou inflamação. Já a invasão glandular, característica dos tumores moderadamente diferenciados, possui um crescimento mais denso, no qual as glândulas cribiformes estão fundidas entre si, sendo exofítica, endofítica ou ambas. Por fim, a invasão papilar ou viloglandular, que também pode ser puramente exofítico, endofítico ou uma combinação de ambos, possui estruturas vilosas, viloglandulares e/ou papilíferas alongadas (Ronnett 2016, Pirog 2017). Os adenocarcinomas pouco diferenciados apresentam áreas sólidas de células indiferenciadas, chegando a ser indistinguível do CCE pouco diferenciado (Pirog 2017).

O diagnóstico preciso desta doença é imprescindível para a escolha do tratamento, distinguindo-o do CCE, uma vez que, clinicamente, o adenocarcinoma também provoca corrimentos e sangramentos vaginais; e do Adenocarcinoma Endometrial, já que em estágios avançados, o ACE pode se espalhar pelo útero, tornando difícil sua distinção (Barroeta, Pasha *et al.* 2007). O tratamento depende do estadiamento e tamanho do tumor, sendo a histerectomia parcial ou total, radioterapia e quimioterapia, os comumente realizados. De modo geral, o ACE possui pior prognóstico do que o CCE, pois apresenta menor sensibilidade a radioterapia e altas chances de ter metástases linfonodais (Fujiwara, Yokota *et al.* 2014).

### **1.2.2.1. MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*: CÉLULAS HELA**

Em fevereiro de 1951, Henrietta Lacks, de 31 anos, foi ao hospital queixando-se de sangramentos recorrentes entre o período menstrual. O exame do cérvix revelou uma lesão

elevada, suave, brilhante e de cor arroxeadada, com menos de 2,5 cm de diâmetro, confinada ao colo do útero (Jones 1997). A análise da biópsia da lesão descreveu-a, inicialmente, como um carcinoma epidermóide do colo uterino de células tipo espinhais, com invasão do estroma. Um fragmento da lesão também foi enviado para o Dr. George Gey, diretor do Laboratório de Cultura Tecidual do Hospital Johns Hopkins, que colocou as células coletadas em cultura utilizando uma técnica de tubo de rolo. As células, nomeadas “HeLa” devido as duas primeiras letras do nome e sobrenome da paciente, expandiram-se grandemente e se tornaram a primeira linhagem de célula neoplásica humana imortalizada *in vitro* (Jones 1997).

Após 20 anos, reexaminaram-se as lâminas histopatológicas da biópsia de Henrietta Lacks e o laudo de sua autópsia, e perceberam que a paciente possuía, na verdade, um adenocarcinoma do colo do útero muito agressivo, que levou ao seu rápido deterioramento clínico (Schwartz, Hadjimichael et al. 1996). Além disso, verificou-se que as células HeLa contêm o DNA do Papilomavirus Humano (HPV) 18, ou seja, são HPV18 positivas. Este tipo de vírus está associado ao desenvolvimento de adenocarcinomas agressivos, o que explica o rápido crescimento das células em cultura, seja em meio de plasma de galinha, extrato de embrião bovino ou soro do cordão placentário humano (Boshart, Gissmann et al. 1984, Meissner 1999, Luft, Klaes et al. 2001, Xiao, Fu et al. 2015).

Pesquisadores e cientista têm utilizado as células HeLa para desenvolver práticas laboratoriais de congelamento e cultura de células e tecidos; estudar sobre a natureza de diversos tipos de câncer, principalmente do carcinoma cervical; clonagem de células e mapeamento de genes; desenvolvimento de vacinas, como a da poliomielite; tratamento de doenças e compreensão dos patógenos e mecanismos envolvidos por trás delas. Mesmo após 71 anos de sua descoberta, as células HeLa possuem grande importância e utilidade para as mais diversas áreas do meio científico, estando presente em milhares de laboratórios ao redor do mundo (Kasvi 2018).

#### **1.2.2.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

Sabe-se que a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é a causa de 99,7% dos cânceres cervicais invasores (Walboomers, Jacobs et al. 1999, Petry 2014), seja CCE ou ACC, onde os tipos 16, 18, 31 e 45 são os mais comuns (Williams, Werner et al. 2015).

O HPV, pertencente à família *Papillomaviridae*, é um vírus relativamente pequeno, de capsídeo icosaédrico não envelopado. (Dunne and Park 2013) Seu genoma circular de 8 kb é dividido em três regiões: região reguladora (LCR ou URR), responsável pela regulação da replicação e

transcrição do DNA viral; região precoce (*Early-region*), que codifica as proteínas E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, e região tardia (*late-region*), que produz proteínas constituintes do capsídeo do HPV (L1 e L2) (Fang, Zhang et al. 2014). As proteínas E1 e E2 se ligam ao DNA e são responsáveis pela replicação e segregação do DNA viral, sendo que E1 promove diretamente sua replicação, atuando como uma helicase, enquanto E2 auxilia E1 e ativa a síntese do RNAm viral. Sabe-se também que a proteína E2 tem um papel regulador na transcrição dos genes virais transformadores E6 e E7. A proteína E4 rompe citoqueratinas e promove a liberação das partículas virais. Já a oncoproteína E5 estimula a multiplicação celular ao estabilizar o receptor do fator de crescimento epidérmico, tornando as células mais sensíveis aos sinais de multiplicação. E6 e E7, por sua vez, inativam as proteínas supressoras da multiplicação: E6 se liga a proteína p53, impedindo a apoptose após dano ao DNA, e a proteína E7 se liga ao pRb, ignorando o check point G1/S e permitindo a progressão do ciclo celular e da replicação, o que leva ao acúmulo de mutações na célula (Amaro-Filho, Pereira Chaves *et al.* 2018) (Tjalma, Van Waes *et al.* 2005).

A maioria dos indivíduos sexualmente ativos será infectada por HPV em algum momento de suas vidas. (Burd and Dean 2016). A transmissão do vírus ocorre através do contato de mucosa com mucosa (Petry 2014), seja oral-genital ou genital-genital (Chelimo, Wouldes et al. 2013). Sabe-se também que o coito vaginal ou anal é a principal via de infecção, daí a grande importância do uso de preservativos. Porém o uso desses não protege adequadamente os indivíduos uma vez que as regiões labial, escrotal, anal e vulvar estão desprotegidas e são áreas potenciais de transmissão (Winer, Hughes et al. 2006, Stanley 2010). Para que ocorra a infecção pelo HPV, o epitélio cutâneo ou mucoso deve apresentar microtraumas ou microfissuras para que o vírus se ligue aos proteoglicanos de sulfato de heparina das células da camada epitelial basal ou das células metaplásicas da zona de transição, através das proteínas virais constituintes do capsídeo L1 e L2, como demonstrado na **Figura 3** (Burd 2003).

Atualmente, mais de 200 tipos de HPV já foram sequenciados (Burd 2003, Burd and Dean 2016), e são agrupados de acordo com seu genótipo em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ , e  $\nu$  (Graham 2017). O grupo  $\alpha$  constitui o maior de todos os grupos, contendo 64 tipos de HPV que infectam predominantemente a mucosa epitelial, como o revestimento da boca, garganta, o trato respiratório e o trato anogenital (Burd 2003). Destes, 15 deles são considerados de alto risco por serem potencialmente oncogênicos. O segundo maior grupo é o  $\beta$ , com 50 membros, que possuem tropismo pelo epitélio cutâneo, visando a pele das mãos e dos pés. Já os HPVs

remanescentes nos demais grupos ( $\gamma$ ,  $\mu$ , e  $\nu$ ) normalmente causam apenas doenças benignas (Graham 2017).

Baseado no tipo de patologia que podem causar, os vírus são divididos em duas categorias: de baixo risco e de alto risco. Entre os tipos de baixo risco estão 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, e 81, associados ao desenvolvimento de verrugas (Chelimo, Wouldes et al. 2013). Estudos recentes mostram que aproximadamente 90% das verrugas genitais, também conhecidas como condiloma acuminata, são causadas por HPV6 e HPV11 (Lacey 2005). São altamente contagiosas e geralmente desenvolvem-se de 2 a 3 meses após a infecção, mas devido ao grande período de incubação (entre três semanas a oito meses) podem demorar a aparecer (Lacey, Lowndes et al. 2006). Surgem em locais de grande atrito, como na vulva, vagina, cérvix, uretra, períneo, escroto e glândula do pênis, sendo possível visualizá-las a olho nu como pequenas pápulas (com aspecto de couve-flor) ou planas, lisas ou pedunculadas (Weaver 2006).

As verrugas genitais são normalmente benignas e assintomáticas, e uma vez que se desenvolvem podem se manter iguais, tornar-se maiores ou numerosas, ou regredir espontaneamente, com ou sem tratamento, entre 3 a 6 meses. Entretanto, há grandes chances de recorrência, causando frequentes visitas a médicos, tratamentos caros e estresse psicológico ao paciente (Lacey 2005, Weaver 2006, Chelimo, Wouldes et al. 2013). O diagnóstico se dá através da inspeção visual direta, mas biópsias podem ser feitas para confirmá-lo quando as lesões são atípicas (pigmentadas, ulceradas, hemorrágicas). Condiloma latum, molusco contagioso, queratoses seborréicas, nervos displásicos, e pápulas penianas são alguns exemplos de diagnósticos diferenciais que geralmente exigem biópsia da lesão (Wiley, Douglas et al. 2002). O diagnóstico correto é essencial para um bom tratamento, quando necessário. Os tratamentos consistem em aplicação de pomadas pelo próprio paciente, como Podofilox 0,5%, Imiquimod 3,75% ou 5%, e Sinecatechins 15%; crioterapia com nitrogênio líquido; ácido tricloroacético (TCA); ácido bicloroacético de 80% a 90%; e remoção cirúrgica, que consistem em excisão de tesoura tangencial, curetagem ou eletrocirurgia (Lacey 2005, Dunne and Park 2013).

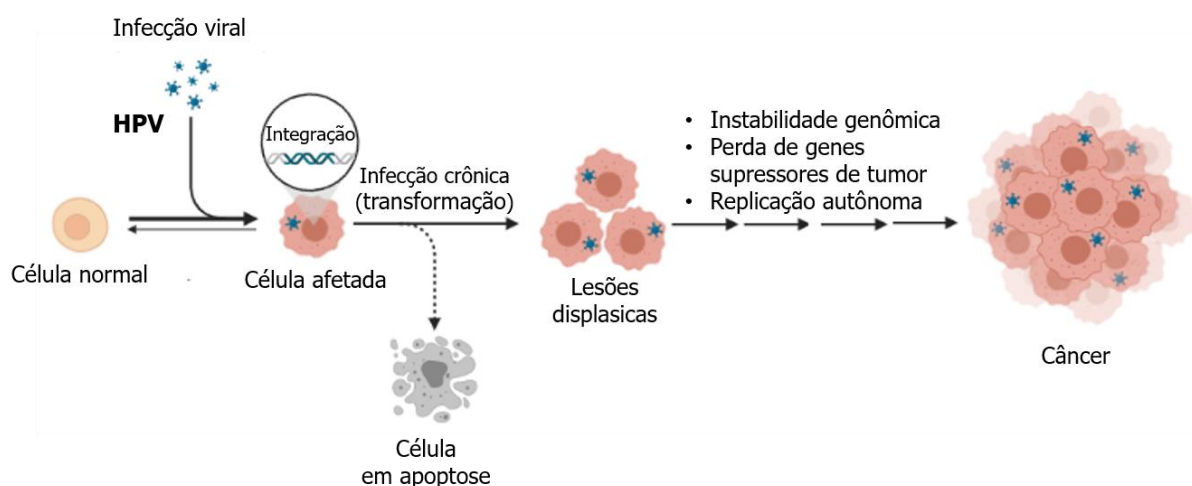
Os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70 de HPV são classificados como de alto risco e estão diretamente relacionados à carcinogênese (Burd 2003, Burd and Dean 2016). Ainda nos anos 70, o virologista alemão Harald zur Hausen foi o primeiro a descrever a associação entre os tipos 16 e 18 de HPV e câncer cervical (zur Hausen 1987, zur Hausen 2002, zur Hausen 2009, zur Hausen 2009). Porém, outros tipos de HPV já foram

relacionados a diferentes tipos de cânceres, como de orofaringe, cabeça e pescoço, ovário, vulva, anus e pênis (Marur, D'Souza et al. 2010, Stratton and Culkin 2016, Berman and Schiller 2017, Hoff, Coudry et al. 2017, Wakeham, Kavanagh et al. 2017, Hammou, Benhessou et al. 2019, Mahal, Catalano et al. 2019).

O genoma viral é mantido em baixo número de cópias como DNA episossomal no núcleo da célula infectada, que vai mudando sua expressão conforme a célula se move em direção a superfície epitelial (Berman and Schiller 2017). Em infecções persistentes, os vírus podem ter seu genoma quebrado nos genes E1 e E2 para ser incorporado e integrado ao genoma da célula hospedeira (forma integrada do HPV), fazendo com que tais genes sejam inativados. Como a proteína E2 atua na transcrição dos genes E6 e E7, sua inativação permite a superexpressão dos genes e das oncoproteínas E6 e E7, que podem promover o desenvolvimento de neoplasia. Dessa maneira, a replicação viral é comprometida, mas não o potencial neoplásico do HPV (Amaro-Filho, Pereira Chaves *et al.* 2018) (Cricca, Venturoli *et al.* 2009).

A conclusão do ciclo de vida do HPV ocorre tanto em lesões de baixo grau quanto de alto grau, porém em diferentes níveis, devido à presença de HPV em forma mista (episossomal e integrado) em lesões de alto grau (Kadaja, Sumerina *et al.* 2007). Sabe-se que quanto mais grave a lesão, maior o percentual de integral viral, uma vez que a progressão da doença está associada à desregulação da expressão gênica precoce (*early*) do vírus e perda da expressão gênica tardia (*late*) (Groves and Coleman 2015). A infecção prevalente ou crônica pelo HPV promove, basicamente, a instabilidade genômica, perda de genes supressores de tumor e autonomia replicativa das células, culminando no estabelecimento do câncer, conforme a **Figura 4**.

**Figura 4 – Carcinogênese viral pelo HPV**



**Figura 4.** Representação esquemática da carcinogênese viral devido à infecção por Papilomavirus Humano (HPV). Quando persistente, a infecção torna-se crônica, promovendo alterações displásicas nas células hospedeiras. As proteínas virais E6 e E7 são as principais responsáveis pelo desequilíbrio entre a proliferação celular e apoptose, ao inibir a ação das proteínas p53 e pRB, respectivamente. Dessa forma, promovem uma instabilidade genômica, replicação autônoma e hiperplasia das células, resultando em uma neoplasia. Fonte: BioRender (modificado por Isabella da Terra Borges).

Através de estudos *in vitro*, Kadaja e colaboradores propuseram um mecanismo pelo qual o HPV causa instabilidade genômica, denominado *de novo*. Inicialmente, o HPV encontra-se em altos níveis na forma epissomal em lesões de baixo grau. Com o passar do tempo e o aumento da carga viral devido à replicação do vírus, começam a surgir formas aberrantes que desencadeiam um sistema de alerta da célula hospedeira (Kadaja, Sumerina *et al.* 2007). Pensa-se que esse sistema é capaz de fazer com que o material genético viral se linearize e integre ao genoma celular, de maneira que o HPV exista de forma mista, tanto na epissomal quanto integrado. Dessa forma, os vírus que estão na forma epissomal produzem normalmente as proteínas E1 e E2, que atuam sobre a integrada, fazendo-a se replicar e, conseqüentemente, aumentando a carga viral. Esse processo de replicação e integração continua, sendo que quanto mais integrações do vírus, mais quebras no genoma celular e mais metilações nas regiões flangeadoras com inativação dos genes das vizinhanças. Isso, somada a ação das oncoproteínas E6 e E7, promove uma instabilidade genômica gigantesca, acelerando o agravamento da lesão (Kadaja, Sumerina *et al.* 2007).

### 1.2.3. ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA (EOC)

As técnicas de reprodução humana assistida (RHA) auxiliam na preservação da fertilidade assim como gravidez de casais homoafetivos e tratamento de casais inférteis. Dentre as técnicas de RHA, a Fertilização *In Vitro* (FIV) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection* - ICSI) necessitam de oócitos maduros para serem fertilizados, que são coletados de folículos ovarianos após uma superestimulação ovariana (Mantikou, Youssef *et al.* 2013, O'Neill, Chow *et al.* 2018). Um dos procedimentos padrões dessas técnicas é induzir a ovulação das mulheres (com algum grau de infertilidade ou não) através de um protocolo de estimulação ovariana controlada (EOC), utilizando-se de drogas que atuam no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, estimulando a produção e liberação do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e, conseqüentemente, a maturação dos folículos ovarianos. A escolha e

dosagem da droga a ser utilizada pela paciente depende da reação de seu organismo ao estímulo dado (Alper and Fauser 2017), sendo o Citrato de Clomifeno (CC) e o Letrozol (LET) os mais conhecidos e utilizados na clínica.

A maioria das pacientes que realizam a EOC necessita de mais de um ciclo para atingir a gravidez, resultando em uso repetitivo dos medicamentos indutores de ovulação (Luk and Arici 2010). Então, ainda que muito utilizados atualmente, a segurança desses medicamentos a longo prazo vem sido questionada principalmente em pacientes oncológicos, uma vez que ao serem utilizados múltiplas vezes, levam a um desbalanço hormonal considerável por atuarem diretamente na liberação de hormônios endógenos (Lambertini, Anserini et al. 2016, Akel, Guo et al. 2020). Para elucidar as dúvidas acerca dos riscos da EOC e o desenvolvimento de neoplasias, assim como seus efeitos na promoção e progressão tumoral, vários estudos investigaram a possível relação entre as drogas estimulantes de ovulação e o desenvolvimento de câncer de mama, ovário, endométrio, tireoide, cólon, colo de útero, pele, e do sistema nervoso central (Potashnik, Lerner-Geva et al. 1999, Dor, Lerner-Geva et al. 2002, Kristiansson, Bjor et al. 2007, Yli-Kuha, Gissler et al. 2012, Siristatidis, Sergentanis et al. 2013, Reigstad, Larsen et al. 2015, Reigstad, Larsen et al. 2015, Kessous, Davidson et al. 2016).

No entanto, a maioria dos trabalhos publicados são observacionais e observa-se erros e até mesmo uma falta de controle adequado sobre as populações investigadas, levando em consideração os múltiplos fatores que influenciam o desenvolvimento de neoplasias. É observado também em alguns estudos, uma falta de acompanhamento das pacientes que passaram por EOC à longo prazo. Tudo isso limita as metodologias desses estudos e dificulta sua interpretação. Além disso, a incidência destes cânceres é baixa e geralmente ocorrem tardiamente na vida, dificultando a correlação com sua causa (Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016).

### **1.2.3.1. CITRATO DE CLOMIFENO**

O citrato de clomifeno (CC) é um derivado não esteroide de trifeniletileno, composto por uma mistura racêmica de isômeros trans e cis, conhecidos como Euclomifeno e Zuclomifeno na proporção de 3:2, respectivamente. Pertence a classe dos moduladores seletivos de receptores de estrógeno e possui propriedades agonistas e antagonistas que dependem da proporção dos isômeros na mistura (Clark and Markaverich 1981). O CC foi relatado pela primeira vez em 1961 pelo cientista Greenblatt como MRL/41, um composto antiestrógeno capaz de induzir a ovulação em mulheres anovulatórias (Greenblatt, Barfield et al. 1961) sendo utilizado desde



então para o tratamento de infertilidade relacionada a não ovulação. Estudos prévios mostram que o zuclomifeno é mais potente para induzir ovulação, podendo ser o maior responsável pela atividade do citrato de clomifeno (Van Campenhout, Borreman et al. 1973).

Apesar de sua utilização, seu mecanismo de ação não é precisamente descrito. Pensa-se que por possuir estrutura semelhante ao estrógeno, o CC se conecta aos receptores de estrógeno, e impede a análise correta do nível de estrógeno endógeno. Há, conseqüentemente, a inibição do *feedback* negativo no hipotálamo, que aumenta a secreção do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH). Este, por sua vez, estimula a secreção de gonadotrofinas hipofisárias, o Hormônio Luteinizante (LH) e o FSH, cujos picos levam ao crescimento e desenvolvimento de folículos ovarianos (Rebar, Judd et al. 1976, Mikkelsen, Kroboth et al. 1986).

A dosagem utilizada do citrato de clomifeno varia de 50 a 250 mg por dia, dependendo da resposta do organismo de cada paciente (Brown and Farquhar 2016), e estima-se que sua meia-vida seja entre 5 a 7 dias, sendo excretada de forma inalterada principalmente pelas fezes (Bowdler 1972). Entretanto, há registros de que essa droga não é bem-sucedida em todas as mulheres, persistindo a anovulação entre 15% a 20% das pacientes após o tratamento. Tal resistência ao citrato de clomifeno, impedindo a estimulação ovariana, é associada à obesidade, resistência à insulina e hiperandrogenemia (Homburg 2005, Badawy, Abdel Aal et al. 2009, Brown and Farquhar 2016).

O CC tem sido utilizado como um intensificador da capacidade ovulatória para inseminação intrauterina (IIU) e como um adjuvante na estimulação gonadotrófica dos ovários para preparação da FIV (Homburg 2005). Há, contudo, algumas ressalvas: os índices de gravidez são baixos, ainda que os de ovulação sejam altos, possivelmente devido a alterações no muco cervical, dificultando a mobilidade do esperma; a um aumento nas taxas de aborto, uma vez que ocorre grande desequilíbrio hormonal nos primeiros meses de gestação, e à alteração do transporte tubário, impedindo a implantação do blastocisto na cavidade uterina no momento correto (Whitelaw, Kalman et al. 1970). Além disso, efeitos colaterais como náuseas, dores abdominais, alterações de humor, rubores, distúrbios visuais e desenvolvimento de cistos ovarianos foram relatados (Bowdler 1972, Homburg 2005). Logo, busca-se outros tratamentos através de novas drogas e diferentes mecanismos de atuação, que apresentem maiores índices de gravidez e menos efeitos indesejáveis.

### 1.2.3.2. LETROZOL

O Letrozol (4,40-[1H-1,2,4-triazol-1-ylmethylene]-bis-benzonitrile) é um inibidor de aromatase de terceira geração, e atua bloqueando a conversão de androstenediona e testosterona em estrógeno ao impedir a aromatização. Desta forma, reduz-se o nível de estrógeno circulante, o que diminui o *feedback* negativo no eixo hipotálamo-hipófise, que por sua vez aumenta a secreção de FSH pela hipófise, estimulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos (Badawy, Abdel Aal et al. 2009).

Aprovado pela FDA em 1997 para o tratamento de câncer de mama em mulheres pós-menopausa, o Letrozol foi utilizado pela primeira vez no tratamento de pacientes anovulatórias em 2001. Desde então, tem sido utilizado como segunda opção de tratamento, principalmente para aquelas pacientes com resistência ao CC. Ao contrário dele, o Letrozol não diminui a densidade dos receptores de estrógeno nem reduz a espessura do revestimento endometrial (Holzer, Casper et al. 2006), sendo utilizado para induzir ovulação em mulheres com a síndrome do ovário policístico ou câncer de mama, e para casais com infertilidade idiopática (Oktay, Hourvitz et al. 2006, Diamond, Legro et al. 2015, Goldrat, Gervy et al. 2015). Sua dosagem pode variar de 2,5 a 7,5 mg por dia, do terceiro ao sétimo dia do ciclo menstrual, e geralmente induz uma resposta monofolicular sem gerar tantos efeitos colaterais (Holzer, Casper et al. 2006, Pritts 2010).

Havia, inicialmente, questionamentos sobre possíveis efeitos teratogênicos do letrozol quando usado para induzir ovulação em pacientes, uma vez que os recém-nascidos apresentaram anomalias ósseas e cardíacas congênitas (Biljan 2005, Novartis Pharmaceuticals Canada Inc 2005, Tulandi, Martin et al. 2006), promovendo mais estudos nesse campo. Seus resultados demonstraram que não há correlação entre o uso dessa droga e o desenvolvimento de anomalias fetais (Tatsumi, Jwa et al. 2017), já que sua meia-vida de 45 horas garante o *clearance* antes que a implantação do embrião ocorra, diferentemente do citrato de clomifeno (Mitwally and Casper 2001, Mitwally and Casper 2002).

O letrozol, então, é um medicamento seguro, de administração oral, sem contraindicações significativas. Pode causar efeitos colaterais leves (como dor de cabeça, dor nas costas e astenia), e é bem tolerado na administração diária por anos, sem provocar acúmulo significativo de metabólitos. Após ingestão, apresenta 100% de biodisponibilidade, tendo rápida depuração pelo fígado. É extremamente potente e específico na inibição da enzima aromatase, sendo por isso muito utilizado na clínica para estimular ovulação (Mitwally and Casper 2004).

### 1.2.3.3. EOC x CÂNCER

Vários estudos investigaram a possível relação entre a estimulação ovariana e o desenvolvimento de câncer de mama, ovário, endométrio, tireoide, cólon, colo de útero, pele, e do sistema nervoso central (Potashnik, Lerner-Geva et al. 1999, Dor, Lerner-Geva et al. 2002, Kristiansson, Bjor et al. 2007, Yli-Kuha, Gissler et al. 2012, Siristatidis, Sergeantanis et al. 2013, Reigstad, Larsen et al. 2015, Reigstad, Larsen et al. 2015, Kessous, Davidson et al. 2016) Entretanto, a literatura ainda se mostra incerta sobre a possível correlação entre CC e LET e neoplasias. A grande maioria dos trabalhos é observacional, realizada a partir de coortes de mulheres em propedêutica de infertilidade que usaram esses medicamentos, e a falta de controle e acompanhamento adequado sobre as populações investigadas à longo prazo limitam as metodologias desses estudos, dificultando sua interpretação (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address and Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016).

De acordo com Hannibal e colegas, o câncer de tireoide está associado ao uso de medicamentos indutores de ovulação (Hannibal, Jensen et al. 2008); entretanto, segundo Althuis e Brinton, não há aumento significativo na incidência desta neoplasia quando relacionada ao uso de CC (Althuis, Scoccia et al. 2005, Brinton, Moghissi et al. 2015). Há também controvérsias a respeito do uso de CC e o desenvolvimento de melanoma, em que dois artigos citam um aumento do risco (Calderon-Margalit, Friedlander et al. 2009, Brinton, Moghissi et al. 2015), e outros cinco afirmam que não há associação (Rossing, Daling et al. 1995, Young, Purdie et al. 2001, Althuis, Scoccia et al. 2005, Hannibal, Jensen et al. 2008, Tomao, Papa et al. 2014). Já para o câncer de ovário, diversos trabalhos não observaram associação entre seu desenvolvimento e o uso de CC (Jensen, Sharif et al. 2009, Kurta, Moysich et al. 2012, Trabert, Lamb et al. 2013), mas estudos semelhantes apontaram um aumento no risco dessa neoplasia após tratamento para infertilidade utilizando o mesmo medicamento (van Leeuwen, Klip et al. 2011, Kessous, Davidson et al. 2016). Também se observa uma contradição para o câncer de mama e o uso de Citrato de Clomifeno, em que alguns trabalhos afirmam que não há correlação (Lerner-Geva, Rabinovici et al. 2012, Stewart, Holman et al. 2012), enquanto outros demonstram que há (Brinton, Scoccia et al. 2004, Gennari, Costa et al. 2015, Reigstad, Larsen et al. 2015). Para o câncer endometrial, a maioria dos estudos afirma que não há associação entre o uso de CC e o desenvolvimento deste tipo de tumor (Benshushan, Paltiel et al. 2001, Althuis, Moghissi et al. 2005, Lerner-Geva, Rabinovici et al. 2012, Brinton, Westhoff et al.

2013), mas ainda assim, há artigos que mostram associação positiva entre o uso de CC e este tipo de câncer (Parazzini, Pelucchi et al. 2010).

Por fim, para o câncer de colo de útero, a literatura apresenta estudos epidemiológicos, cujos resultados concordam que não há aumento na probabilidade em se desenvolver este tipo de neoplasia quando se utiliza drogas indutoras de ovulação (Potashnik, Lerner-Geva et al. 1999, Dor, Lerner-Geva et al. 2002, Kristiansson, Bjor et al. 2007, Lerner-Geva, Rabinovici et al. 2012, Yli-Kuha, Gissler et al. 2012, Li, Zhou et al. 2013, Siristatidis, Sergentanis et al. 2013, Reigstad, Larsen et al. 2015, Kessous, Davidson et al. 2016), sendo que alguns pesquisadores, inclusive, sugerem que o uso de citrato de clomifeno pode reduzir significativamente as chances de desenvolvimento de neoplasia cervical (Rossing, Daling et al. 1996).

Pouco se discute sobre a associação entre o uso de Letrozol e o desenvolvimento de neoplasias na literatura. Alguns trabalhos afirmam que a indução de ovulação com esta droga não estimula a reincidência câncer de mama, mesmo cinco anos após o diagnóstico (Kim, Turan et al. 2016), por exemplo. Além disso, observou-se que a combinação entre letrozol e raloxifeno melhora sua eficácia terapêutica contra células de câncer de mama (Vohora, Kalam et al. 2017)

Em 2019, foram realizados os primeiros experimentos avaliando os efeitos do Citrato de Clomifeno e Letrozol sobre o comportamento de células tumorais HeLa *in vitro* (Borges 2019). Este trabalho mostrou que ambas as drogas não possuem efeito citotóxico quando diretamente aplicadas sobre as células HeLa; pelo contrário, como as células tratadas com CC e LE mostraram aumento da metabolização do substrato Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5difeniltetrazolio] (MTT) e aumento do número de células nas fases S e G2 do ciclo celular em comparação a condição controle, supõe-se que as drogas podem contribuir para a promoção tumoral (Borges 2019).

## **2. JUSTIFICATIVA**

O avanço das técnicas de Reprodução Humana Assistida vem auxiliando diversos casais a terem filhos, em busca de tratamento e/ou preservação da fertilidade, e para casais homoafetivos. Estudos epidemiológicos afirmam que não há correlação entre a estimulação ovariana e o desenvolvimento de neoplasias cervicais (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address and Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016). Entretanto, não se sabe ao certo como células tumorais se comportam, em longo prazo, perante ao uso de drogas indutoras de ovulação e a continua estimulação devido

a repetição de ciclos de EOC. Já foi observado que o Citrato de Clomifeno e Letrozol estimulam o metabolismo e proliferação de células cervicais tumorais *in vitro* (linhagem celular HeLa) (Borges 2019). Logo, experimentos que permitam avaliar o efeito destas drogas sobre mecanismos de invasão e migração das células neoplásicas são necessários para compreender seus efeitos sobre a agressividade e progressão tumoral. Desta forma, pacientes com lesões pré-cancerosas, associadas a infecção de HPVs de alto risco, serão melhores assistidas em protocolos de EOC, a fim de evitar o avanço tumoral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Avaliar o efeito do Citrato de Clomifeno e Letrozol, drogas utilizadas para indução de ovulação, no metabolismo, ciclo celular e comportamento das células HeLa (câncer cervical), investigando os efeitos na Transição Epitélio-Mesênquima (TEM) como parâmetro para analisar o potencial migratório e invasor; assim como na carga viral do HPV nas células tratadas com as drogas.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Avaliar a citotoxicidade e o efeito do Citrato de Clomifeno e Letrozol no metabolismo das células HeLa através do teste de MTT;
- Avaliar os efeitos do Citrato de Clomifeno e Letrozol nas fases do ciclo celular das células HeLa por citometria de fluxo, utilizando o protocolo de marcação com iodeto de propídeo (HFS).
- Avaliar os efeitos na Transição Epitélio-Mesênquima (TEM), e quantificar a expressão dos genes CDH1 (ECAD), CDH2 (NCAD), ZEB-1 e ZEB-2 e SNAIL, em células HeLa tratadas com Citrato de Clomifeno e Letrozol através da técnica de PCR em tempo real, comparando com seu controle não tratado.
- Quantificar e analisar a carga viral do vírus HPV através da dosagem de HPV18, por PCR em tempo real, em células HeLa tratadas com Citrato de Clomifeno e Letrozol, comparando com seu controle não tratado.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. LINHAGEM CELULAR E CULTIVO

A linhagem celular utilizada neste projeto foi a HeLa, provenientes de um adenocarcinoma invasor de colo uterino (Harvey 1976, Lucey, Nelson-Rees et al. 2009). As células HeLa foram gentilmente concedidas pela professora Adriana Abalen Martins Dias, coordenadora do Laboratório de Genética Experimental (LGEX) ao Laboratório do Comportamento Celular (LCC), sendo mantidas em criopreservação em freezer -80°C.

Para descongelamento e expansão celular, mergulhou-se o fundo do criotubo em água morna (37°C), despejando seu conteúdo em um tubo falcon com 5 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Este tubo falcon foi centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm, para então descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* de células em 5 mL de meio de cultura completo. As células foram transferidas para uma placa de cultura de 100 mm<sup>2</sup> e incubadas em estufa de atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Para a realização dos experimentos, aguardou-se a expansão celular até obter uma monocamada saudável com 70-80% de confluência. As células foram tratadas com 2 mL tripsina a 1% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) durante 2 minutos, coletadas e centrifugadas. Após ressuspê-las em meio de cultura, retirou-se uma alíquota de 10 µL para a contagem das células utilizando Câmara de Neubauer, sem azul de tripan.

Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata, após tempos de 24 e 48 horas de tratamento com as drogas, citrato de clomifeno e letrozol, sendo uma placa para cada tempo. As células em condição controle de cada placa foram mantidas apenas em meio DMEM, suplementado a 10% de SFB e 1% de antibiótico. Mais tempos de análise não serão utilizados uma vez que pode ocorrer o esgotamento da cultura, levantando dúvidas se os resultados obtidos são realmente provenientes do efeito das drogas.

### 4.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MTT

O ensaio colorimétrico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], conhecido como MTT, determina a viabilidade celular, à partir da capacidade de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias e citoplasma de células viáveis, em reduzir o anel de tetrazólio, formando cristais de formazan de coloração azul. A presença e acúmulo desses cristais em

células metabolicamente viáveis são medidos através da leitura em espectrofotômetro (Mosmann 1983).

Após a contagem, as células foram dispostas em placas de cultivo de 96 poços na densidade de 4000 células por poço para o tratamento de 24 horas e 48 horas, e incubadas 24 horas para aderência. A definição dessa densidade de células para o plaqueamento se deu a partir de duas análises prévias da expansão celular, em que se observou que densidades menores, como de 2000 células/poço, não atingiam a confluência de 70-80% após 24 horas de aderência. Uma baixa confluência das células pode prejudicar seu crescimento e desenvolvimento, fazendo com que não estejam saudáveis na hora do tratamento.

Após o período de aderência, as células foram tratadas em triplicata com diferentes concentrações de Citrato de Clomifeno (2000 ng/mL, 200 ng/mL, 20 ng/mL e 2 ng/mL) e Letrozol (4000 ng/mL, 400 ng/mL, 40 ng/mL e 4 ng/mL), de acordo com a literatura, e novamente incubadas em estufa por 24 e 48 horas. Após incubação, retirou-se o sobrenadante da placa utilizando-se uma bomba de vácuo, e adicionou-se 100 µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 0,25 mg/mL. A placa foi novamente incubada por 4 horas, ao abrigo da luz. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro VersaMax™ *Microplate Reader* da *Molecular Devices* a 570 nm, no Laboratório de Patologia Comparada (LPC) situado no Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

### **4.3. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR**

Para avaliar os efeitos das drogas sobre o ciclo celular das células HeLa, semeou-se as mesmas em placa de 12 poços (50.000 células/poço), incubando-as por 24 horas para aderência. Após a aderência, 4 poços foram mantidos para controle, outros 4 foram tratados com Citrato de Clomifeno a 2000 ng/mL, e outros 4 com Letrozol a 4000 ng/mL, mantendo-as novamente em estufa por 24 e 48 horas. Essas concentrações foram selecionadas para avaliação do ciclo celular baseado nos resultados do ensaio de MTT e para mimetizar a condição de pacientes que realizam mais de um protocolo de EOC, em que suas células são expostas por várias vezes a altas concentrações das drogas.

Após a incubação, o sobrenadante dos poços foi coletado, e as células aderidas foram tripsinizadas e também coletadas, formando um *pool* de células. As células foram centrifugadas

e o *pellet* formado foi ressuspensionado em PBS. Transferiu-se o PBS com as células para tubos específicos para citometria de fluxo, e esses foram centrifugados. Em seguida, as células foram ressuspensionadas em 300  $\mu$ L de solução fluorocromica hipotônica (HFS), contendo 50  $\mu$ g/mL de Iodeto de Propídeo (PI) (BD Biosciences, EUA) e 0,1% de triton X-100 em citrato de sódio a 0,1%. Incubou-se as células a temperatura de 4°C durante 1 hora, levando-as em seguida para análise em quadruplicata no citômetro de fluxo *FACScan*<sup>TM</sup> (BD Biosciences, EUA), utilizando o programa BD *FACSCellquest* (BD Biosciences, EUA). A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa *FlowJo* versão v.10 (Tree Star, EUA).

#### **4.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS HELA**

##### **4.4.1. EXTRAÇÃO DE RNA**

Após 24 e 48 horas de tratamento com 2000 ng/mL de Citrato de Clomifeno e 4000 ng/mL de Letrozol, as células HeLa foram tripsinizadas e coletadas para extração de RNA, formando um pool de células para as condições controle, tratamento com CC e com LE. Foram adicionados 500  $\mu$ L de TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelado em cada tubo, homogeneizando e incubando por 7 minutos em seguida. Adicionou-se 200  $\mu$ L de clorofórmio, agitando vigorosamente. Após incubar por 2 a 3 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos, entre 2 a 8°C. A fase aquosa (incolor), que contém o RNA, foi então transferida para outro tubo, onde se adicionou 500  $\mu$ L de álcool isopropílico. Após homogeneização e incubação de 10 minutos, os eppendorfs foram centrifugados novamente por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* lavado com 1 mL de álcool etílico 70%. Depois de agitar no vórtex e centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos, o *pellet* ficou a temperatura ambiente para secar, e sendo posteriormente ressuspensionado em 20  $\mu$ L de água DEPC (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A quantificação do RNA obtido foi feita no *NanoDrop Lite* (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware, USA).

##### **4.4.2. RT-PCR e Q-PCR (Transcrição reversa e PCR em tempo real quantitativo)**

A partir deste RNA extraído foi feita a síntese de cDNA por RT-PCR, utilizando-se o kit SuperScript® III *First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®), seguindo o protocolo do fabricante sem modificações.



As amostras de cDNA, com cerca de 66 ng, foram aplicadas em duplicatas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), no volume final de reação de 20 µL, e submetidas ao protocolo de PCR em tempo real, no equipamento ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG), utilizando-se o KitSYBR Green® PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para avaliar a expressão gênica relativa dos genes-alvo (ECAD, NCAD, ZEB1, ZEB2 e SNAIL), utilizou-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , comparando as condições de tratamento e a condição controle (Livak and Schmittgen 2001).

Os primers que foram utilizados (*GAPDH Foward, GAPDH Reverse, E-cadherin Foward, E-cadherin Reverse, N-cadherin Foward, N-cadherin Reverse, ZEB1 Foward, ZEB1 Reverse, ZEB2 Foward, ZEB2 Reverse, SNAIL Foward, SNAIL Reverse*) estão desenhados na tabela a seguir (Tabela 1).

**Tabela 3.** Primers e respectivas sequências para avaliar TEM

Gene	Primers	Sequência de nucleotídeos	Tamanho (pb)	Acesso GenBank
<b>GAPDH</b>	Forward	5'- TGGGTGTGAACCATGAGAAG -3'	125	NM_001289746.1
	Reverse	5'- GAGTCCTTCCACGATACCAAAG -3'		
<b>ECAD</b>	Forward	5'- CCCTTCACAGCAGAACTAAC -3'	108	NM_001317185.1
	Reverse	5'- CACCTCTAAGGCCATCTTTG -3'		
<b>NCAD</b>	Forward	5'- GGACCGAGAATCACCAAATG -3'	94	NM_001308176.1
	Reverse	5'- CGTTCCTGTTCCACTCATAG -3'		
<b>ZEB1</b>	Forward	5'- GAGGTGACTCGAGCATTTAG -3'	123	NM_001323654.1
	Reverse	5'- TTCTGTCTCGTCCGTAAC -3'		
<b>ZEB2</b>	Forward	5'- CATAGGCAGGTCAGAATAC -3'	122	NM_032991.2
	Reverse	5'- GATAAATAGGCGACCTGTGC -3'		
<b>SNAIL</b>	Forward	5'- GGACAGAGTCCCAGATGAC -3'	129	NM_001229.5
	Reverse	5'- GGACAGAGTCCCAGATGAC -3'		

## 4.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA VIRAL (HPV)

### 4.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL

A extração do DNA foi realizada utilizando o protocolo TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a partir da interfase e da fase orgânica que permaneceram após a remoção da fase aquosa, contendo RNA. O processo foi realizado de acordo com as orientações do fabricante, seguido de quantificação de DNA (NanoDrop Lite - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA).

### 4.5.2. PCR CONVENCIONAL E Q-PCR

Para avaliar a presença e integridade de DNA viral, realizou-se uma PCR convencional para amplificação do fragmento de DNA referente a proteína L1 do HPV, utilizando os primers GP5+ e GP6+. A amplificação seguiu o desenho experimental: estágio 1: 95°C por 3 min; estágio 2: 40 ciclos a 95°C por 15s, 45°C por 30s e 72°C por 15s; estágio 3: 72°C por 5 min e 4°C ∞. Os fragmentos foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, revelado com nitrato de prata (**Anexo 8.2**).

Para a amplificação e detecção de HPV por q-PCR, utilizou-se 20 ng de DNA extraído em duplicata para cada condição. Seguiu-se este desenho experimental: estágio 1: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min; estágio 2: 95°C por 15s e 60°C por 60s; estágio 3 (*melting*): 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 60s e 95°C por 1s; e estágio 4: 4°C por ∞. Os primers usados para as reações de PCR de HPV são descritos na Tabela 2. Para avaliar a presença do gene-alvo, utilizou-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , comparando as condições tratadas com a controle (Livak and Schmittgen 2001).

**Tabela 2.** Primers e respectivas sequências para avaliar carga viral do HPV

	Primers	Sequência de nucleotídeos	pb	Acesso GenBank
<b>HPV L1</b>	GP5+	5'- TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC -3'	150	MN909342.1
	GP6+	5'- GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC -3'		
<b>HPV 18+</b>	ForHPV18	5'- CAGTGCCATTCGTGCTGCAA -3'	142	MN909342.1
	RevHPV18	5'- GGAATTTTCATTTTGRGGCTCTAAA -3'		

#### **4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Todos os dados estatísticos foram obtidos com o software *GraphPad Prism*, versão 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). Os resultados foram analisados pelos métodos *One-Way ANOVA* ou *Two-Way ANOVA*, e suas possíveis correlações foram realizadas pelo Teste *Tukey's Multiple Comparisons* ou *Sidak's Multiple Comparisons*. O nível de significância para associações e correlações foi estabelecido em p inferior a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

#### **5. ARTIGO**

Os dados deste trabalho serão apresentados no formato de artigo científico, redigido de acordo com as normas do periódico internacional ao qual será submetido. O periódico de escolha será *Cell Biology International* ou *Journal of Women's Health*. *Cell Biology International* possui classificação Qualis CAPES B2 na área de avaliação Medicina II para o quadriênio de 2013-2016; e fator de impacto de 3.612 para o período de referência de 2021-2022. Já *Journal of Women's Health* possui classificação Qualis CAPES B1 na área de avaliação Medicina II para o quadriênio de 2013-2016; e fator de impacto de 2.681 para o período de referência de 2020-2021.

**Title:** Clomiphene Citrate and Letrozole effects in human cervical adenocarcinoma cell cycle, EMT behavior, and HPV viral load.

**Authors:** <sup>1</sup>Isabella da Terra BORGES, <sup>1</sup>Thaís Salviana RIBEIRO, <sup>1</sup>Felipe Henrique SILVA, <sup>1</sup>Pedro Henrique Dias Moura PRAZERES, <sup>1</sup>Camila Pereira ALMEIDA, <sup>2</sup>Márcia Cristina FERREIRA, <sup>1</sup>Enio FERREIRA, <sup>1</sup>Helen Lima DEL PUERTO

**Affiliation:**

<sup>1</sup>Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

**Running title:** Clomiphene citrate and letrozole in HeLa cells behavior and HPV viral load

**Corresponding author:**

Helen L. Del Puerto, PhD

Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences

Federal University of Minas Gerais

Antônio Carlos Av, 6627, Pampulha

31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Phone number: +55 31 3409-2599

e-mail: [helendelpuerto@ufmg.com](mailto:helendelpuerto@ufmg.com)

## Abstract

Clomiphene Citrate (CC) and Letrozole (LET) are ovulation-inducing first-line drugs to treat anovulatory infertility in young women. Epidemiological studies investigate the relationship between the use of these drugs and the risk of cancer. However, there is no data in the literature evaluating the effect of these drugs *in vitro*, especially for the cervical cancer cell line. Thus, the present study intends to investigate the effect of CC and LET in HeLa cervical cancer cell line, evaluating cell viability and metabolism, cell cycle, mRNA expression of genes involved in epithelial-mesenchymal transition, and HPV viral load. Cells were treated with CC (2, 20, 200, and 2000 ng/ml) and LET (4, 40, 400, and 4000 ng/ml) for 24 and 48 hours, followed by MTT assay, cell cycle through flow cytometry, and qPCR experiments. Results indicated that CC increases cell metabolism (over 75%) and induces cells to go through the G1 to S phase and from the S to G2 phase compared to control cells after 48 hours of treatment. Compared to CC, LET treatment increases cell metabolism (over 70%), decreasing cell percentage in the G1 phase and increasing in the S phase after 24 hours of treatment. Other than that, an upregulation was found on *ZEB1*, *ZEB2*, and *SNAIL* gene expression after 24 hours of treatment with 2000 ng/mL CC, as well as on *ZEB1* and *SNAIL* expression after 24 hours with 4000 ng/mL LET. *NCAD* exhibited an upregulation after 48 hours of treatment with CC and LET, while *ECAD* expression had no changes induced by any drugs. HPVs' viral load was lower on HeLa cells treated with CC and LET for 24 hours, compared to control cells. However, after 48 hours, both drugs exhibited higher viral load. These finds suggest that CC and LET increase cell metabolism, modulate the expression of genes related to the epithelial-mesenchymal transition in HeLa cells, induce cell cycle arrest stimulating progression through the cell cycle, and induce HPV replication over time.

**Keywords:** Cell cycle, cervical cancer, HeLa, HPV, ovulation induction drugs, EMT.

## Introduction

Cervical cancer is one of the leading causes of cancer death among women (Mattiuzzi and Lippi 2020). Although its incidence has decreased in developed countries due to prevention and treatment programs for precursor lesions (Koeneman, Kruitwagen et al. 2015, Kudela, Holubekova et al. 2016, Sato, Kawana et al. 2017), it is still the fourth most common type of cancer in women living in emerging countries, according to the World Health Organization (WHO 2019). Cervical cancer is one of the types of cancers with the best prognosis when diagnosed and treated early (Petry 2014, WHO 2019). This disease can be easily prevented by health education regarding the risk factors and early detection tests, such as the PAP test, identifying pre-cancerous lesions in the cervix, which can then be treated before the lesion develops into cervical cancer.

Human Papillomavirus (HPV) infection is known to cause 99.7% of invasive cervical cancers, mainly by types 16, 18, 31, and 45 (Walboomers, Jacobs et al. 1999, Petry 2014, Williams, Werner et al. 2015). HPV induces an imbalance between cell proliferation and apoptosis, leading to hyperplasia, cells apoptosis resistance, and accumulation of cell mutations (Tjalma, Van Waes et al. 2005).

Carcinogenesis is a complex and multiphasic process influenced by genetic and epigenetic phenomena that leads to changes in cell metabolism, proliferation, motility, apoptosis regulation, among others. E6 and E7 HPV proteins interfere with cell proliferation activity controlled by p53 and pRb and also inhibit cell cycle checkpoint control via cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors (p21, p27, p16). During chronic HPV infection, integration of the virus genome inside the host cell might occur, where cells will transition into cervical intraepithelial neoplasia grade I (CIN-1) (Longworth and Laimins 2004, Yeo-Teh, Ito et al. 2018).

Neoplastic cells can invade and move through adjacent tissues in the cancer progression process. This phenomenon can occur as a result of tumor cells adhesion mechanisms changes. The loss of adhesion between tumor cells and the extracellular matrix (ECM) is a remarkable step for tumor progression. Significant changes and irregularities in the cytoplasmic membrane, the decrease or absence of junctional structures, and the reduction of adhesion molecules between cells (such as cadherins) are markers for a progression event in cancer development known as epithelial-mesenchymal transition process (EMT). EMT induction is a complex mechanism involving transcription factors (TF) activation such as TWIST, SNAIL, ZEB1, and ZEB2 (Goossens, Vandamme et al. 2017). The EMT occurs gradually and results in loss of

epithelial cell characteristics, such as down regulation of E-cadherins, up-regulation of N-cadherins, downregulation of keratins, and up-regulation of anchorage proteins to the ECM and mobile mesenchymal proteins [expression of N- and R-cadherins, vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA- $\alpha$ ) and G proteins of the Rhodopsin family (RHO)] (Lu and Kang 2019).

Medications to treat diabetes and hypertension have been associated with an increased risk of malignancy in various studies. Therefore, a meta-analysis review suggests that most associations of commonly used medications with cancer risk, if present, are likely to have small or modest effects (Ioannidis, Zhou et al. 2014). Uncertainty continues as to whether treatments for ovulation induction are associated with an increased risk of cancer. Human menopausal gonadotropins, recombinant follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropins, and clomiphene citrate are ovulation-inducing drugs widely used since the 1960s for ovarian follicle stimulation (Bowdler 1972). Clomiphene citrate is considered the best initial treatment for most women with anovulatory infertility. Despite this long-term use, the scientific literature provides conflicting information on the association between ovulation induction treatment and cancer incidence (Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016).

Ovulation induction causes changes in endogenous hormones, which raised doubts about the safety of their long-term use, including the risks of developing cancer and their effects on tumor promotion and progression. Several studies have investigated the possible relationship between ovarian stimulation and the development of breast, ovarian, endometrial, thyroid, colon, cervix, skin, and central nervous system cancers (Potashnik, Lerner-Geva et al. 1999, Dor, Lerner-Geva et al. 2002, Kristiansson, Bjor et al. 2007, Yli-Kuha, Gissler et al. 2012, Siristatidis, Sergentanis et al. 2013, Reigstad, Larsen et al. 2015, Reigstad, Larsen et al. 2015, Kessous, Davidson et al. 2016, Momenimovahed, Taheri et al. 2019). However, data are controversial, and most published works are observational. The lack of adequate control over the populations investigated, the factors that influence cancer risk, and the lack of long-term follow-up of patients who underwent treatment limit these studies' methodologies, making it difficult to interpret (Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016).

For cervical cancer, the literature agrees that there is no increase in the probability of developing this type of neoplasm when ovulation-inducing drugs are used (Potashnik, Lerner-Geva et al. 1999, Dor, Lerner-Geva et al. 2002, Kristiansson, Bjor et al. 2007, Lerner-Geva, Rabinovici et al. 2012, Yli-Kuha, Gissler et al. 2012, Siristatidis, Sergentanis et al. 2013, Reigstad, Larsen et al. 2015, Kessous, Davidson et al. 2016, Zhou, Der et al. 2016), and some researchers even suggest that the use of clomiphene citrate can significantly reduce the chances of developing cervical neoplasia (Rossing, Daling et al. 1996).

Hence, there are no reports in the literature on the effects of CC and LET on the behavior of cervical cancer cells *in vitro*. In addition, knowing that cervical cancer directly relates to HPV infection, no data shows its actions on viral replication. In this context, the present study aimed to examine the effects of Clomiphene Citrate and Letrozole on human cervical adenocarcinoma cell line HeLa (ATCC® CCL-2) on HPV viral load, cell metabolism and viability, cell cycle, and regulation of genes involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT), to determine how these two commonly used ovulation-inducing drugs affect cancer cells *in vitro* and the tumor cells phenotype and progression.

## **Material and methods**

### ***Cell culture***

Cell line HeLa (ATCC® CCL-2), a human cervical adenocarcinoma of a 31-year-old patient (Harvey 1976, Lucey, Nelson-Rees et al. 2009) was cultivated and expanded using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of penicillin/streptomycin (all previously described reagents from Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A), in 100 mm<sup>2</sup> sterile cell culture dishes (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany). Cells were incubated in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at a temperature of 37°C, and its expansion was observed, changing the medium daily until obtaining a healthy monolayer with confluence around 70-80%. To do the experiments, cells were then detached using 2 mL of 1% Trypsin (Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A), collected in sterile tubes (Sarstedt Ag&Co, Nümbrecht, Germany), centrifuged, and counted using a Neubauer chamber under an inverted microscope.

Cells were plated for MTT assay, cell cycle analysis, RNA and DNA isolation, according to the protocols of each experiment, and then treated with Clomiphene Citrate and Letrozole for 24 and 48 hours.

### ***MTT assay for assessment of cell metabolization***

HeLa cells were counted and seeded in 96-well culture plates (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) at a density of  $4 \times 10^3$  cells per well and incubated for 24 hours for adherence and monolayer formation. Then, they were treated with four different concentrations of either CC (2, 20, 200, and 2000 ng/mL) or LET (4, 40, 400, and 4000 ng/mL) (Sigma Aldrich



Co., St. Louis, U.S.A) diluted in DMEM, in triplicate, and incubated for a period of 24 or 48 hours. These concentrations were chosen based on our laboratory group's studies with granulosa cells.

MTT colorimetric assay estimates cell viability by measuring the capacity of dehydrogenase enzymes present in the mitochondria and cytoplasm of viable cells in reducing MTT yellow tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)] to insoluble purple formazan crystals. After the incubation with CC and LET for 24 or 48 hours, culture media was removed, and 100  $\mu$ L of the MTT solution (Sigma-Aldrich, USA) at a concentration of 5 mg/mL was added to each well. Then, the plate was incubated for 4 hours, protected from light. Afterward, the supernatant was discarded, and 100  $\mu$ L of Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A) was added to each well to solubilize the formazan crystals. The optical densities (OD) were measured with a spectrophotometer at 570 nm (VersaMax Microplate Reader – Molecular Devices, San Jose, U.S.A).

#### ***Analysis of cell cycle by propidium iodide (PI) DNA staining flow cytometry***

Cell cycle status was performed by propidium iodide (PI) staining (Nicoletti, Migliorati et al. 1991). HeLa cells were seeded in 12-well culture plates (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well. After 24 hours for adherence, cells were treated with CC (2000 ng/mL) or LET (4000 ng/mL) and incubated in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37°C for 24 h and 48 hours. As a control condition, HeLa cells were incubated with DMEM only. Afterward, the supernatant was collected, and cells were centrifuged and resuspended in a hypotonic fluorochrome solution — HFS (50  $\mu$ g/mL PI in 0.1% sodium citrate plus 0.1% Triton X-100) (BD Biosciences, USA). Adhered cells were collected by trypsinization (Sigma Aldrich Co., St. Louis, U.S.A) in a pool for each treatment condition and then centrifuged, washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution, and resuspended with 300  $\mu$ L of HFS. Cells were incubated at a temperature of 4°C for one hour in the dark. The PI fluorescence of 10000 individual cells was measured by a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, USA), through FACSDiva software (BD Biosciences, USA). Data were analyzed using FlowJo software 7.5.5 (TreeStar Inc, CA).

#### ***RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR (qPCR)***

HeLa cells were seeded in 6-well culture plates (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Germany) at a density of  $10^5$  cells per well and incubated for 24 hours for proper adhesion.

Then they were treated with 2000 ng/mL of CC or 4000 ng/mL of LET, diluted in DMEM, and incubated for 24 or 48 hours. Cells on control condition received only DMEM.

After treatment, supernatants were collected and transferred to microtubes to centrifugate and recover any floating cells. The adhered cells were incubated for three minutes with 1000  $\mu$ l of Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA). Afterward, the well's content was transferred to microtubes for subsequent RNA extraction, which was carried out according to the manufacturer's guidelines, followed by RNA quantification (NanoDrop Lite - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). For cDNA synthesis, a 1000 ng of total RNA was reverse transcribed using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), following the manufacturers' protocol for random hexamers primers.

Quantitative PCR was carried out in QuantStudio 3 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) using the Power Sybr®Green Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), and the analysis of relative gene expression data used Method Amplification was based on the following experimental design: Stage 1: 50°C for 2 min; Stage 2: 95°C for 10 min; Stage 3: 40 cycles at 95°C for 15s and 58°C for 60s; Stage 4 (melt curve): 95°C for 15s and 60°C for 1 min. The primers used for qPCR reactions are described in Table 1.

**Table 1.** Primers sequences for RT-PCR and q-PCR

Gene	Primers	Nucleotide sequence (nt)	Fragment size	GenBank Accession number
<b>GAPDH</b>	Forward	5'- TGGGTGTGAACCATGAGAAG -3'	125	NM_001289746.1
	Reverse	5'- GAGTCCTTCCACGATACCAAAG -3'		
<b>ECAD</b>	Forward	5'- CCCTTCACAGCAGAACTAAC -3'	108	NM_001317185.1
	Reverse	5'- CACCTCTAAGGCCATCTTTG -3'		
<b>NCAD</b>	Forward	5'- GGACCGAGAATCACCAAATG -3'	94	NM_001308176.1
	Reverse	5'- CGTTCCTGTTCCACTCATAG -3'		
<b>ZEB1</b>	Forward	5'- GAGGTGACTCGAGCATTAG -3'	123	NM_001323654.1
	Reverse	5'- TTCTGTCTCGTCCGTAAC -3'		
<b>ZEB2</b>	Forward	5'- CATAGGCAGGTCAGAATAC -3'	122	NM_032991.2
	Reverse	5'- GATAAATAGGCGACCTGTGC -3'		
<b>SNAIL</b>	Forward	5'- GGACAGAGTCCCAGATGAC -3'	129	NM_001229.5
	Reverse	5'- GGACAGAGTCCCAGATGAC -3'		

### ***DNA extraction and HPV PCR detection and quantification***

The DNA extraction was performed using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) protocol from the interphase and organic phase that remained after removing the aqueous phase containing RNA. According to the manufacturer's guidelines, the process was carried out, followed by DNA quantification (NanoDrop Lite - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

qPCR amplification for HPV18 detection and quantification was based on the following experimental design: Stage 1: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min; Stage 2: 95°C for 15s and 60°C for 60s; Stage 3 (melt curve): 40 cycles at 95°C for 15s, 60°C for 60s and 95°C for 1s; and Stage 4: 4°C for ∞. The primers used for HPV q-PCR reaction are described in Table 2.

**Table 2.** Primers sequences for HPV q-PCR

	<b>Primers</b>	<b>Nucleotide sequence (nt)</b>	<b>Fragment size (pb)</b>	<b>GenBank Acession number</b>
<b>HPV 18+</b>	ForHPV18	5'- CAGTGCCATTCGTGCTGCAA -3'	142	MN909342.1
	RevHPV18	5'- GGAATTTTCATTTTGRGGCTCTAAA -3'		

### ***qPCR data analysis***

Gene expression was accessed by the comparative CT method (CT mean for the target gene – CT mean for the endogenous control), as the endogenous control (housekeeping gene *GAPDH*) was used to normalize gene expression and generate the  $\Delta$ CT. The  $\Delta\Delta$ CT ( $\Delta$ CT sample -  $\Delta$ CT of the calibrator) was calculated, and the  $2^{-\Delta\Delta$ CT} formula was applied to obtain relative expression levels of each target gene (fold change) (Livak and Schmittgen 2001).

### ***Statistical analysis***

All statistical data were obtained using GraphPad Prism software, version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA). The results were analyzed by One-Way ANOVA and Two-Way ANOVA, and their possible correlations by Tukey's Multiple Comparisons test and Sidak's Multiple Comparisons Test. Differences were considered significant for a p-value inferior to 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## Results

### *Metabolization and cell viability after CC and LE treatment*

After 24 and 48 hours of treatment, neither Clomiphene Citrate nor Letrozole showed cytotoxic effect at the concentrations tested. On the contrary, for both drugs and times, all treatment conditions had cell metabolization rates higher than the control condition ( $p < 0,0001$ ). It was noted that MTT metabolization in CC treated cells was 86% and 75% higher after 24 and 48 hours, respectively, when compared to untreated cells ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 1A). After treatment with Letrozole, the cells showed an increase in cell metabolization at 24 and 48 hours post treatment, when compared with the control, 75% and 70%, respectively ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 1B).

### *Effects of the CC and LET treatment on the HeLa cell cycle*

Cell cycle was evaluated at 24 and 48 hours pos CC and LET treatment at 2000 ng/mL and 4000 ng/mL, respectively. After 24 hours treatment with CC, it was observed a decreased in cells at <G1 phase ( $p < 0,05$ ) and at S phase ( $p < 0,05$ ), and an increase at G1 phase ( $p < 0,05$ ) when compared to the control (Figure 2A). In contrast, it was observed that LET treatment after 24 hours increase the number of cells at <G1 phase ( $p < 0,01$ ) and S phase ( $p < 0,01$ ) and decrease cells at G1 phase ( $p < 0,0001$ ).

Concerning the cells treated for 48 hours with CC and LET, there were no significant variations in the percentage of cells at <G1, S, and G2 phases, when compared to control. Therefore, cells treated with CC for 48 hours showed a decrease at the G1 phase compared to control ( $p < 0,01$ ). However, cells treated with LET for 48 hours had an increase at the G1 phase in comparison with CC treatment ( $p < 0,01$ ) (Fig. 2B).

### *Effects of the CC and LET treatment on the gene expression*

Gene expression related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) event, such as *CDH1* (ECAD gene) and *CDH2* (NCAD gene), *ZEB1*, *ZEB2*, and *SNAIL*, were assessed in HeLa cells after CC and LET treatment for 24- and 48-hours.

An upregulation on *ZEB1* ( $p < 0.01$ ), *ZEB2* ( $p < 0.05$ ) and *SNAIL* ( $p < 0.01$ ) mRNA expression was identified pos 24 hours of CC treatment (Fig. 3A), when compared to control. In addition, the same effect in upregulating transcription factors *ZEB1* ( $p < 0.001$ ) and *SNAIL*

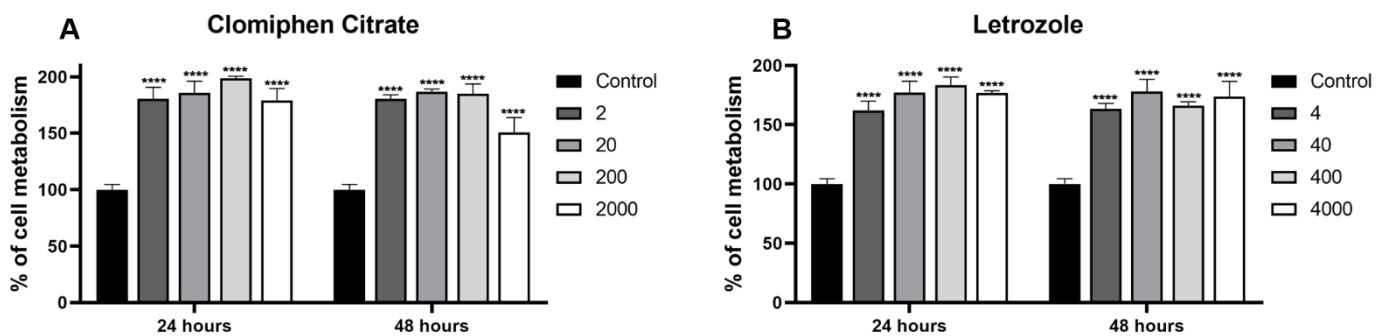
( $p < 0.0001$ ) expression pos 24 hours with LET treatment was observed (Fig. 3B). However, these expressions were largely reduced after 48 hours ( $p < 0.01$ ) of treatment.

Furthermore, *NCAD* exhibited an upregulation as a result of 48 hours of treatment with CC and LET when compared to the control cells (Fig. 3A and B) ( $p < 0.01$ ). At the same time, LET treatment for 48 hours conserved an upregulation on transcription factor *SNAIL* observed at 24 hours (Fig. 3B) ( $p < 0.0001$ ).

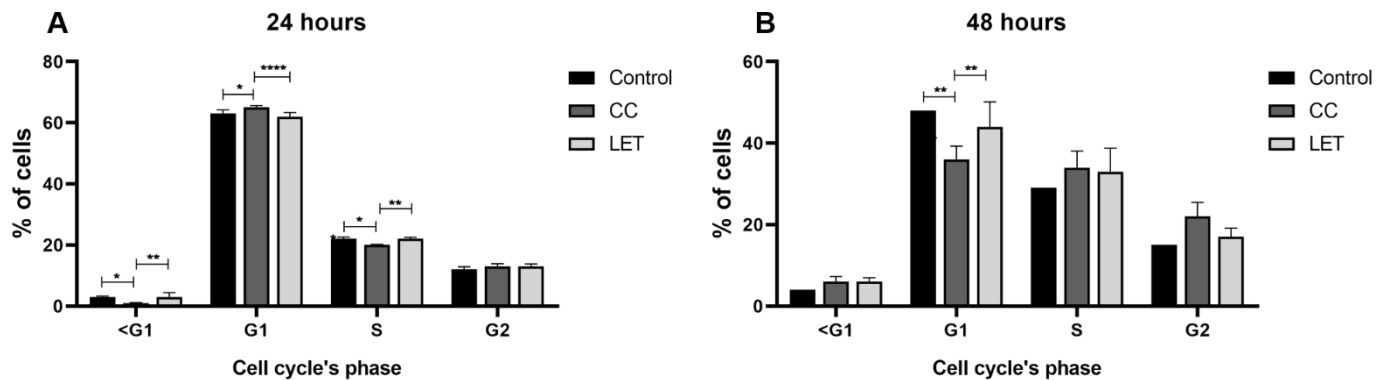
Meanwhile, *ECAD* mRNA expression had no significant regulation by CC and LET at 24 and 48 hours post treatment (Fig. 3A and B). Along with *ZEB2* mRNA expression that showed no change after 24 and 48-hours treatment with LET (Fig. 3B) compared to the control.

#### *Effects of the CC and LET treatment on HPV18s' viral load in HeLa cells*

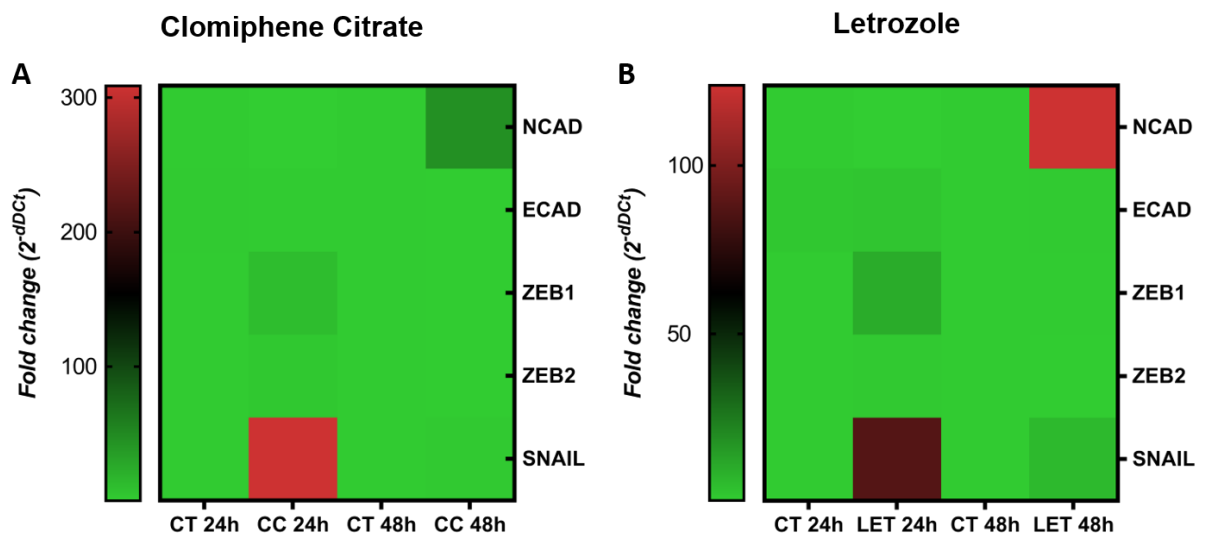
HPV18 DNA copies were accessed in HeLa cells after CC and LET treatment for 24 and 48 hours to evaluate HPVs' viral load. A downregulation on HPV18s' DNA expression ( $p < 0,0001$ ) was identified after 24 hours of treatment with both drugs compared to the control cells. After 48 hours, this expression was increased with both drugs, mainly with LET, even though it was not statistically significant (Fig. 4).



**Figure 1.** Adenocarcinoma HeLa cells MTT metabolization assay after 24- and 48-hours treatment with different concentrations of CC (A) and LET (B) (ng/mL). Control cells received media only. The CC treatment increases the percentage of MTT metabolization (86% with 24 hours and 75% with 48 hours), compared to control cells (A). LET treatment increased the MTT metabolization (75% with 24 hours and 70% with 48 hours, respectively) compared to control cells (B). Values represent the means of one experiment run in triplicates, with bars representing standard deviation. Statistical significance was calculated by Two-Way ANOVA (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

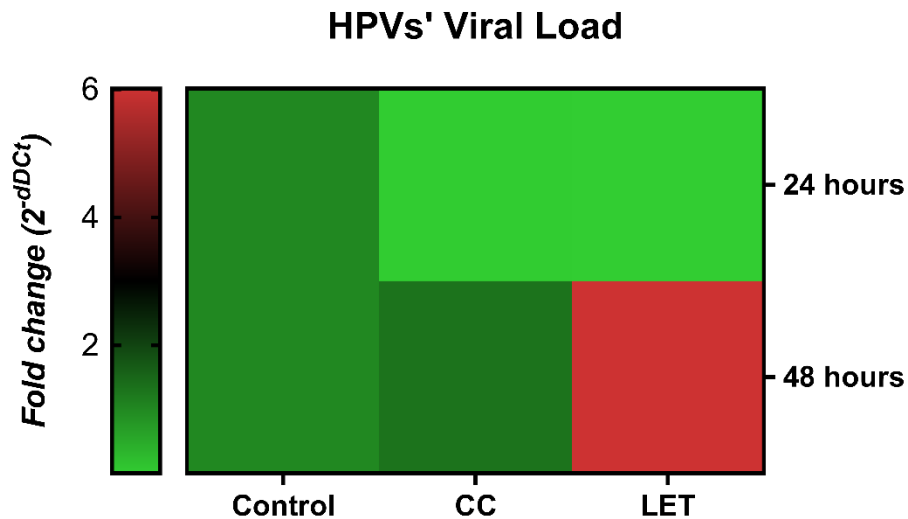


**Figure 2.** Effects of 2000 ng/mL CC and 4000 ng/mL LET treatment on HeLa cell cycle after 24 hours (A) and 48 hours (B), assessed by PI-flow cytometry. Control cells received media only. After 24 hours of treatment with CC: decrease in the % of cells at <G1 and S phase, compared to the control condition. After 24 hours of treatment with LET, an increase at <G1 and S phase ( $p < 0,01$ ) and a decrease at G1 phase ( $p < 0,0001$ ) is noted in comparison with CC treatment (A). After 48 hours, there was a significant decrease in the percentage of G1 ( $p < 0,01$ ) for cells treated with CC, compared to control. Values represent the means of one experiment run in duplicates, with bars representing standard deviation. Statistical significance was calculated by Two-Way ANOVA (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). (CC: Clomiphene Citrate; LET: Letrozole).



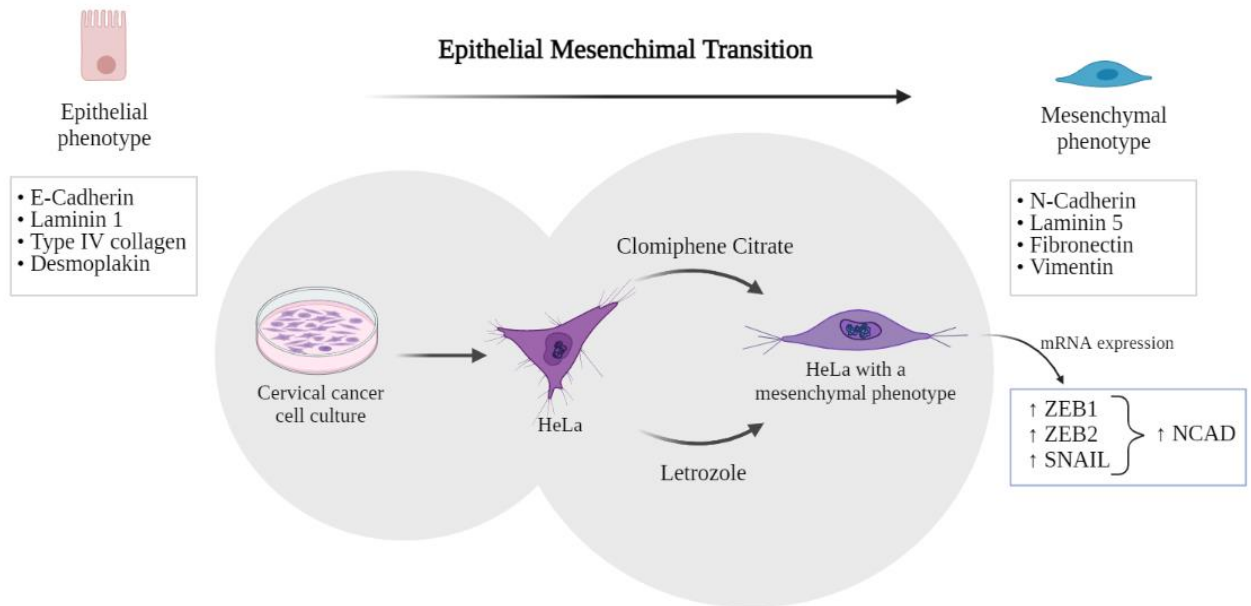
**Figure 3.** *ECAD*, *NCAD*, *ZEB1*, *ZEB2*, and *SNAIL* mRNA expression in HeLa cells treated with CC (A) and LET (B) for 24 and 48-hours. Control cells received media only. *ECAD* expression had no significant regulation for both drugs (CC and LET) and times (24 and 48 hours). The significant difference was found on *ZEB1* and *SNAIL* expression after 24 hours of

treatment with 2000 ng/mL CC and *ZEB1* and *SNAIL* expression after 24 hours with 4000 ng/mL LET. *NCAD* exhibited a significant and higher expression after 48 hours of treatment with both drugs, compared to the control cells expression. *SNAIL* expression was higher than the control condition after 24- and 48-hours incubation with LET. Statistical significance was calculated by One-way ANOVA test (CT: Control, CC: Clomiphene Citrate; LET: Letrozole).



**Figure 4.** HPVs' viral load in HeLa cells after 2000 ng/mL CC and 4000 ng/mL LET for 24 and 48 hours. Control cells received media only. A downregulation ( $p < 0,0001$ ) was identified after 24 hours of treatment, and a not significant upregulation was observed after 48 hours of treatment on HPV18s' DNA copies with CC and LET. Statistical significance was calculated by One-way ANOVA test (CC: Clomiphene Citrate; LET: Letrozole).

## Discussion



**Figure 5.** Clomiphene Citrate and Letrozole modulate the epithelial-mesenchymal transition target gene expression in HeLa cells – Figure: Isabella da Terra Borges, 2022.

Several studies seek to determine the correlation between the ovulation inducing drugs and the risk for cancer once this therapy modifies the hormonal environment, which could lead to malignant cellular changes (Ron, Lunenfeld *et al.* 1987, Luke, Brown *et al.* 2015, Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016) However, the effects of Clomiphene Citrate and Letrozole on cervical tumor promotion and progression remain unknown. According to Rossing *et al.*, CC and LET do not stimulate the proliferation and expansion of cervical neoplastic cells (Rossing, Daling *et al.* 1996). Cytotoxic effect was not expected either, as none of these drugs are used as antitumor drugs, but to mimic the action of hormones such as estrogen or induce the release of FSH.

To analyze the cervical neoplastic cell's compartment under treatment, this pioneering study focuses on the *in vitro* effects of clomiphene citrate and letrozole in human cell line HeLa. According to the data obtained, CC and LET increased on average 76% of MTT's metabolization, which may indicate that both drugs, at any concentration, either stimulate cell proliferation or increase the metabolic activity of cervical tumor cells. This result is in contrast with epidemiological literature data, which shows that the use of CC does not promote tumor cervical cell proliferation and expansion (Rossing, Daling *et al.* 1996, Siristatidis, Sergentanis *et al.* 2013, Kessous, Davidson *et al.* 2016, Kroener, Dumesic *et al.* 2017, Reigstad, Storeng *et al.* 2017).



The present study evaluated the promoting effects of drugs directly on cervical tumor cell behavior *in vitro*. Cell cycle analysis showed that after 24 and 48 hours of CC and LET treatment. There was no increase in the number of cells in <G1 phase, corroborating MTT results that both drugs do not have a cytotoxic effect on HeLa cells. It was also observed that both treatments led to a decrease in the percentage of cells in the G1 phase ( $p < 0,01$ ) after 48 hours, which suggests that more cells are synthesizing genetic material and preparing for cell division once the drugs promoted activation of the cell cycle, in which the cells were stimulated from the G1 phase to the S phase, and from S to G2. This *in vitro* study differs from previous studies that claim that the use of clomiphene citrate reduced the chances of developing cervical cancer (Practice Committee of the American Society for Reproductive 2016), once most of them are epidemiologic and observational cohort studies, therefore do not considerate the risk of tumor promotion and progression in patients with some neoplastic cells initiated by other carcinogenic agents.

The EMT process can be investigated by expressing specific genes, such as *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST*, *SNAIL*, *CDH1* (E-cadherin or ECAD gene) and *CDH2* (N-cadherin or NCAD gene). Once E-cadherin plays an essential role at epithelial cell adhesion, the decrease or loss of its expression is related to a poor prognosis (Wong, Fang *et al.* 2018). On the other hand, a higher N-cad expression enhances cancer cell mobility by mediating a weaker cell-cell adhesion and turning epithelial cells into a mesenchymal phenotype (Nguyen, Duchesne *et al.* 2019), which promotes tumor cell migration, invasion, and metastasis (Kuphal and Bosserhoff 2006), as demonstrated by many studies *in vitro* (Hsu, Wheelock *et al.* 1996, Islam, Carey *et al.* 1996, Li, Satyamoorthy *et al.* 2001, Klymenko, Kim *et al.* 2017) However, several authors believe that E-cadherin loss is a consequence, not a cause, for EMT, once just its loss is insufficient to drive breast cell line into the transition (Chen, Beetham *et al.* 2014, Loh, Chai *et al.* 2019). That means a higher expression of the N-cad is more relevant to evaluate cancer progression than the loss or decrease of E-cad expression. In this perspective, a slight but not significant reduction in ECAD expression for CC condition (Fig. 3A) was seen after 24- and 48-hours of treatment. A remarkable increase in NCAD expression after 48 hours of treatment with CC was observed and LET (Fig. 3B and 3G). Considering these results, it is possible to infer that both drugs stimulate cervical cancer development by changing cell phenotype and enhancing its potential to run through stroma and migrate to distant places, as it was already seen in many types of cancer, such as prostate cancer, melanoma, pancreatic cancer, multiple myeloma, lung cancer and oral squamous cell carcinoma (Cao, Wang *et al.* 2019). According to the literature,

the aberrant N-cadherin expression found in this study after 48 hours of CC and LET treatment is correlated with an advanced tumor stage, invasion, and metastasis (Cao, Wang *et al.* 2019).

Furthermore, Li and colleagues found out that, on melanoma cells *in vitro*, N-cadherin promotes a new kind of adhesion and communication between cancer and host cells, facilitating neoplastic cell's mobility and adaptation into different sites; and mediates cellular interaction, enhancing cancer cell survival by activating Akt/PKB pathway (Li, Satyamoorthy *et al.* 2001). This agrees with the found results that CC and LET do not exhibit cytotoxicity and increase N-cad expression, which could be correlated to HeLa survival and cell cycle activation. Withal, ECAD and NCAD genes can be co-expressed at different levels once EMT has intermediate states between epithelial and fully mesenchymal states, known as hybrid EMT states (Pastushenko and Blanpain 2019). Besides that, previous studies demonstrated NCAD can promote cancer cell migration and invasion by itself, independent of ECAD downregulation (Nieman, Prudoff *et al.* 1999, Li, Satyamoorthy *et al.* 2001), which agrees with the maintenance of ECAD and increase of NCAD observed in the experiments.

The zinc-finger E homeobox-binding (ZEB) protein family of transcription factors, ZEB1 and ZEB2 are best known to drive EMT by directly binding the E-box elements and modulating epithelial genes expression, such as ECAD. Also, they are related to important processes such as cell cycle, cell survival, and longevity (Scott and Omilusik 2019) Depending on its expression level, conformation, and which gene it regulates, ZEB1 can act as a repressor or activator (Ran, Lin *et al.* 2015). Even though ZEB1 and ZEB2 higher expression were found and correlated to cell migration and invasion in breast, squamous carcinoma, colorectal, and ovarian cancer cells (Brabletz and Brabletz 2010, Stemmler, Eccles *et al.* 2019), they may present opposite effects, which was seen in melanoma: ZEB1 is related to a malignant progression and a poor prognosis, whereas ZEB2 inhibits metastasis (Stemmler, Eccles *et al.* 2019). In the cervical cancer context, ZEB1 is significantly higher expressed in advanced stages (including vascular invasion and lymph node metastasis) of the disease, accompanied by a decreased expression of E-cad, when compared to normal tissues (Ma, Zheng *et al.* 2015, Ran, Lin *et al.* 2015). Hence, it is possible to assume that CC and LET treatments stimulate HeLa cells' expression of malignancy target genes, such as the NCAD gene, by increasing ZEB1 expression after 24 hours. Once NCAD reaches a high expression after 48 hours, it may be acting as an endogenous blockage to ZEB1's expression, which explains ZEB1's downregulation after 48 hours.

On the other hand, the ZEB2 gene presented an upregulation after 24-hours of CC treatment compared to the control, which could mean clomiphene citrate also regulates this TF and, consequently, its activity. However, this expression is lower than the ZEB1's one, making it possible to hypothesize that ZEB2 also modulates ECAD gene expression, as suggested by many previous studies (Wong, Gao *et al.* 2014, He, Northey *et al.* 2017, Gamba, Damasceno *et al.* 2019). Still, it was not enough to downregulate it, as already reported in the literature (Vandewalle, Comijn *et al.* 2005). More studies should be realized to understand the difference between ZEB1 and ZEB2 expressions and how ZEB2 acts.

SNAIL is also a transcription factor that binds to the E-box sequences, mainly in CDH1 (ECAD), and represses their expression (Lu and Kang 2019). In cancer, SNAIL may promote tumor progression once its overexpression in cancer cells is related to a decrease in adherent junctions, a change in cell's polarity, and an enhanced capacity to migrate and invade tissues. Additionally, SNAIL is a good predictor of many types of cancer metastatic potential and prognosis (Batlle, Sancho *et al.* 2000, Chen, Li *et al.* 2013).

In the present study, there was a notable upregulation in SNAIL expression for both drugs, whereas, for CC treatment, it was much higher. It may be due to CC's binding on estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) on HeLa cells, once Ye and colleagues demonstrate that the presence of ER $\alpha$  in breast cancer cell lines results in aberrant expression of SNAIL. In contrast, ER $\alpha$  knockdown significantly reduced its expression (Ye, Xiao *et al.* 2010). By that, in cervical cancer HeLa cells, CC and LET induce the neoplastic progression through regulating SNAIL *in vitro*, by regulating genes involved in EMT as NCAD gene, which is in agreement with the literature (Sun, Guan *et al.* 2020, Tang, Zhao *et al.* 2020, Tian, Qi *et al.* 2020). As well as ZEB1, SNAIL expression was downregulated after 48 hours of treatment, which may be explained by NCAD upregulation acting as an endogenous blockage, a self-regulation system.

The literature shows inconsistent data among HPVs' viral load and the severity of cervical lesions (Liu, Xu *et al.* 2021). However, specifically for HPV18, a higher viral load was observed in high pathologic grade cancers (Kim, Kim *et al.* 2020). In this context, no previous studies correlate HPVs' viral load and the use of ovulation-inducing drugs. Once HPV18's DNA expression indicates how many copies of the virus there are in HeLa cells, it was possible to evaluate HPVs' replication and viral load following clomiphene citrate and letrozole treatments.

Xiao and colleagues once reported the HPV L1 protein expression and granules in HeLa cells, which can suggest the presence of HPV episomal form in these cells (Xiao, Fu *et al.* 2015). Considering that, the lower viral load in CC and LET conditions, after 24 hours treatment, may be due to inactivation of episomal forms of the virus by these drugs. However, after 48 hours, both drugs exhibited higher viral load, indicating that CC and LET lead to a major viral replication over time. This result may suggest a direct action of the transcriptional factors ZEB1, ZEB2, and SNAIL, that were highly expressed by the drugs, stimulating transcription of the HPV18 genome, since it is also integrated into HeLa's chromosome (Popescu, Amsbaugh *et al.* 1987). Besides that, previous meta-analyses and reviews reported that cell's malignancy and lesion's severity tend to increase as the higher its HPV's viral load gets (Amaro-Filho, Pereira Chaves *et al.* 2018) (Kadaja, Sumerina *et al.* 2007) which agrees to all the present results.

In conclusion, the present study suggested that clomiphene citrate and letrozole enhance cervical cancer cell line malignancy *in vitro* by increasing HPV's viral load over time, activating the cell's cycle, increasing their metabolism, and, mainly, regulating the EMT process. Both drugs seem to act primarily on transcription factors, such as ZEB1, ZEB2, and SNAIL, and increase their expression, which regulates N-cad and E-cad expression, accentuating the cell's mesenchymal phenotype (Figure 5).

### **Funding**

This study was supported by research funds from the Brazilian agencies CNPQ, CAPES, and FAPEMIG.

### **Competing interests**

The authors disclaim no competing interests.

### **References**

- Amaro-Filho, S. M., C. B. Pereira Chaves, S. P. Felix, D. L. Basto, L. M. de Almeida and M. A. M. Moreira (2018). "HPV DNA methylation at the early promoter and E1/E2 integrity: A comparison between HPV16, HPV18 and HPV45 in cervical cancer." *Papillomavirus Res* **5**: 172-179.
- Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida and A. Garcia De Herreros (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." *Nat Cell Biol* **2**(2): 84-89.

- Bowdler, I. M. (1972). "The development and usage of clomiphene." *Bristol Med Chir J* 87(324): 53-56.
- Brabletz, S. and T. Brabletz (2010). "The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?" *EMBO Rep* 11(9): 670-677.
- Cao, Z. Q., Z. Wang and P. Leng (2019). "Aberrant N-cadherin expression in cancer." *Biomed Pharmacother* 118: 109320.
- Chen, A., H. Beetham, M. A. Black, R. Priya, B. J. Telford, J. Guest, G. A. Wiggins, T. D. Godwin, A. S. Yap and P. J. Guilford (2014). "E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition." *BMC Cancer* 14: 552.
- Chen, Z., S. Li, K. Huang, Q. Zhang, J. Wang, X. Li, T. Hu, S. Wang, R. Yang, Y. Jia, H. Sun, F. Tang, H. Zhou, J. Shen, D. Ma and S. Wang (2013). "The nuclear protein expression levels of SNAIL and ZEB1 are involved in the progression and lymph node metastasis of cervical cancer via the epithelial-mesenchymal transition pathway." *Hum Pathol* 44(10): 2097-2105.
- Dor, J., L. Lerner-Geva, J. Rabinovici, A. Chetrit, D. Levrant, B. Lunenfeld, S. Mashiach and B. Modan (2002). "Cancer incidence in a cohort of infertile women who underwent in vitro fertilization." *Fertil Steril* 77(2): 324-327.
- Gamba, C. O., K. A. Damasceno, I. C. Ferreira, M. A. Rodrigues, D. A. Gomes, M. R. Alves, R. M. Rocha, A. E. Lima, E. Ferreira and G. D. Cassali (2019). "The investigation of transcriptional repression mediated by ZEB2 in canine invasive micropapillary carcinoma in mammary gland." *PLoS One* 14(1): e0209497.
- Goossens, S., N. Vandamme, P. Van Vlierberghe and G. Berx (2017). "EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET." *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1868(2): 584-591.
- Harvey, A. M. (1976). "Johns Hopkins--the birthplace of tissue culture: the story of Ross G. Harrison, Warren Y. Lewis, and George O. Gey." *Johns Hopkins Med J Suppl*: 114-123.
- He, Y., J. J. Northey, A. Pelletier, Z. Kos, L. Meunier, B. Haibe-Kains, A. M. Mes-Masson, J. F. Cote, P. M. Siegel and N. Lamarche-Vane (2017). "The Cdc42/Rac1 regulator CdGAP is a novel E-cadherin transcriptional co-repressor with Zeb2 in breast cancer." *Oncogene* 36(24): 3490-3503.
- Hsu, M. Y., M. J. Wheelock, K. R. Johnson and M. Herlyn (1996). "Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas." *J Invest Dermatol Symp Proc* 1(2): 188-194.

- Ioannidis, J. P., Y. Zhou, C. Q. Chang, S. D. Schully, M. J. Khoury and A. N. Freedman (2014). "Potential increased risk of cancer from commonly used medications: an umbrella review of meta-analyses." *Ann Oncol* 25(1): 16-23.
- Islam, S., T. E. Carey, G. T. Wolf, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (1996). "Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion." *J Cell Biol* 135(6 Pt 1): 1643-1654.
- Kadaja, M., A. Sumerina, T. Verst, M. Ojarand, E. Ustav and M. Ustav (2007). "Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery." *EMBO J* 26(8): 2180-2191.
- Kessous, R., E. Davidson, M. Meirovitz, R. Sergienko and E. Sheiner (2016). "The risk of female malignancies after fertility treatments: a cohort study with 25-year follow-up." *J Cancer Res Clin Oncol* 142(1): 287-293.
- Kim, J., B. K. Kim, D. Jeon, C. H. Lee, J. W. Roh, J. Y. Kim and S. Y. Park (2020). "Type-Specific Viral Load and Physical State of HPV Type 16, 18, and 58 as Diagnostic Biomarkers for High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions or Cervical Cancer." *Cancer Res Treat* 52(2): 396-405.
- Klymenko, Y., O. Kim, E. Loughran, J. Yang, R. Lombard, M. Alber and M. S. Stack (2017). "Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis." *Oncogene* 36(42): 5840-5851.
- Koeneman, M. M., R. F. Kruitwagen, H. W. Nijman, B. F. Slangen, T. Van Gorp and A. J. Kruse (2015). "Natural history of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a review of prognostic biomarkers." *Expert Rev Mol Diagn* 15(4): 527-546.
- Kristiansson, P., O. Bjor and H. Wramsby (2007). "Tumour incidence in Swedish women who gave birth following IVF treatment." *Hum Reprod* 22(2): 421-426.
- Kroener, L., D. Dumesic and Z. Al-Safi (2017). "Use of fertility medications and cancer risk: a review and update." *Curr Opin Obstet Gynecol* 29(4): 195-201.
- Kudela, E., V. Holubekova, A. Farkasova and J. Danko (2016). "Determination of malignant potential of cervical intraepithelial neoplasia." *Tumour Biol* 37(2): 1521-1525.
- Kuphal, S. and A. K. Bosserhoff (2006). "Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma." *Oncogene* 25(2): 248-259.
- Lerner-Geva, L., J. Rabinovici, L. Olmer, T. Blumstein, S. Mashiach and B. Lunenfeld (2012). "Are infertility treatments a potential risk factor for cancer development? Perspective of 30 years of follow-up." *Gynecol Endocrinol* 28(10): 809-814.

- Li, G., K. Satyamoorthy and M. Herlyn (2001). "N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells." *Cancer Res* 61(9): 3819-3825.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Liu, Y., C. Xu, J. Pan, C. Sun, H. Zhou and Y. Meng (2021). "Significance of the viral load of high-risk HPV in the diagnosis and prediction of cervical lesions: a retrospective study." *BMC Womens Health* 21(1): 353.
- Loh, C. Y., J. Y. Chai, T. F. Tang, W. F. Wong, G. Sethi, M. K. Shanmugam, P. P. Chong and C. Y. Looi (2019). "The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges." *Cells* 8(10).
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 362-372.
- Lu, W. and Y. Kang (2019). "Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis." *Dev Cell* 49(3): 361-374.
- Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees and G. M. Hutchins (2009). "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination." *Arch Pathol Lab Med* 133(9): 1463-1467.
- Luke, B., M. B. Brown, L. G. Spector, S. A. Missmer, R. E. Leach, M. Williams, L. Koch, Y. Smith, J. E. Stern, G. D. Ball and M. J. Schymura (2015). "Cancer in women after assisted reproductive technology." *Fertil Steril* 104(5): 1218-1226.
- Ma, Y., X. Zheng, J. Zhou, Y. Zhang and K. Chen (2015). "ZEB1 promotes the progression and metastasis of cervical squamous cell carcinoma via the promotion of epithelial-mesenchymal transition." *Int J Clin Exp Pathol* 8(9): 11258-11267.
- Mattiuzzi, C. and G. Lippi (2020). "Cancer statistics: a comparison between World Health Organization (WHO) and Global Burden of Disease (GBD)." *Eur J Public Health* 30(5): 1026-1027.
- Momenimovahed, Z., S. Taheri, A. Tiznobaik and H. Salehiniya (2019). "Do the Fertility Drugs Increase the Risk of Cancer? A Review Study." *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 313.
- Nguyen, T., L. Duchesne, G. H. N. Sankara Narayana, N. Boggetto, D. D. Fernig, C. Uttamrao Murade, B. Ladoux and R. M. Mege (2019). "Enhanced cell-cell contact stability and decreased N-cadherin-mediated migration upon fibroblast growth factor receptor-N-cadherin cross talk." *Oncogene* 38(35): 6283-6300.

- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* 139(2): 271-279.
- Nieman, M. T., R. S. Prudoff, K. R. Johnson and M. J. Wheelock (1999). "N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression." *J Cell Biol* 147(3): 631-644.
- Pastushenko, I. and C. Blanpain (2019). "EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis." *Trends Cell Biol* 29(3): 212-226.
- Petry, K. U. (2014). "HPV and cervical cancer." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 244: 59-62; discussion 62.
- Popescu, N. C., S. C. Amsbaugh and J. A. DiPaolo (1987). "Human papillomavirus type 18 DNA is integrated at a single chromosome site in cervical carcinoma cell line SW756." *J Virol* 61(5): 1682-1685.
- Potashnik, G., L. Lerner-Geva, L. Genkin, A. Chetrit, E. Lunenfeld and A. Porath (1999). "Fertility drugs and the risk of breast and ovarian cancers: results of a long-term follow-up study." *Fertil Steril* 71(5): 853-859.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive, M. (2016). "Fertility drugs and cancer: a guideline." *Fertil Steril* 106(7): 1617-1626.
- Ran, J., D. L. Lin, R. F. Wu, Q. H. Chen, H. P. Huang, N. X. Qiu and S. Quan (2015). "ZEB1 promotes epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer metastasis." *Fertil Steril* 103(6): 1606-1614 e1601-1602.
- Reigstad, M. M., I. K. Larsen, T. A. Myklebust, T. E. Røsbahm, N. B. Oldereid, A. K. Omland, S. Vangen, L. A. Brinton and R. Storeng (2015). "Cancer risk among parous women following assisted reproductive technology." *Hum Reprod* 30(8): 1952-1963.
- Reigstad, M. M., I. K. Larsen, T. A. Myklebust, T. E. Røsbahm, N. B. Oldereid, A. K. Omland, S. Vangen, L. A. Brinton and R. Storeng (2015). "Risk of breast cancer following fertility treatment--a registry based cohort study of parous women in Norway." *Int J Cancer* 136(5): 1140-1148.
- Reigstad, M. M., R. Storeng, T. A. Myklebust, N. B. Oldereid, A. K. Omland, T. E. Røsbahm, L. A. Brinton, S. Vangen, K. Furu and I. K. Larsen (2017). "Cancer Risk in Women Treated with Fertility Drugs According to Parity Status-A Registry-based Cohort Study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26(6): 953-962.
- Ron, E., B. Lunenfeld, J. Menczer, T. Blumstein, L. Katz, G. Oelsner and D. Serr (1987). "Cancer incidence in a cohort of infertile women." *Am J Epidemiol* 125(5): 780-790.



- Rossing, M. A., J. R. Daling, N. S. Weiss, D. E. Moore and S. G. Self (1996). "In situ and invasive cervical carcinoma in a cohort of infertile women." *Fertil Steril* 65(1): 19-22.
- Sato, M., K. Kawana, K. Adachi, A. Fujimoto, M. Yoshida, H. Nakamura, H. Nishida, T. Inoue, A. Taguchi, J. Ogishima, S. Eguchi, A. Yamashita, K. Tomio, O. Wada-Hiraike, K. Oda, T. Nagamatsu, Y. Osuga and T. Fujii (2017). "Intracellular signaling entropy can be a biomarker for predicting the development of cervical intraepithelial neoplasia." *PLoS One* 12(4): e0176353.
- Scott, C. L. and K. D. Omilusik (2019). "ZEBs: Novel Players in Immune Cell Development and Function." *Trends Immunol* 40(5): 431-446.
- Siristatidis, C., T. N. Sergentanis, P. Kanavidis, M. Trivella, M. Sotiraki, I. Mavromatis, T. Psaltopoulou, A. Skalkidou and E. T. Petridou (2013). "Controlled ovarian hyperstimulation for IVF: impact on ovarian, endometrial and cervical cancer--a systematic review and meta-analysis." *Hum Reprod Update* 19(2): 105-123.
- Stemmler, M. P., R. L. Eccles, S. Brabletz and T. Brabletz (2019). "Non-redundant functions of EMT transcription factors." *Nat Cell Biol* 21(1): 102-112.
- Sun, R., H. Guan, W. Liu, J. Liang, F. Wang and C. Li (2020). "Expression of BMP7 in cervical cancer and inhibition of epithelialmesenchymal transition by BMP7 knockdown in HeLa cells." *Int J Mol Med* 45(5): 1417-1424.
- Tang, Y., Y. Zhao, J. Ran and Y. Wang (2020). "MicroRNA-21 promotes cell metastasis in cervical cancer through modulating epithelial-mesenchymal transition." *Oncol Lett* 19(4): 3289-3295.
- Tian, Y., P. Qi, Q. Niu and X. Hu (2020). "Combined Snail and E-cadherin Predicts Overall Survival of Cervical Carcinoma Patients: Comparison Among Various Epithelial-Mesenchymal Transition Proteins." *Front Mol Biosci* 7: 22.
- Tjalma, W. A., T. R. Van Waes, L. E. Van den Eeden and J. J. Bogers (2005). "Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 19(4): 469-483.
- Vandewalle, C., J. Comijn, B. De Craene, P. Vermassen, E. Bruyneel, H. Andersen, E. Tulchinsky, F. Van Roy and G. Berx (2005). "SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions." *Nucleic Acids Res* 33(20): 6566-6578.
- Xiao, C. Y., B. B. Fu, Z. Y. Li, G. Mushtaq, M. A. Kamal, J. H. Li, G. C. Tang and S. S. Xiao (2015). "Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells." *Cancer Cell Int* 15: 53.

- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer and N. Munoz (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J Pathol* 189(1): 12-19.
- WHO (2019). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer), World Health Organization.
- Williams, N. L., T. L. Werner, E. A. Jarboe and D. K. Gaffney (2015). "Adenocarcinoma of the cervix: should we treat it differently?" *Curr Oncol Rep* 17(4): 17.
- Wong, S. H. M., C. M. Fang, L. H. Chuah, C. O. Leong and S. C. Ngai (2018). "E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications." *Crit Rev Oncol Hematol* 121: 11-22.
- Wong, T. S., W. Gao and J. Y. Chan (2014). "Transcription regulation of E-cadherin by zinc finger E-box binding homeobox proteins in solid tumors." *Biomed Res Int* **2014**: 921564.
- Ye, Y., Y. Xiao, W. Wang, K. Yearsley, J. X. Gao, B. Shetuni and S. H. Barsky (2010). "ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT." *Oncogene* 29(10): 1451-1462.
- Yeo-Teh, N. S. L., Y. Ito and S. Jha (2018). "High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis." *Int J Mol Sci* 19(6).
- Yli-Kuha, A. N., M. Gissler, R. Klemetti, R. Luoto and E. Hemminki (2012). "Cancer morbidity in a cohort of 9175 Finnish women treated for infertility." *Hum Reprod* 27(4): 1149-1155.
- Zhou, B., C. J. Der and A. D. Cox (2016). "The role of wild type RAS isoforms in cancer." *Semin Cell Dev Biol* 58: 60-69.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação entre o uso de drogas indutoras de ovulação, como o Citrato de Clomifeno (CC) e o Letrozol (LET), e o desenvolvimento de diferentes neoplasias vem sendo avaliada e descrita na literatura, principalmente através de estudos epidemiológicos. Os dados sobre os efeitos dessas duas drogas amplamente utilizadas em protocolos de Estimulação Ovariana Controlada (EOC) na ocorrência de câncer de colo de útero são controversos, e podem ter sido influenciados por inúmeros vieses, como a falta de acompanhamento adequado/a longo prazo, e exposição das pacientes a outros fatores de risco. Portanto, para melhor avaliar a atuação desses medicamentos sobre células já iniciadas e envolvidas no processo tumoral, sem interferência de fatores externos, é necessário realizar experimentos passíveis de reprodução e comparar seus resultados, como experimentos *in vitro*.

Em 2019, foram realizados os primeiros estudos *in vitro* avaliando o efeito de diferentes concentrações do CC e do LET, por 24 e 48 horas, sobre a viabilidade, o metabolismo e o ciclo celular de células neoplásicas de adenocarcinoma endocervical (HeLa). Os resultados do teste de MTT demonstraram que tanto o CC quanto o LET não são citotóxicos, independentemente de suas concentrações e do tempo de tratamento; pelo contrário, eles aumentaram a metabolização celular em média de 70% em comparação as células controle. Já através da citometria de fluxo, observou-se aumento na fase <G1 e S, e diminuição na fase G1 após 24 horas de tratamento com LET, em comparação com o tratamento CC. Após 48 horas, houve diminuição significativa na porcentagem de G1 as células tratadas com CC, em relação ao controle; assim como um aumento suave, mas não significativo, na quantidade de células nas fases S e G2 nas condições de tratamento com CC e LET. Todos estes dados obtidos sugerem que o citrato de clomifeno e o letrozol estimulam o metabolismo e proliferação das células, ao ativar sua progressão pelas fases do ciclo celular (Borges, 2019).

Logo, o presente trabalho apresenta-se como uma continuação dos estudos de 2019, buscando avaliar a influência de 2000 ng/mL de CC e de 4000 ng/mL de LET sobre a expressão de genes relacionados a Transição Epitélio-Mesênquima, assim como sobre carga viral do HPV18 nas células HeLa. Através de q-PCR, observou-se que para ambas as drogas, tanto após 24 quanto 48 horas, não houve alteração significativa na expressão de CDH1 ou ECAD, referente a proteína E-caderina. Entretanto, após 48 horas, houve uma expressão aberrante de CDH2 ou NCAD, gene relacionado a proteína N-caderina. O “*Cadherin Switch*” é um evento gradual característico da Transição Epitélio-Mesênquima, em que as células deixam de apresentar a

glicoproteína transmembranar E-cad, e passam a apresentar outra glicoproteína, a N-cad. Essa troca de caderinas leva a alterações nos mecanismos de adesão célula-célula, assim como na interação entre células e com a MEC, na polaridade e, principalmente na capacidade de invasão, migração celular.

Também se observou uma super expressão dos fatores de transcrição ZEB1 e SNAIL após 24 horas de tratamento com CC e LET; essa, reduziu de maneira significativa após 48 horas, possivelmente devido ao bloqueio endógeno de NCAD. ZEB1, ZEB2 e SNAIL são fundamentais na TEM, atuando como repressores transcripcionais de E-cad e estimulando um maior comprometimento das células HeLa com o fenótipo mesenquimal, sabidamente invasor, migratório e móvel. Dessa forma, sugere-se que tanto o citrato de clomifeno quanto o letrozol são capazes de estimular a transição epitélio-mesênquima (ao promover maior expressão de marcadores mesenquimais) e, por consequência, a agressividade tumoral das células HeLa, incitando seu potencial invasivo e metastático.

Segundo Kadaja e colaboradores, o HPV pode coexistir nas formas epissomal e integrada, de modo que as proteínas E1 e E2 transcritas através do epissoma atuam também no fragmento integrado ao genoma viral, promovendo sua replicação (Kadaja, Sumerina *et al.* 2007). Em 2015, Xiao e colegas demonstraram a expressão da proteína L1 do HPV18 presente em células HeLa, o que também sugere a presença viral em forma mista em células neoplásicas. Entretanto, a carga viral de HPV18 nas células HeLa foi significativamente menor após incubação com CC e LET por 24 horas. Esse resultado opõe-se ao esperado, já que estudos prévios demonstraram maior número de cópias de HPV18, quanto maior a agressividade das células neoplásicas cervicais (Kim, Kim *et al.* 2020). Supõe-se que ambas as drogas afetam os epissomas virais, levando a redução da carga viral.

Observa-se, entretanto, um aumento na carga viral após 48 horas de tratamento. Pensa-se então, que os fatores de transcrição ZEB1, ZEB2 e SNAIL, superexpressos após 24 horas, possam atuar diretamente tanto na forma integrada, quanto na epissomal, estimulando sua replicação e, conseqüentemente, uma maior carga viral. Isto posto, sugere-se que o citrato de clomifeno e o letrozol podem induzir um perfil mais agressivo das células neoplásicas cervicais HeLa, não só pela ativação da TEM, mas também por estimular a replicação viral a longo prazo.

Para investigar melhor como os tratamentos com CC e LET podem afetar os potenciais das células do câncer do colo do útero, outros experimentos devem ser realizados, como o ensaio de cicatrização de feridas com um composto antimetabólico para avaliar sua capacidade

migratória; o ensaio de migração transwell para avaliar seu potencial invasivo; e análises de genes de metaloproteinases, para melhor compreensão de como a N-caderina induz metástases. Apesar de células HeLa serem um ótimo modelo, elas são provenientes de um adenocarcinoma endocervical de apenas uma paciente e, portanto, não abrangem a heterogeneidade das neoplasias de colo uterino. Outras linhagens de células de câncer neoplásicas cervicais, como SiHa (HPV 16+), HT-3 (HPV 30+) e C33A (HPV-), devem ser analisadas após o tratamento com CC e LET para estabelecer bases mais sólidas, comparar resultados e compreender melhor como esses medicamentos podem interferir em suas capacidades e, conseqüentemente, na progressão do câncer.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiello, N. M. and Y. Kang (2019). "Context-dependent EMT programs in cancer metastasis." *J Exp Med* 216(5): 1016-1026.
- Akel, R. A., X. M. Guo, M. B. Moravek, R. Confino, K. N. Smith, A. K. Lawson, S. C. Klock, E. J. Tanner Iii and M. E. Pavone (2020). "Ovarian Stimulation Is Safe and Effective for Patients with Gynecologic Cancer." *J Adolesc Young Adult Oncol* 9(3): 367-374.
- Alper, M. M. and B. C. Fauser (2017). "Ovarian stimulation protocols for IVF: is more better than less?" *Reprod Biomed Online* 34(4): 345-353.
- Althuis, M. D., K. S. Moghissi, C. L. Westhoff, B. Scoccia, E. J. Lamb, J. H. Lubin and L. A. Brinton (2005). "Uterine cancer after use of clomiphene citrate to induce ovulation." *Am J Epidemiol* 161(7): 607-615.
- Althuis, M. D., B. Scoccia, E. J. Lamb, K. S. Moghissi, C. L. Westhoff, J. E. Mabie and L. A. Brinton (2005). "Melanoma, thyroid, cervical, and colon cancer risk after use of fertility drugs." *Am J Obstet Gynecol* 193(3 Pt 1): 668-674.
- Amaro-Filho, S. M., C. B. Pereira Chaves, S. P. Felix, D. L. Basto, L. M. de Almeida and M. A. M. Moreira (2018). "HPV DNA methylation at the early promoter and E1/E2 integrity: A comparison between HPV16, HPV18 and HPV45 in cervical cancer." *Papillomavirus Res* 5: 172-179.
- Badawy, A., I. Abdel Aal and M. Abulatta (2009). "Clomiphene citrate or anastrozole for ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome? A prospective controlled trial." *Fertil Steril* 92(3): 860-863.

- Badawy, A., I. Abdel Aal and M. Abulatta (2009). "Clomiphene citrate or letrozole for ovulation induction in women with polycystic ovarian syndrome: a prospective randomized trial." *Fertil Steril* 92(3): 849-852.
- Barroeta, J. E., T. L. Pasha, G. Acs and P. J. Zhang (2007). "Immunoprofile of endocervical and endometrial stromal cells and its potential application in localization of tumor involvement." *Int J Gynecol Pathol* 26(1): 76-82.
- Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida and A. Garcia De Herreros (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." *Nat Cell Biol* 2(2): 84-89.
- Benshushan, A., O. Paltiel, A. Brzezinski, V. Tanos, M. Barchana, O. Shoshani, L. Gordon, L. Tsur and J. G. Schenker (2001). "Ovulation induction and risk of endometrial cancer: a pilot study." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 98(1): 53-57.
- Berman, T. A. and J. T. Schiller (2017). "Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases." *Cancer* 123(12): 2219-2229.
- Biljan, M. M. H., R.; Brassard, N. (2005). "The Outcome of 150 Babies Following the Treatment With Letrozole or Letrozole and Gonadotropins." *Fertility and Sterility*.
- Bogliolo, G. B. F. (2016). *Patologia*, Editora Guanabara Koogan.
- Borges, I. d. T. (2019). *Efeito do Citrato de Clomifeno e Letrozol no metabolismo e proliferação de células de câncer cervical (HeLa)*. Graduação Monografia de Conclusão de Curso Experimental, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen and H. zur Hausen (1984). "A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer." *EMBO J* 3(5): 1151-1157.
- Bowdler, I. M. (1972). "The development and usage of clomiphene." *Bristol Med Chir J* 87(324): 53-56.
- Brabletz, S. and T. Brabletz (2010). "The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?" *EMBO Rep* 11(9): 670-677.
- Brinton, L. A., K. S. Moghissi, B. Scoccia, E. J. Lamb, B. Trabert, S. Niwa, D. Ruggieri and C. L. Westhoff (2015). "Effects of fertility drugs on cancers other than breast and gynecologic malignancies." *Fertil Steril* 104(4): 980-988.
- Brinton, L. A., B. Scoccia, K. S. Moghissi, C. L. Westhoff, M. D. Althuis, J. E. Mabie and E. J. Lamb (2004). "Breast cancer risk associated with ovulation-stimulating drugs." *Hum Reprod* 19(9): 2005-2013.

- Brinton, L. A., C. L. Westhoff, B. Scoccia, E. J. Lamb, B. Trabert, S. Niwa and K. S. Moghissi (2013). "Fertility drugs and endometrial cancer risk: results from an extended follow-up of a large infertility cohort." *Hum Reprod* 28(10): 2813-2821.
- Brown, J. and C. Farquhar (2016). "Clomiphene and other antioestrogens for ovulation induction in polycystic ovarian syndrome." *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD002249.
- Burd, E. M. (2003). "Human papillomavirus and cervical cancer." *Clin Microbiol Rev* 16(1): 1-17.
- Burd, E. M. and C. L. Dean (2016). "Human Papillomavirus." *Microbiol Spectr* 4(4).
- Burkhardt, D. L. and J. Sage (2008). "Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene." *Nat Rev Cancer* 8(9): 671-682.
- Calderon-Margalit, R., Y. Friedlander, R. Yanetz, K. Kleinhaus, M. C. Perrin, O. Manor, S. Harlap and O. Paltiel (2009). "Cancer risk after exposure to treatments for ovulation induction." *Am J Epidemiol* 169(3): 365-375.
- Câncer, I. N. d. (2020, 06/10/2021). "Estatísticas de câncer." Retrieved 01/31, 2022.
- Cao, Z. Q., Z. Wang and P. Leng (2019). "Aberrant N-cadherin expression in cancer." *Biomed Pharmacother* 118: 109320.
- Chelimo, C., T. A. Wouldes, L. D. Cameron and J. M. Elwood (2013). "Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer." *J Infect* 66(3): 207-217.
- Chen, A., H. Beetham, M. A. Black, R. Priya, B. J. Telford, J. Guest, G. A. Wiggins, T. D. Godwin, A. S. Yap and P. J. Guilford (2014). "E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition." *BMC Cancer* 14: 552.
- Chen, Z., S. Li, K. Huang, Q. Zhang, J. Wang, X. Li, T. Hu, S. Wang, R. Yang, Y. Jia, H. Sun, F. Tang, H. Zhou, J. Shen, D. Ma and S. Wang (2013). "The nuclear protein expression levels of SNAI1 and ZEB1 are involved in the progression and lymph node metastasis of cervical cancer via the epithelial-mesenchymal transition pathway." *Hum Pathol* 44(10): 2097-2105.
- Clark, J. H. and B. M. Markaverich (1981). "The agonistic-antagonistic properties of clomiphene: a review." *Pharmacol Ther* 15(3): 467-519.
- Comijn, J., G. Berx, P. Vermassen, K. Verschueren, L. van Grunsven, E. Bruyneel, M. Mareel, D. Huylebroeck and F. van Roy (2001). "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion." *Mol Cell* 7(6): 1267-1278.
- Cotran, R. (2010). *Patologia: Bases patológicas das doenças*, Elsevier Editora.
- Cotran, R. (2010). *Robbins & Cotran PATOLOGIA: Bases Patológicas das Doenças*, Saunders.

- Cricca, M., S. Venturoli, E. Leo, S. Costa, M. Musiani and M. Zerbini (2009). "Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions." *J Virol Methods* **158**(1-2): 180-183.
- Crosbie, E. J., M. H. Einstein, S. Franceschi and H. C. Kitchener (2013). "Human papillomavirus and cervical cancer." *Lancet* **382**(9895): 889-899.
- De Craene, B. and G. Berx (2013). "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression." *Nat Rev Cancer* **13**(2): 97-110.
- Denecker, G., N. Vandamme, O. Akay, D. Koludrovic, J. Taminau, K. Lemeire, A. Gheldof, B. De Craene, M. Van Gele, L. Brochez, G. M. Udupi, M. Rafferty, B. Balint, W. M. Gallagher, G. Ghanem, D. Huylebroeck, J. Haigh, J. van den Oord, L. Larue, I. Davidson, J. C. Marine and G. Berx (2014). "Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression." *Cell Death Differ* **21**(8): 1250-1261.
- Diamond, M. P., R. S. Legro, C. Coutifaris, R. Alvero, R. D. Robinson, P. Casson, G. M. Christman, J. Ager, H. Huang, K. R. Hansen, V. Baker, R. Usadi, A. Seungdamrong, G. W. Bates, R. M. Rosen, D. Haisenleder, S. A. Krawetz, K. Barnhart, J. C. Trussell, D. Ohl, Y. Jin, N. Santoro, E. Eisenberg, H. Zhang and N. R. M. Network (2015). "Letrozole, Gonadotropin, or Clomiphene for Unexplained Infertility." *N Engl J Med* **373**(13): 1230-1240.
- Dor, J., L. Lerner-Geva, J. Rabinovici, A. Chetrit, D. Levran, B. Lunenfeld, S. Mashiach and B. Modan (2002). "Cancer incidence in a cohort of infertile women who underwent in vitro fertilization." *Fertil Steril* **77**(2): 324-327.
- Dunne, E. F. and I. U. Park (2013). "HPV and HPV-associated diseases." *Infect Dis Clin North Am* **27**(4): 765-778.
- Elloul, S., M. B. Elstrand, J. M. Nesland, C. G. Trope, G. Kvalheim, I. Goldberg, R. Reich and B. Davidson (2005). "Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma." *Cancer* **103**(8): 1631-1643.
- Fang, J., H. Zhang and S. Jin (2014). "Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy." *Tumour Biol* **35**(6): 5083-5093.
- Feng, S., W. Liu, X. Bai, W. Pan, Z. Jia, S. Zhang, Y. Zhu and W. Tan (2019). "LncRNA-CTS promotes metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition through regulating miR-505/ZEB2 axis in cervical cancer." *Cancer Lett* **465**: 105-117.
- Fujiwara, H., H. Yokota, B. Monk, I. Treilleux, M. Devouassoux-Shisheboran, A. Davis, J. W. Kim, S. Mahner, M. Stany, S. Pignata, I. Ray-Coquard and K. Fujiwara (2014). "Gynecologic



- Cancer InterGroup (GCIG) consensus review for cervical adenocarcinoma." *Int J Gynecol Cancer* 24(9 Suppl 3): S96-101.
- Fund, W. C. R. (2021). " Worldwide cancer data: Global cancer statistics for the most common cancers in the world." Retrieved 12/05, 2019.
- Gennari, A., M. Costa, M. Puntoni, L. Paleari, A. De Censi, M. P. Sormani, N. Provinciali and P. Bruzzi (2015). "Breast cancer incidence after hormonal treatments for infertility: systematic review and meta-analysis of population-based studies." *Breast Cancer Res Treat* 150(2): 405-413.
- Goldrat, O., C. Gervy, Y. Englert, A. Delbaere and I. Demeestere (2015). "Progesterone levels in letrozole associated controlled ovarian stimulation for fertility preservation in breast cancer patients." *Hum Reprod* 30(9): 2184-2189.
- Goossens, S., N. Vandamme, P. Van Vlierberghe and G. Berx (2017). "EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET." *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1868(2): 584-591.
- Graham, S. V. (2017). "The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review." *Clin Sci (Lond)* 131(17): 2201-2221.
- Greenblatt, R. B., W. E. Barfield, E. C. Jungck and A. W. Ray (1961). "Induction of ovulation with MRL/41. Preliminary report." *JAMA* 178: 101-104.
- Groves, I. J. and N. Coleman (2015). "Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease." *J Pathol* 235(4): 527-538.
- Gu, S. and X. H. Feng (2018). "TGF-beta signaling in cancer." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 50(10): 941-949.
- Hammou, R. A., M. Benhessou, A. Bouziyane, N. Hassou, M. N. Benhchekroun, H. Bessi and M. M. Ennaji (2019). "Oncogenic Human Papillomavirus involvement in epithelial ovarian carcinoma among women in Morocco." *Bioinformation* 15(1): 55-60.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Hannibal, C. G., A. Jensen, H. Sharif and S. K. Kjaer (2008). "Malignant melanoma risk after exposure to fertility drugs: results from a large Danish cohort study." *Cancer Causes Control* 19(7): 759-765.
- Hannibal, C. G., A. Jensen, H. Sharif and S. K. Kjaer (2008). "Risk of thyroid cancer after exposure to fertility drugs: results from a large Danish cohort study." *Hum Reprod* 23(2): 451-456.

- Harvey, A. M. (1976). "Johns Hopkins--the birthplace of tissue culture: the story of Ross G. Harrison, Warren Y. Lewis, and George O. Gey." *Johns Hopkins Med J Suppl*: 114-123.
- Hodgson, A., E. Olkhov-Mitsel, B. E. Howitt, M. R. Nucci and C. Parra-Herran (2019). "International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): correlation with adverse clinicopathological features and patient outcome." *J Clin Pathol* **72**(5): 347-353.
- Hodgson, A., K. J. Park, B. Djordjevic, B. E. Howitt, M. R. Nucci, E. Oliva, S. Stolnicu, B. Xu, R. A. Soslow and C. Parra-Herran (2019). "International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification: Validation and Interobserver Reproducibility." *Am J Surg Pathol* **43**(1): 75-83.
- Hoff, P. M., R. Coudry and C. M. Moniz (2017). "Pathology of Anal Cancer." *Surg Oncol Clin N Am* **26**(1): 57-71.
- Holzer, H., R. Casper and T. Tulandi (2006). "A new era in ovulation induction." *Fertil Steril* **85**(2): 277-284.
- Homburg, R. (2005). "Clomiphene citrate--end of an era? A mini-review." *Hum Reprod* **20**(8): 2043-2051.
- Hsu, M. Y., M. J. Wheelock, K. R. Johnson and M. Herlyn (1996). "Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas." *J Invest Dermatol Symp Proc* **1**(2): 188-194.
- INCA. (2021). "Câncer: Prevenção e fatores de risco." Retrieved 12/01/2022, 2022.
- INCA. (2022, 11/18/2021). "Câncer do Colo do Útero." Retrieved 02/01/2022, 2022.
- Ioannidis, J. P., Y. Zhou, C. Q. Chang, S. D. Schully, M. J. Khoury and A. N. Freedman (2014). "Potential increased risk of cancer from commonly used medications: an umbrella review of meta-analyses." *Ann Oncol* **25**(1): 16-23.
- Islam, S., T. E. Carey, G. T. Wolf, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (1996). "Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion." *J Cell Biol* **135**(6 Pt 1): 1643-1654.
- Jensen, A., H. Sharif, K. Frederiksen and S. K. Kjaer (2009). "Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer: Danish Population Based Cohort Study." *BMJ* **338**: b249.
- Jones, H. W., Jr. (1997). "Record of the first physician to see Henrietta Lacks at the Johns Hopkins Hospital: history of the beginning of the HeLa cell line." *Am J Obstet Gynecol* **176**(6): S227-228.
- Kadaja, M., A. Sumerina, T. Verst, M. Ojarand, E. Ustav and M. Ustav (2007). "Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery." *EMBO J* **26**(8): 2180-2191.

- Kasvi. (2018, 05/11/2018). "HeLa: conheça a história das células imortais e o seu legado para a ciência." Retrieved 02/09/2022, 2022.
- Kessous, R., E. Davidson, M. Meirovitz, R. Sergienko and E. Sheiner (2016). "The risk of female malignancies after fertility treatments: a cohort study with 25-year follow-up." *J Cancer Res Clin Oncol* 142(1): 287-293.
- Kim, J., B. K. Kim, D. Jeon, C. H. Lee, J. W. Roh, J. Y. Kim and S. Y. Park (2020). "Type-Specific Viral Load and Physical State of HPV Type 16, 18, and 58 as Diagnostic Biomarkers for High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions or Cervical Cancer." *Cancer Res Treat* 52(2): 396-405.
- Kim, J., V. Turan and K. Oktay (2016). "Long-Term Safety of Letrozole and Gonadotropin Stimulation for Fertility Preservation in Women With Breast Cancer." *J Clin Endocrinol Metab* 101(4): 1364-1371.
- Klymenko, Y., O. Kim, E. Loughran, J. Yang, R. Lombard, M. Alber and M. S. Stack (2017). "Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis." *Oncogene* 36(42): 5840-5851.
- Koeneman, M. M., R. F. Kruitwagen, H. W. Nijman, B. F. Slangen, T. Van Gorp and A. J. Kruse (2015). "Natural history of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a review of prognostic biomarkers." *Expert Rev Mol Diagn* 15(4): 527-546.
- Kristiansson, P., O. Bjor and H. Wramsby (2007). "Tumour incidence in Swedish women who gave birth following IVF treatment." *Hum Reprod* 22(2): 421-426.
- Kroener, L., D. Dumesic and Z. Al-Safi (2017). "Use of fertility medications and cancer risk: a review and update." *Curr Opin Obstet Gynecol* 29(4): 195-201.
- Kudela, E., V. Holubekova, A. Farkasova and J. Danko (2016). "Determination of malignant potential of cervical intraepithelial neoplasia." *Tumour Biol* 37(2): 1521-1525.
- Kuphal, S. and A. K. Bosserhoff (2006). "Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma." *Oncogene* 25(2): 248-259.
- Kurta, M. L., K. B. Moysich, J. L. Weissfeld, A. O. Youk, C. H. Bunker, R. P. Edwards, F. Modugno, R. B. Ness and B. Diergaarde (2012). "Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer: results from a U.S.-based case-control study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21(8): 1282-1292.
- Lacey, C. J. (2005). "Therapy for genital human papillomavirus-related disease." *J Clin Virol* 32 Suppl 1: S82-90.
- Lacey, C. J., C. M. Lowndes and K. V. Shah (2006). "Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease." *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/35-41.

- Lambertini, M., P. Anserini and L. Del Mastro (2016). "Is it safe to perform a controlled ovarian stimulation for assisted reproduction in young breast cancer survivors?" *Eur J Cancer* 54: 163-164.
- Lerner-Geva, L., J. Rabinovici, L. Olmer, T. Blumstein, S. Mashiach and B. Lunenfeld (2012). "Are infertility treatments a potential risk factor for cancer development? Perspective of 30 years of follow-up." *Gynecol Endocrinol* 28(10): 809-814.
- Li, G., K. Satyamoorthy and M. Herlyn (2001). "N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells." *Cancer Res* 61(9): 3819-3825.
- Li, K., W. He, N. Lin, X. Wang and Q. X. Fan (2010). "Downregulation of N-cadherin expression inhibits invasiveness, arrests cell cycle and induces cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma." *Cancer Invest* 28(5): 479-486.
- Li, L. L., J. Zhou, X. J. Qian and Y. D. Chen (2013). "Meta-analysis on the possible association between in vitro fertilization and cancer risk." *Int J Gynecol Cancer* 23(1): 16-24.
- Lim, A. W., R. Landy, A. Castanon, A. Hollingworth, W. Hamilton, N. Dudding and P. Sasieni (2016). "Cytology in the diagnosis of cervical cancer in symptomatic young women: a retrospective review." *Br J Gen Pract* 66(653): e871-e879.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Liu, Y., C. Xu, J. Pan, C. Sun, H. Zhou and Y. Meng (2021). "Significance of the viral load of high-risk HPV in the diagnosis and prediction of cervical lesions: a retrospective study." *BMC Womens Health* 21(1): 353.
- Loh, C. Y., J. Y. Chai, T. F. Tang, W. F. Wong, G. Sethi, M. K. Shanmugam, P. P. Chong and C. Y. Looi (2019). "The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges." *Cells* 8(10).
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 362-372.
- Lu, W. and Y. Kang (2019). "Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis." *Dev Cell* 49(3): 361-374.
- Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees and G. M. Hutchins (2009). "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination." *Arch Pathol Lab Med* 133(9): 1463-1467.
- Luft, F., R. Klaes, M. Nees, M. Durst, V. Heilmann, P. Melsheimer and M. von Knebel Doeberitz (2001). "Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells." *Int J Cancer* 92(1): 9-17.

- Luk, J. and A. Arici (2010). "Does the ovarian reserve decrease from repeated ovulation stimulations?" *Curr Opin Obstet Gynecol* 22(3): 177-182.
- Luke, B., M. B. Brown, L. G. Spector, S. A. Missmer, R. E. Leach, M. Williams, L. Koch, Y. Smith, J. E. Stern, G. D. Ball and M. J. Schymura (2015). "Cancer in women after assisted reproductive technology." *Fertil Steril* 104(5): 1218-1226.
- Luo, Y., T. Yu, Q. Zhang, Q. Fu, Y. Hu, M. Xiang, H. Peng, T. Zheng, L. Lu and H. Shi (2018). "Upregulated N-cadherin expression is associated with poor prognosis in epithelial-derived solid tumours: A meta-analysis." *Eur J Clin Invest* 48(4).
- Ma, Y., X. Zheng, J. Zhou, Y. Zhang and K. Chen (2015). "ZEB1 promotes the progression and metastasis of cervical squamous cell carcinoma via the promotion of epithelial-mesenchymal transition." *Int J Clin Exp Pathol* 8(9): 11258-11267.
- Maeda, G., T. Chiba, M. Okazaki, T. Satoh, Y. Taya, T. Aoba, K. Kato, S. Kawashiri and K. Imai (2005). "Expression of SIP1 in oral squamous cell carcinomas: implications for E-cadherin expression and tumor progression." *Int J Oncol* 27(6): 1535-1541.
- Mahal, B. A., P. J. Catalano, R. I. Haddad, G. J. Hanna, J. I. Kass, J. D. Schoenfeld, R. B. Tishler and D. N. Margalit (2019). "Incidence and Demographic Burden of HPV-associated Oropharyngeal Head and Neck Cancers in the United States." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.
- Mantikou, E., M. A. Youssef, M. van Wely, F. van der Veen, H. G. Al-Inany, S. Repping and S. Mastenbroek (2013). "Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review." *Hum Reprod Update* 19(3): 210-220.
- Marur, S., G. D'Souza, W. H. Westra and A. A. Forastiere (2010). "HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic." *Lancet Oncol* 11(8): 781-789.
- Mattiuzzi, C. and G. Lippi (2020). "Cancer statistics: a comparison between World Health Organization (WHO) and Global Burden of Disease (GBD)." *Eur J Public Health* 30(5): 1026-1027.
- Meissner, J. D. (1999). "Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines." *J Gen Virol* 80 ( Pt 7): 1725-1733.
- Mendonsa, A. M., T. Y. Na and B. M. Gumbiner (2018). "E-cadherin in contact inhibition and cancer." *Oncogene* 37(35): 4769-4780.
- Mikkelsen, T. J., P. D. Kroboth, W. J. Cameron, L. W. Dittert, V. Chungi and P. J. Manberg (1986). "Single-dose pharmacokinetics of clomiphene citrate in normal volunteers." *Fertil Steril* 46(3): 392-396.

- Mitwally, M. F. and R. F. Casper (2001). "Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate." *Fertil Steril* 75(2): 305-309.
- Mitwally, M. F. and R. F. Casper (2002). "Aromatase inhibition for ovarian stimulation: future avenues for infertility management." *Curr Opin Obstet Gynecol* 14(3): 255-263.
- Mitwally, M. F. and R. F. Casper (2004). "Aromatase inhibitors in ovulation induction." *Semin Reprod Med* 22(1): 61-78.
- Miyoshi, A., Y. Kitajima, K. Sumi, K. Sato, A. Hagiwara, Y. Koga and K. Miyazaki (2004). "Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells." *Br J Cancer* 90(6): 1265-1273.
- Momenimovahed, Z., S. Taheri, A. Tiznobaik and H. Salehiniya (2019). "Do the Fertility Drugs Increase the Risk of Cancer? A Review Study." *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 313.
- Na, T. Y., L. Schecterson, A. M. Mendonsa and B. M. Gumbiner (2020). "The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps." *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(11): 5931-5937.
- Nguyen, T., L. Duchesne, G. H. N. Sankara Narayana, N. Boggetto, D. D. Fernig, C. Uttamrao Murade, B. Ladoux and R. M. Mege (2019). "Enhanced cell-cell contact stability and decreased N-cadherin-mediated migration upon fibroblast growth factor receptor-N-cadherin cross talk." *Oncogene* 38(35): 6283-6300.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* 139(2): 271-279.
- Nieman, M. T., R. S. Prudoff, K. R. Johnson and M. J. Wheelock (1999). "N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression." *J Cell Biol* 147(3): 631-644.
- Novartis Pharmaceuticals Canada Inc (2005). Contraindication on Femara\* (letrozole) in premenopausal women. Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.
- O'Neill, C. L., S. Chow, Z. Rosenwaks and G. D. Palermo (2018). "Development of ICSI." *Reproduction* 156(1): F51-F58.
- Oktay, K., A. Hourvitz, G. Sahin, O. Oktem, B. Safro, A. Cil and H. Bang (2006). "Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy." *J Clin Endocrinol Metab* 91(10): 3885-3890.
- Okugawa, Y., Y. Inoue, K. Tanaka, M. Kawamura, S. Saigusa, Y. Toiyama, M. Ohi, K. Uchida, Y. Mohri and M. Kusunoki (2013). "Smad interacting protein 1 (SIP1) is associated with

- peritoneal carcinomatosis in intestinal type gastric cancer." *Clin Exp Metastasis* 30(4): 417-429.
- Parazzini, F., C. Pelucchi, R. Talamini, M. Montella and C. La Vecchia (2010). "Use of fertility drugs and risk of endometrial cancer in an Italian case-control study." *Eur J Cancer Prev* 19(6): 428-430.
- Park, K. J. (2020). "Cervical adenocarcinoma: integration of HPV status, pattern of invasion, morphology and molecular markers into classification." *Histopathology* 76(1): 112-127.
- Pastushenko, I. and C. Blanpain (2019). "EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis." *Trends Cell Biol* 29(3): 212-226.
- Petry, K. U. (2014). "HPV and cervical cancer." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 244: 59-62; discussion 62.
- Pirog, E. C. (2017). "Cervical Adenocarcinoma: Diagnosis of Human Papillomavirus-Positive and Human Papillomavirus-Negative Tumors." *Arch Pathol Lab Med* 141(12): 1653-1667.
- Popescu, N. C., S. C. Amsbaugh and J. A. DiPaolo (1987). "Human papillomavirus type 18 DNA is integrated at a single chromosome site in cervical carcinoma cell line SW756." *J Virol* 61(5): 1682-1685.
- Potashnik, G., L. Lerner-Geva, L. Genkin, A. Chetrit, E. Lunenfeld and A. Porath (1999). "Fertility drugs and the risk of breast and ovarian cancers: results of a long-term follow-up study." *Fertil Steril* 71(5): 853-859.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive, M. (2016). "Fertility drugs and cancer: a guideline." *Fertil Steril* 106(7): 1617-1626.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address, A. a. o. and M. Practice Committee of the American Society for Reproductive (2016). "Fertility drugs and cancer: a guideline." *Fertil Steril* 106(7): 1617-1626.
- Pritts, E. A. (2010). "Letrozole for ovulation induction and controlled ovarian hyperstimulation." *Curr Opin Obstet Gynecol* 22(4): 289-294.
- Ran, J., D. L. Lin, R. F. Wu, Q. H. Chen, H. P. Huang, N. X. Qiu and S. Quan (2015). "ZEB1 promotes epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer metastasis." *Fertil Steril* 103(6): 1606-1614 e1601-1602.
- Rebar, R., H. L. Judd, S. S. Yen, J. Rakoff, G. Vandenberg and F. Naftolin (1976). "Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome." *J Clin Invest* 57(5): 1320-1329.

- Reigstad, M. M., I. K. Larsen, T. A. Myklebust, T. E. Robsahm, N. B. Oldereid, A. K. Omland, S. Vangen, L. A. Brinton and R. Storeng (2015). "Cancer risk among parous women following assisted reproductive technology." *Hum Reprod* 30(8): 1952-1963.
- Reigstad, M. M., I. K. Larsen, T. A. Myklebust, T. E. Robsahm, N. B. Oldereid, A. K. Omland, S. Vangen, L. A. Brinton and R. Storeng (2015). "Risk of breast cancer following fertility treatment--a registry based cohort study of parous women in Norway." *Int J Cancer* 136(5): 1140-1148.
- Reigstad, M. M., R. Storeng, T. A. Myklebust, N. B. Oldereid, A. K. Omland, T. E. Robsahm, L. A. Brinton, S. Vangen, K. Furu and I. K. Larsen (2017). "Cancer Risk in Women Treated with Fertility Drugs According to Parity Status-A Registry-based Cohort Study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26(6): 953-962.
- Richart, R. M. (1975). "Letter: Identity of cervical dysplasias." *Lancet* 1(7904): 451.
- Roma, A. A. (2015). "Patterns of Invasion of Cervical Adenocarcinoma as Predicators of Outcome." *Adv Anat Pathol* 22(6): 345-354.
- Ron, E., B. Lunenfeld, J. Menczer, T. Blumstein, L. Katz, G. Oelsner and D. Serr (1987). "Cancer incidence in a cohort of infertile women." *Am J Epidemiol* 125(5): 780-790.
- Ronnett, B. M. (2016). "Endocervical adenocarcinoma: selected diagnostic challenges." *Mod Pathol* 29 Suppl 1: S12-28.
- Rossing, M. A., J. R. Daling, N. S. Weiss, D. E. Moore and S. G. Self (1995). "Risk of cutaneous melanoma in a cohort of infertile women." *Melanoma Res* 5(2): 123-127.
- Rossing, M. A., J. R. Daling, N. S. Weiss, D. E. Moore and S. G. Self (1996). "In situ and invasive cervical carcinoma in a cohort of infertile women." *Fertil Steril* 65(1): 19-22.
- Saitoh, M. (2018). "Involvement of partial EMT in cancer progression." *J Biochem* 164(4): 257-264.
- Sakamoto, K., Y. Imanishi, T. Tomita, M. Shimoda, K. Kameyama, K. Shibata, N. Sakai, H. Ozawa, S. Shigetomi, R. Fujii, M. Fujii and K. Ogawa (2012). "Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy." *Ann Surg Oncol* 19(2): 612-619.
- Sato, M., K. Kawana, K. Adachi, A. Fujimoto, M. Yoshida, H. Nakamura, H. Nishida, T. Inoue, A. Taguchi, J. Ogishima, S. Eguchi, A. Yamashita, K. Tomio, O. Wada-Hiraike, K. Oda, T. Nagamatsu, Y. Osuga and T. Fujii (2017). "Intracellular signaling entropy can be a biomarker for predicting the development of cervical intraepithelial neoplasia." *PLoS One* 12(4): e0176353.



- Schwartz, P. E., O. Hadjimichael, D. M. Lowell, M. J. Merino and D. Janerich (1996). "Rapidly progressive cervical cancer: the Connecticut experience." *Am J Obstet Gynecol* 175(4 Pt 2): 1105-1109.
- Scott, C. L. and K. D. Omilusik (2019). "ZEBs: Novel Players in Immune Cell Development and Function." *Trends Immunol* 40(5): 431-446.
- Sharma, A., L. H. Boise and M. Shanmugam (2019). "Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death." *Cancers (Basel)* 11(8).
- Siristatidis, C., T. N. Sergentanis, P. Kanavidis, M. Trivella, M. Sotiraki, I. Mavromatis, T. Psaltopoulou, A. Skalkidou and E. T. Petridou (2013). "Controlled ovarian hyperstimulation for IVF: impact on ovarian, endometrial and cervical cancer--a systematic review and meta-analysis." *Hum Reprod Update* 19(2): 105-123.
- Society, A. C. (2022). "Cancer Information and Resources " Retrieved 02/01, 2022.
- Solomon, H., S. Madar and V. Rotter (2011). "Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer." *J Pathol* 225(4): 475-478.
- Stanley, M. (2010). "Pathology and epidemiology of HPV infection in females." *Gynecol Oncol* 117(2 Suppl): S5-10.
- Stemmler, M. P., R. L. Eccles, S. Brabletz and T. Brabletz (2019). "Non-redundant functions of EMT transcription factors." *Nat Cell Biol* 21(1): 102-112.
- Stewart, L. M., C. D. Holman, R. Hart, M. K. Bulsara, D. B. Preen and J. C. Finn (2012). "In vitro fertilization and breast cancer: is there cause for concern?" *Fertil Steril* 98(2): 334-340.
- Stolnicu, S., I. Barsan, L. Hoang, P. Patel, C. Terinte, A. Pesci, S. Aviel-Ronen, T. Kiyokawa, I. Alvarado-Cabrero, M. C. Pike, E. Oliva, K. J. Park and R. A. Soslow (2018). "International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): A New Pathogenetic Classification for Invasive Adenocarcinomas of the Endocervix." *Am J Surg Pathol* 42(2): 214-226.
- Stolnicu, S., L. Hoang and R. A. Soslow (2019). "Recent advances in invasive adenocarcinoma of the cervix." *Virchows Arch* 475(5): 537-549.
- Stratton, K. L. and D. J. Culin (2016). "A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer." *Oncology (Williston Park)* 30(3): 245-249.
- Sun, R., H. Guan, W. Liu, J. Liang, F. Wang and C. Li (2020). "Expression of BMP7 in cervical cancer and inhibition of epithelial-mesenchymal transition by BMP7 knockdown in HeLa cells." *Int J Mol Med* 45(5): 1417-1424.

- Tang, Y., Y. Zhao, J. Ran and Y. Wang (2020). "MicroRNA-21 promotes cell metastasis in cervical cancer through modulating epithelial-mesenchymal transition." *Oncol Lett* 19(4): 3289-3295.
- Tatsumi, T., S. C. Jwa, A. Kuwahara, M. Irahara, T. Kubota and H. Saito (2017). "No increased risk of major congenital anomalies or adverse pregnancy or neonatal outcomes following letrozole use in assisted reproductive technology." *Hum Reprod* 32(1): 125-132.
- Tian, Y., P. Qi, Q. Niu and X. Hu (2020). "Combined Snail and E-cadherin Predicts Overall Survival of Cervical Carcinoma Patients: Comparison Among Various Epithelial-Mesenchymal Transition Proteins." *Front Mol Biosci* 7: 22.
- Tjalma, W. A., T. R. Van Waes, L. E. Van den Eeden and J. J. Bogers (2005). "Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 19(4): 469-483.
- Tomao, F., A. Papa, G. Lo Russo, S. Zuber, G. P. Spinelli, L. Rossi, D. Caruso, N. Prinzi, V. Stati, P. Benedetti Panici and S. Tomao (2014). "Correlation between fertility drugs use and malignant melanoma incidence: the state of the art." *Tumour Biol* 35(9): 8415-8424.
- Trabert, B., E. J. Lamb, B. Scoccia, K. S. Moghissi, C. L. Westhoff, S. Niwa and L. A. Brinton (2013). "Ovulation-inducing drugs and ovarian cancer risk: results from an extended follow-up of a large United States infertility cohort." *Fertil Steril* 100(6): 1660-1666.
- Tulandi, T., J. Martin, R. Al-Fadhli, N. Kabli, R. Forman, J. Hitkari, C. Librach, E. Greenblatt and R. F. Casper (2006). "Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate." *Fertil Steril* 85(6): 1761-1765.
- Turunen, S. P., O. Tatti-Bugaeva and K. Lehti (2017). "Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864(11 Pt A): 1974-1988.
- Van Campenhout, J., E. Borreman, H. Wyman and A. Antaki (1973). "Induction of ovulation with cisclophene." *Am J Obstet Gynecol* 115(3): 321-327.
- van Leeuwen, F. E., H. Klip, T. M. Mooij, A. M. van de Swaluw, C. B. Lambalk, M. Kortman, J. S. Laven, C. A. Jansen, F. M. Helmerhorst, B. J. Cohlen, W. N. Willemsen, J. M. Smeenk, A. H. Simons, F. van der Veen, J. L. Evers, P. A. van Dop, N. S. Macklon and C. W. Burger (2011). "Risk of borderline and invasive ovarian tumours after ovarian stimulation for in vitro fertilization in a large Dutch cohort." *Hum Reprod* 26(12): 3456-3465.
- Vandewalle, C., J. Comijn, B. De Craene, P. Vermassen, E. Bruyneel, H. Andersen, E. Tulchinsky, F. Van Roy and G. Berx (2005). "SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions." *Nucleic Acids Res* 33(20): 6566-6578.

- Vohora, D., A. Kalam, A. Leekha, S. Talegaonkar and A. K. Verma (2017). "Combined Raloxifene and Letrozole for Breast Cancer Patients." *Arch Med Res* 48(6): 561-565.
- Waggoner, S. E. (2003). "Cervical cancer." *Lancet* 361(9376): 2217-2225.
- Wakeham, K., K. Kavanagh, K. Cuschieri, D. Millan, K. G. Pollock, S. Bell, K. Burton, N. S. Reed and S. V. Graham (2017). "HPV status and favourable outcome in vulvar squamous cancer." *Int J Cancer* 140(5): 1134-1146.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer and N. Munoz (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J Pathol* 189(1): 12-19.
- Wang, Y., J. Shi, K. Chai, X. Ying and B. P. Zhou (2013). "The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis." *Curr Cancer Drug Targets* 13(9): 963-972.
- Weaver, B. A. (2006). "Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection." *J Am Osteopath Assoc* 106(3 Suppl 1): S2-8.
- Whitelaw, M. J., C. F. Kalman and L. R. Grams (1970). "The significance of the high ovulation rate versus the low pregnancy rate with Clomid. A review of 203 private anovulatory patients." *Am J Obstet Gynecol* 107(6): 865-877.
- WHO (2019). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer), World Health Organization.
- WHO, W. H. O. (2020). International Agency for Research on Cancer. <https://www.iarc.who.int/>.
- Wiley, D. J., J. Douglas, K. Beutner, T. Cox, K. Fife, A. B. Moscicki and L. Fukumoto (2002). "External genital warts: diagnosis, treatment, and prevention." *Clin Infect Dis* 35(Suppl 2): S210-224.
- Williams, N. L., T. L. Werner, E. A. Jarboe and D. K. Gaffney (2015). "Adenocarcinoma of the cervix: should we treat it differently?" *Curr Oncol Rep* 17(4): 17.
- Winer, R. L., J. P. Hughes, Q. Feng, S. O'Reilly, N. B. Kiviat, K. K. Holmes and L. A. Koutsky (2006). "Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women." *N Engl J Med* 354(25): 2645-2654.
- Wipperman, J., T. Neil and T. Williams (2018). "Cervical Cancer: Evaluation and Management." *Am Fam Physician* 97(7): 449-454.
- Wong, S. H. M., C. M. Fang, L. H. Chuah, C. O. Leong and S. C. Ngai (2018). "E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications." *Crit Rev Oncol Hematol* 121: 11-22.

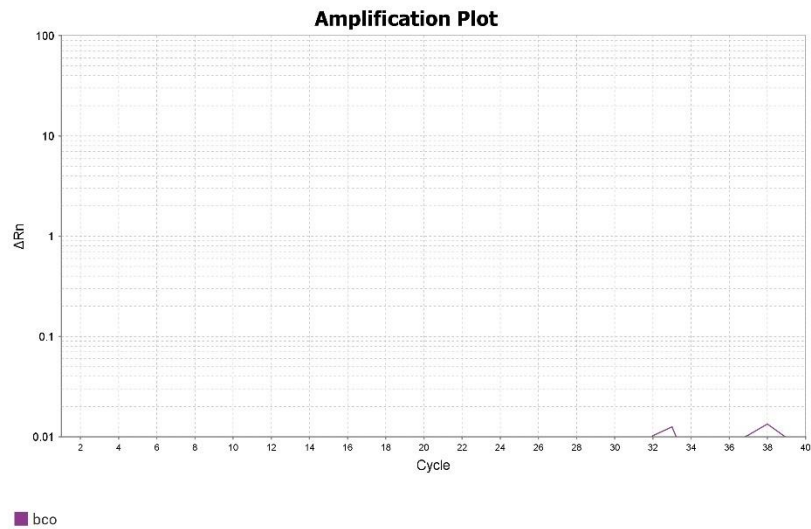
- Xiao, C. Y., B. B. Fu, Z. Y. Li, G. Mushtaq, M. A. Kamal, J. H. Li, G. C. Tang and S. S. Xiao (2015). "Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells." *Cancer Cell Int* 15: 53.
- Ye, C., Y. Hu and J. Wang (2019). "MicroRNA-377 Targets Zinc Finger E-box-Binding Homeobox 2 to Inhibit Cell Proliferation and Invasion of Cervical Cancer." *Oncol Res* 27(2): 183-192.
- Ye, Y., Y. Xiao, W. Wang, K. Yearsley, J. X. Gao, B. Shetuni and S. H. Barsky (2010). "ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT." *Oncogene* 29(10): 1451-1462.
- Yeo-Teh, N. S. L., Y. Ito and S. Jha (2018). "High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis." *Int J Mol Sci* 19(6).
- Yli-Kuha, A. N., M. Gissler, R. Klemetti, R. Luoto and E. Hemminki (2012). "Cancer morbidity in a cohort of 9175 Finnish women treated for infertility." *Hum Reprod* 27(4): 1149-1155.
- Yoshida, R., M. Morita, F. Shoji, Y. Nakashima, N. Miura, K. Yoshinaga, T. Koga, E. Tokunaga, H. Saeki, E. Oki, Y. Oda and Y. Maehara (2015). "Clinical Significance of SIP1 and E-cadherin in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Ann Surg Oncol* 22(8): 2608-2614.
- Young, P., D. Purdie, L. Jackman, D. Molloy and A. Green (2001). "A study of infertility treatment and melanoma." *Melanoma Res* 11(5): 535-541.
- Zhou, B., C. J. Der and A. D. Cox (2016). "The role of wild type RAS isoforms in cancer." *Semin Cell Dev Biol* 58: 60-69.
- zur Hausen, H. (1987). "Papillomaviruses in human genital cancer." *Med Oncol Tumor Pharmacother* 4(3-4): 187-192.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." *Nat Rev Cancer* 2(5): 342-350.
- zur Hausen, H. (2009). "Human papillomavirus & cervical cancer." *Indian J Med Res* 130(3): 209.
- zur Hausen, H. (2009). "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." *Virology* 384(2): 260-265.

## 8. ANEXOS

### 8.1. CURVAS qPCR

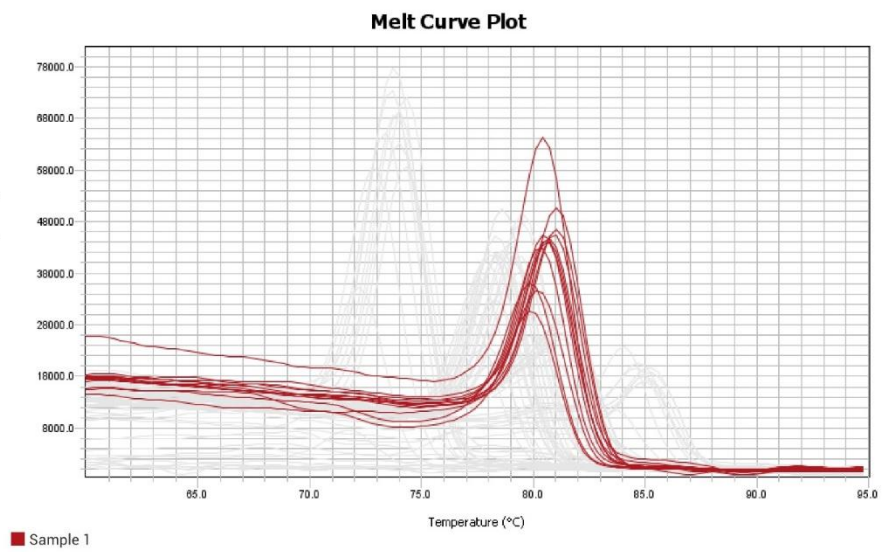
#### GAPDH

**Figura 1**



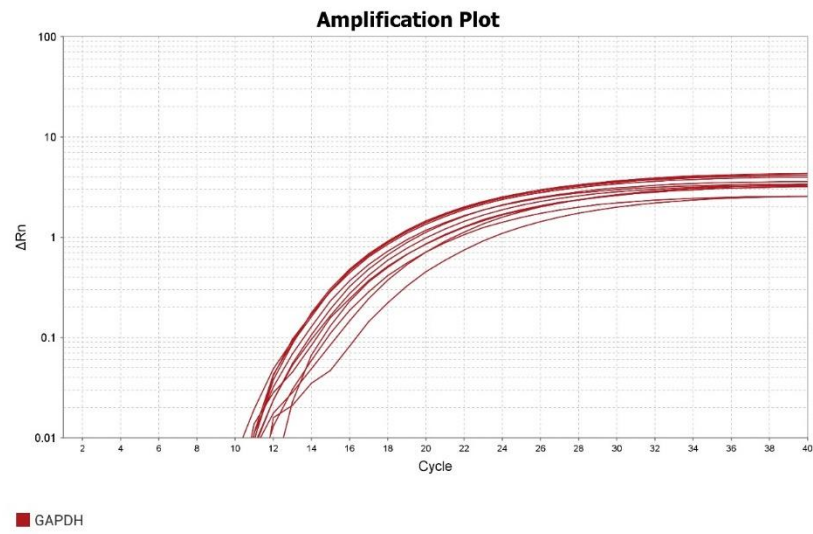
**Figura 1.** Gráfico de amplificação do branco para o gene GAPDH.

**Figura 2**



**Figura 2.** Gráfico da curva de *melting* para o gene GAPDH.

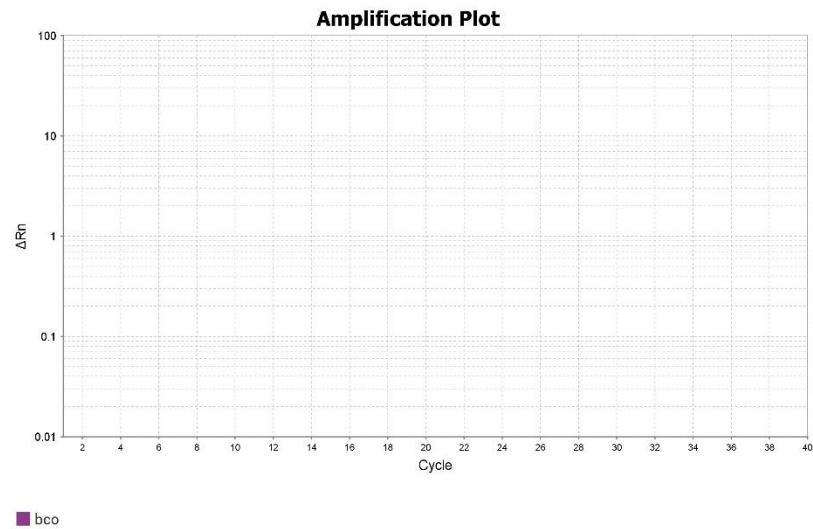
Figura 3



**Figura 3.** Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene GAPDH.

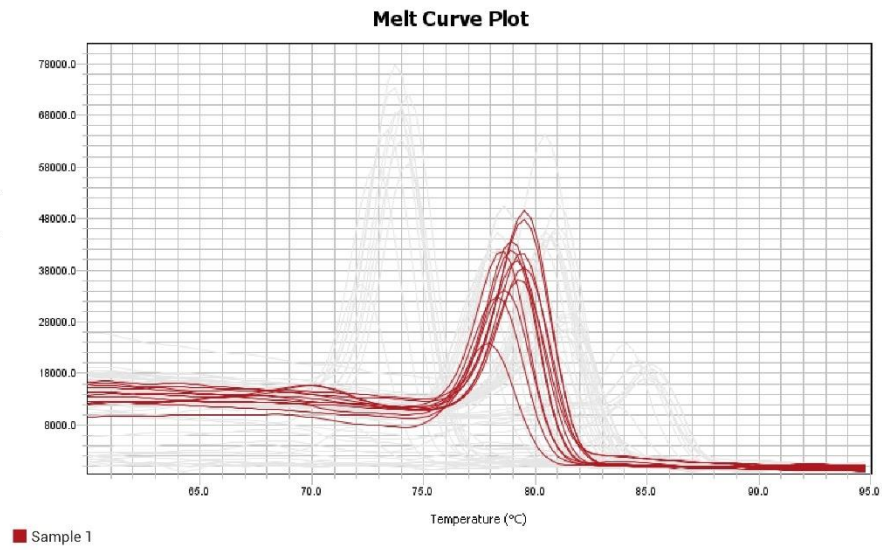
## ECAD

Figura 4



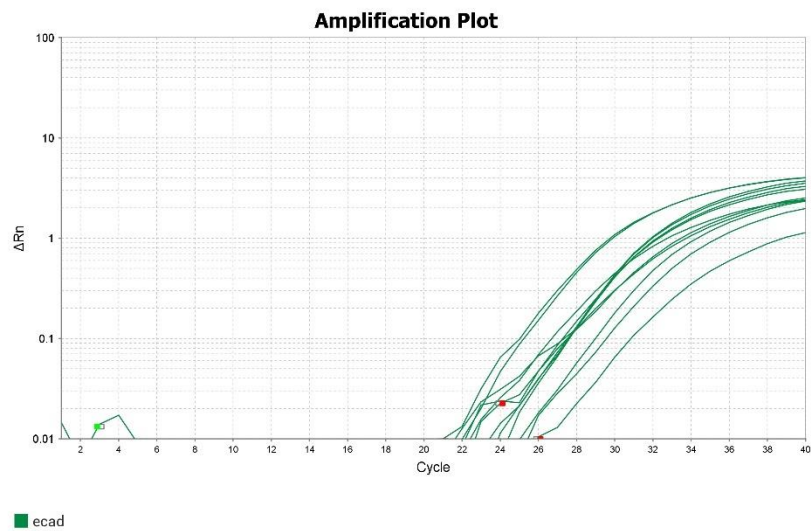
**Figura 4.** Gráfico de amplificação do branco para o gene ECAD.

Figura 5



**Figura 5.** Gráfico da curva de *melting* para o gene ECAD.

Figura 6



**Figura 6.** Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene ECAD.

## NCAD

Figura 7

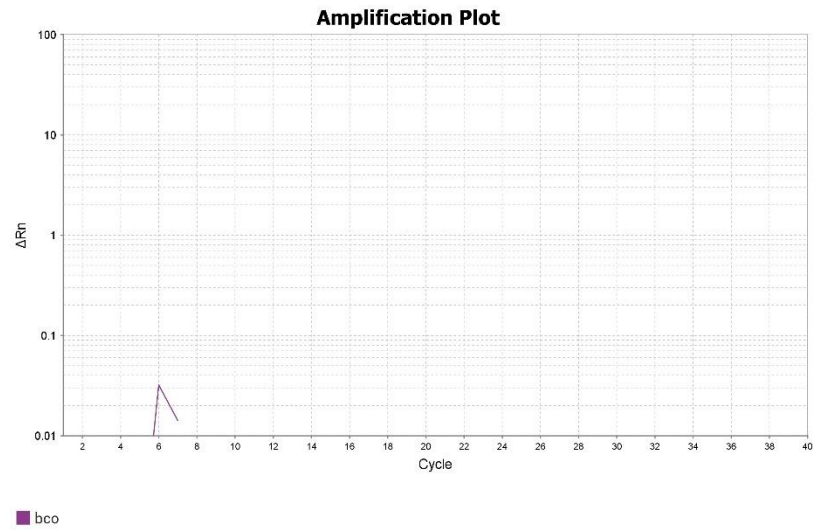
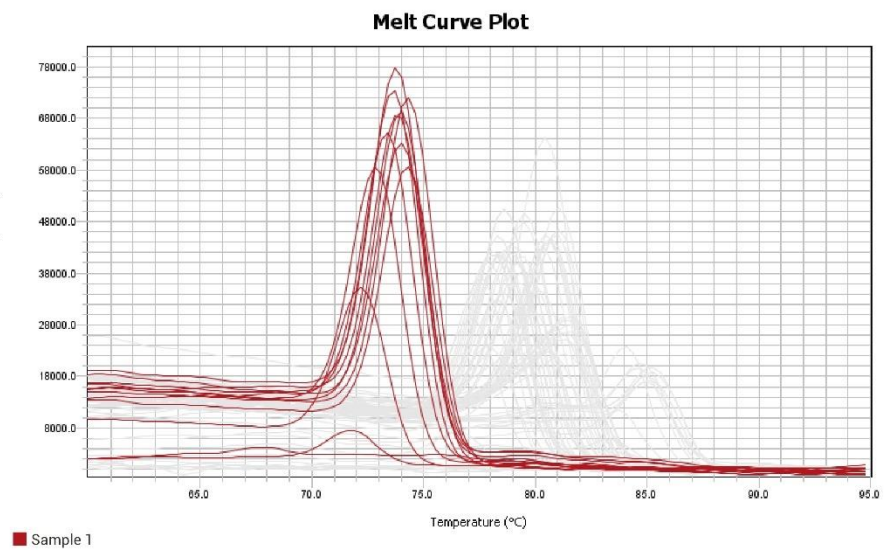
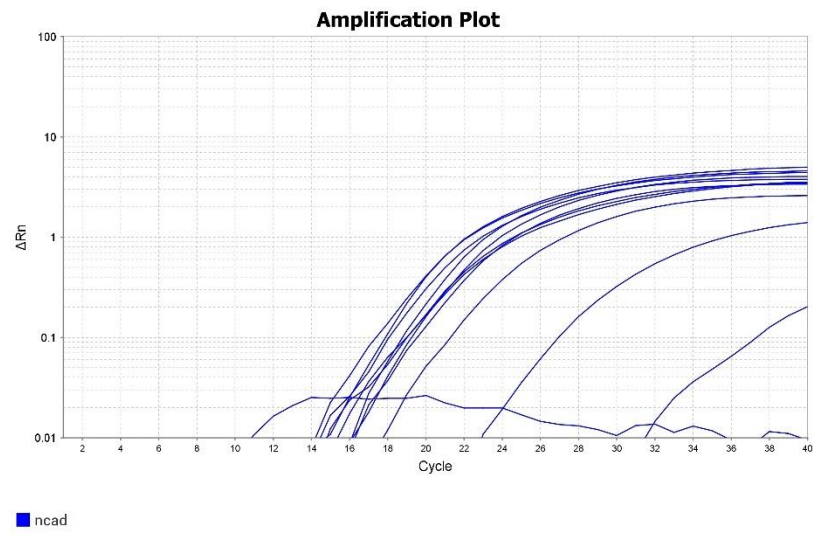


Figura 7. Gráfico de amplificação do branco para o gene NCAD.

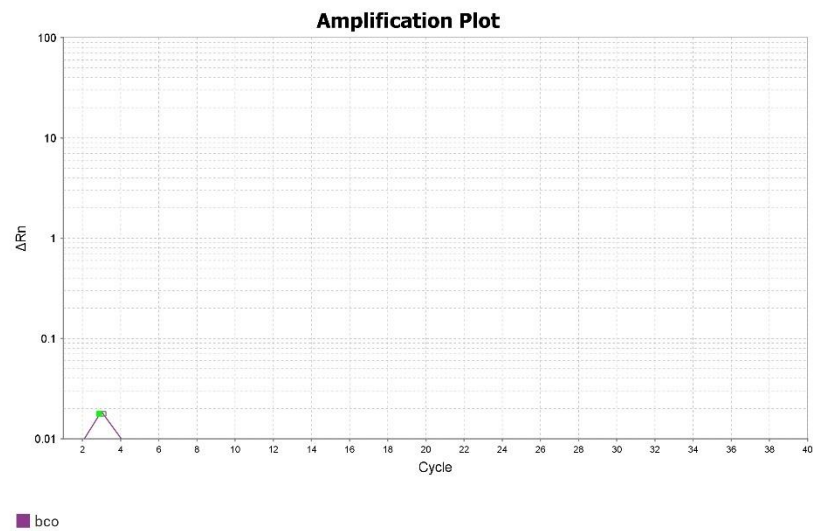
Figura 8

Figura 8. Gráfico da curva de *melting* para o gene NCAD.

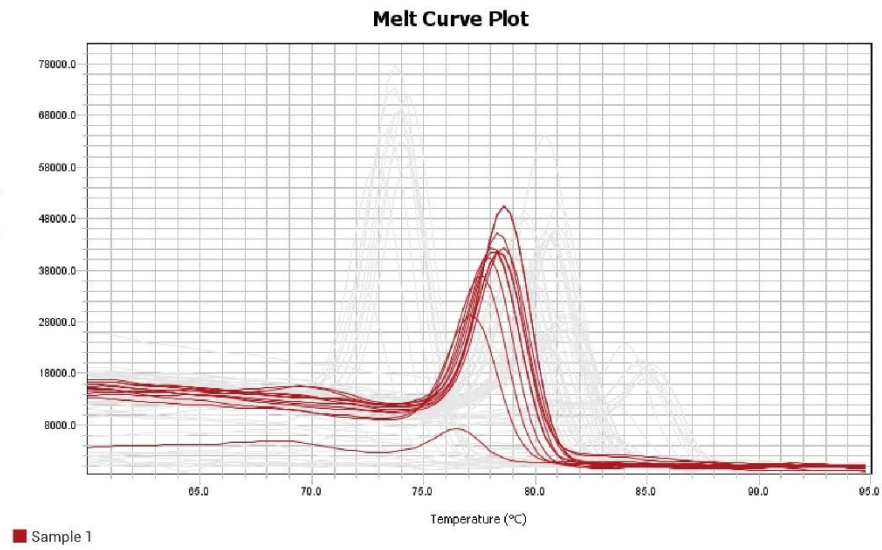
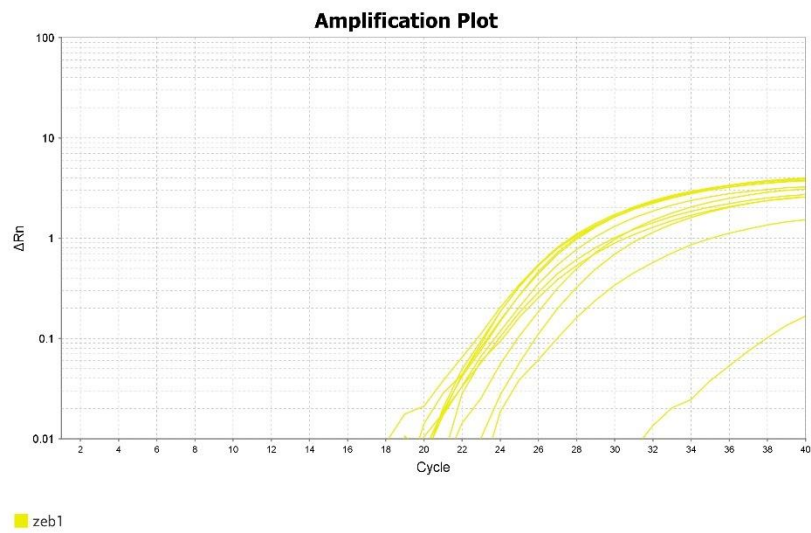


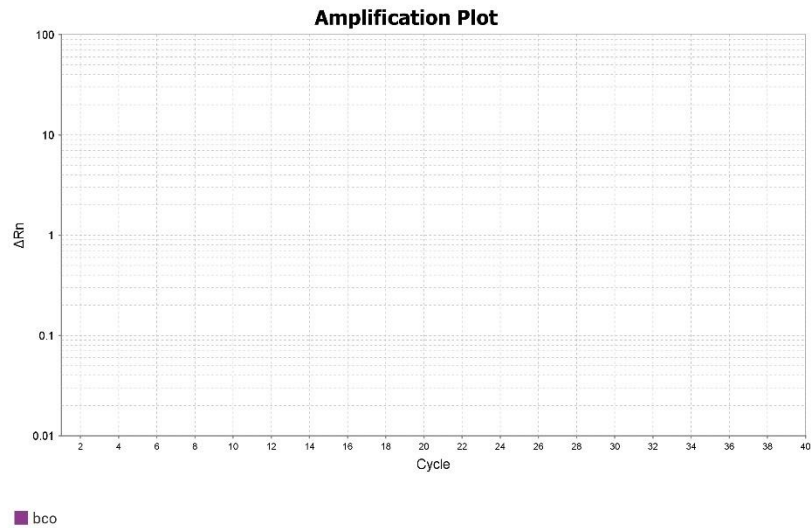
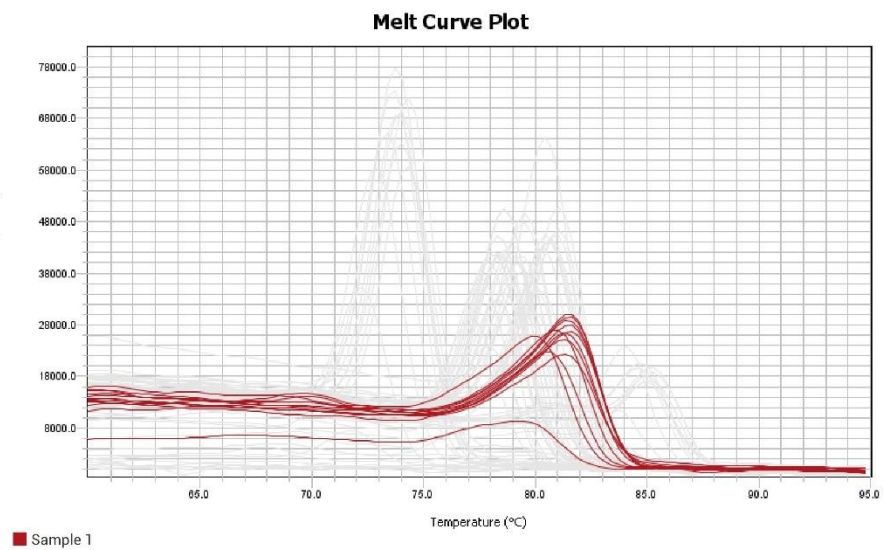
**Figura 9**

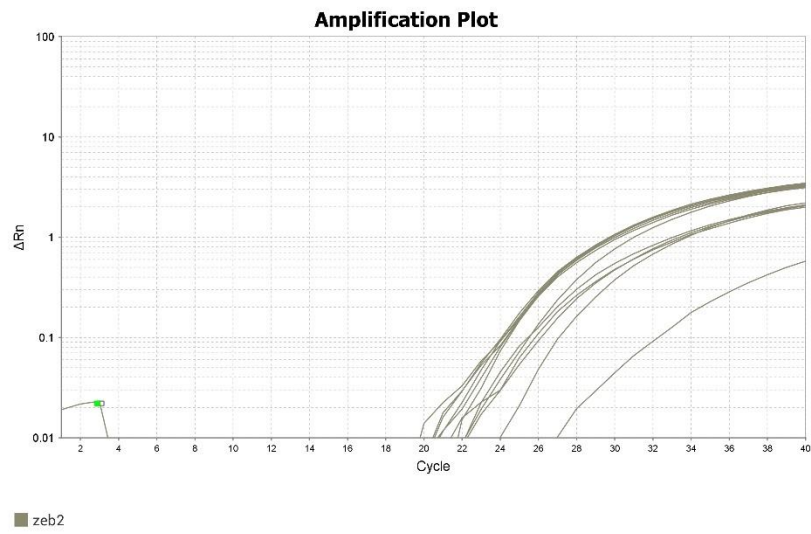
**Figura 9.** Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene NCAD.

**ZEB1****Figura 10**

**Figura 10.** Gráfico de amplificação do branco para o gene ZEB1.

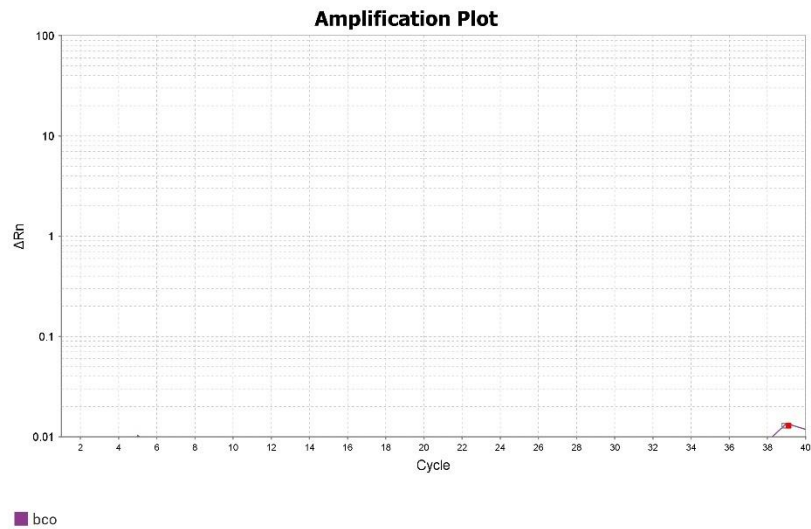
**Figura 11****Figura 11.** Gráfico da curva de *melting* para o gene ZEB1.**Figura 12****Figura 12.** Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene ZEB1.

**ZEB2****Figura 13****Figura 13.** Gráfico de amplificação do branco para o gene ZEB2.**Figura 14****Figura 14.** Gráfico da curva de *melting* para o gene ZEB2.

**Figura 15**

**Figura 15.** Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene ZEB2.

## SNAIL

**Figura 16**

**Figura 16.** Gráfico de amplificação do branco para o gene SNAIL.

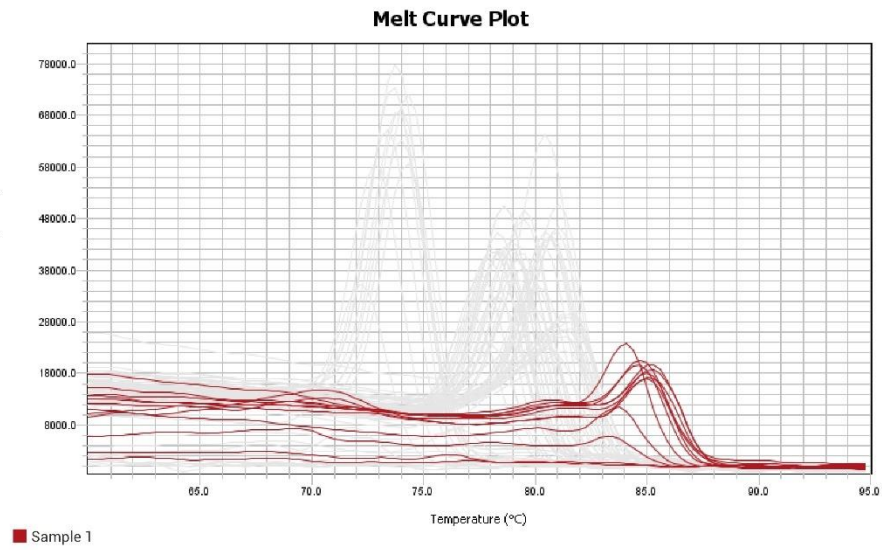
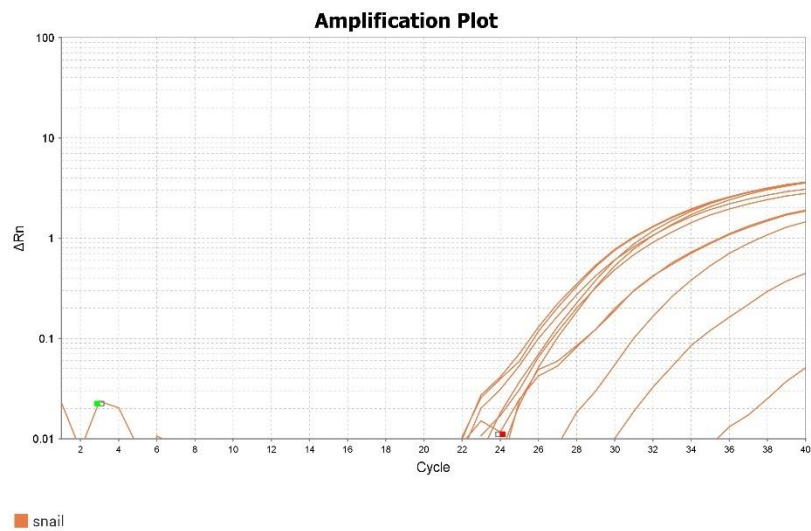
**Figura 17****Figura 17.** Gráfico da curva de *melting* para o gene SNAIL.**Figura 18****Figura 18.** Gráfico de amplificação das amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48) em duplicata, para o gene SNAIL.

Figura 19

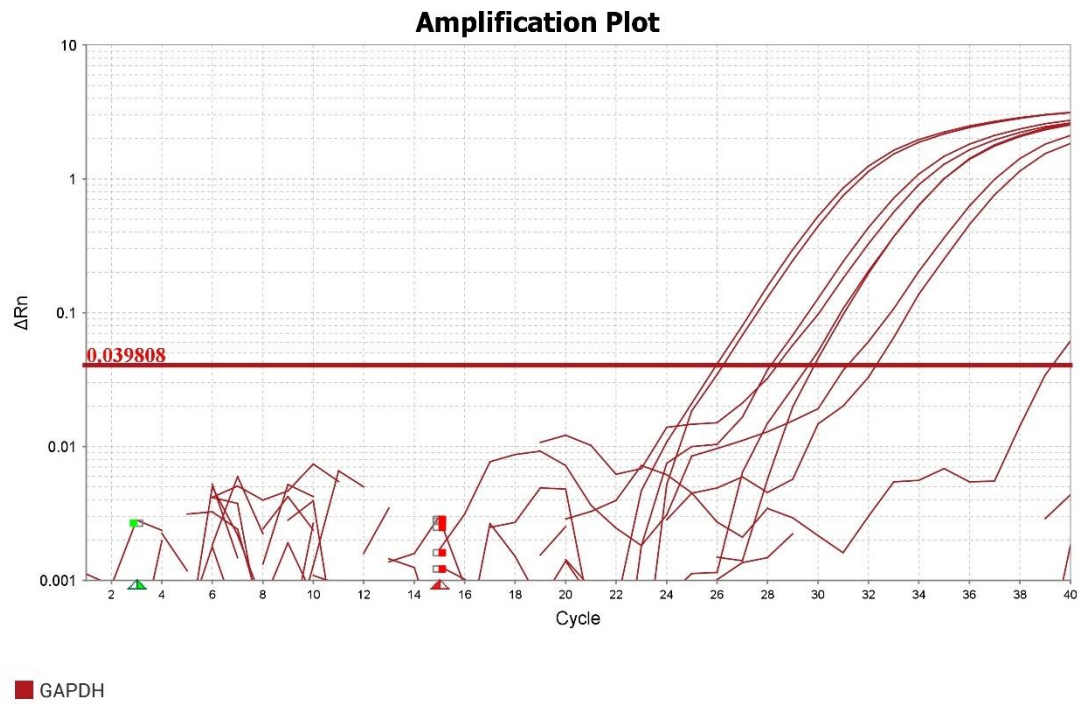


Figura 19. Gráfico de amplificação das amostras de DNA para gene GAPDH.

Figura 20

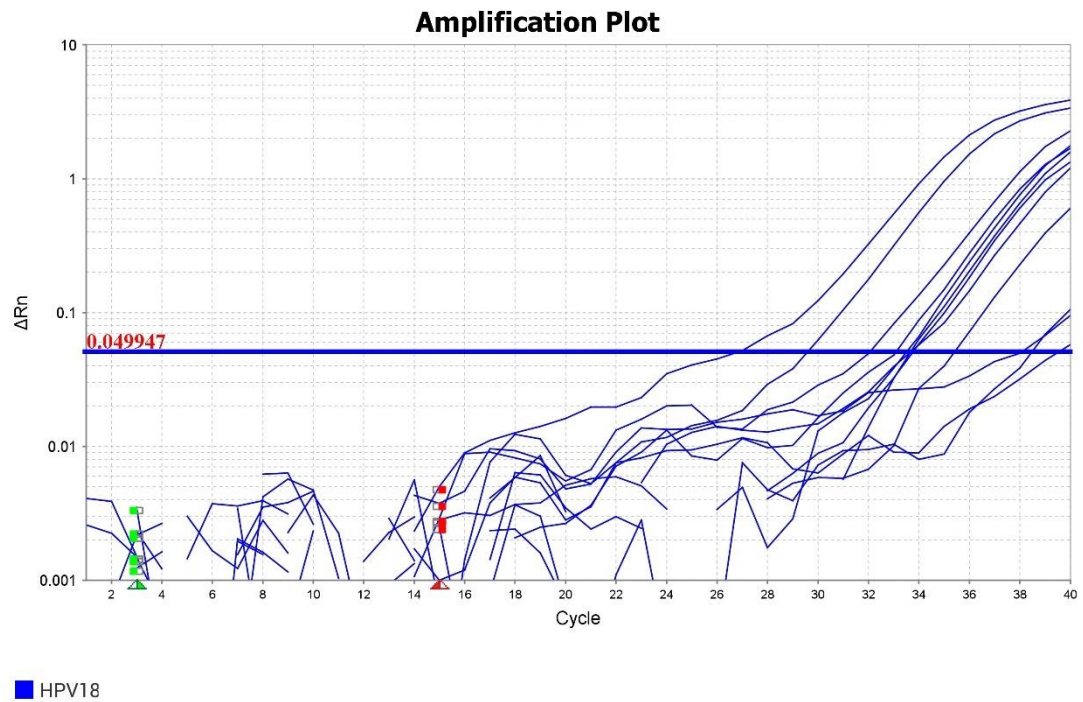


Figura 20. Gráfico de amplificação das amostras de DNA para HPV18.

Figura 21

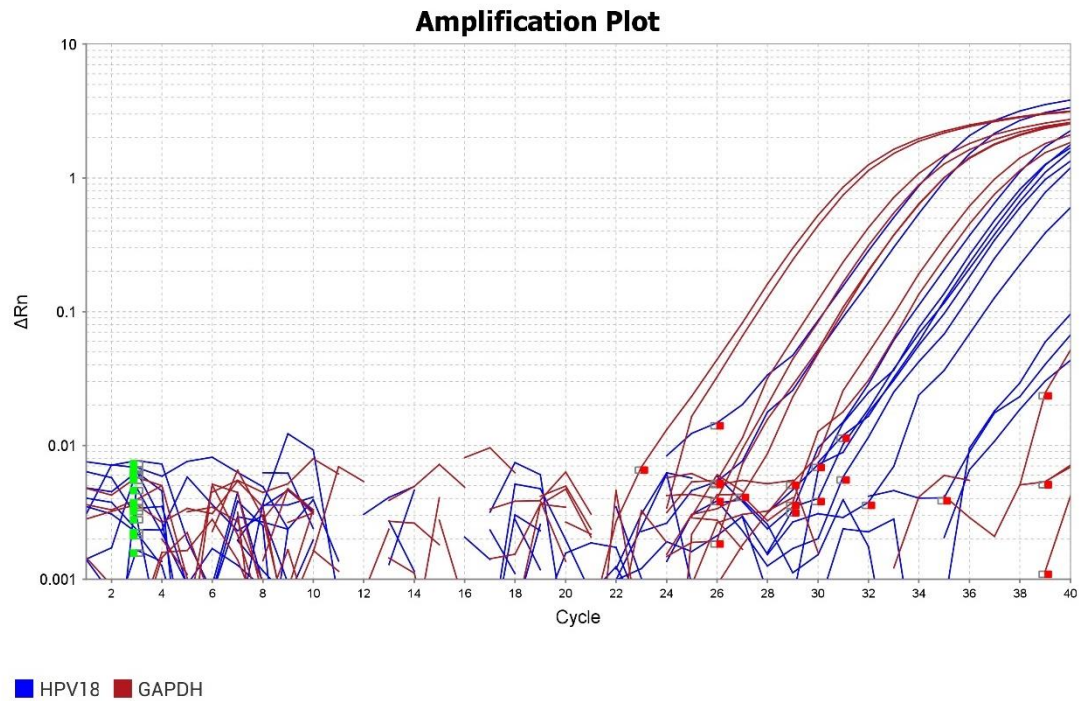


Figura 21. Gráfico de amplificação das amostras de DNA para GAPDH e HPV18.

Figura 22

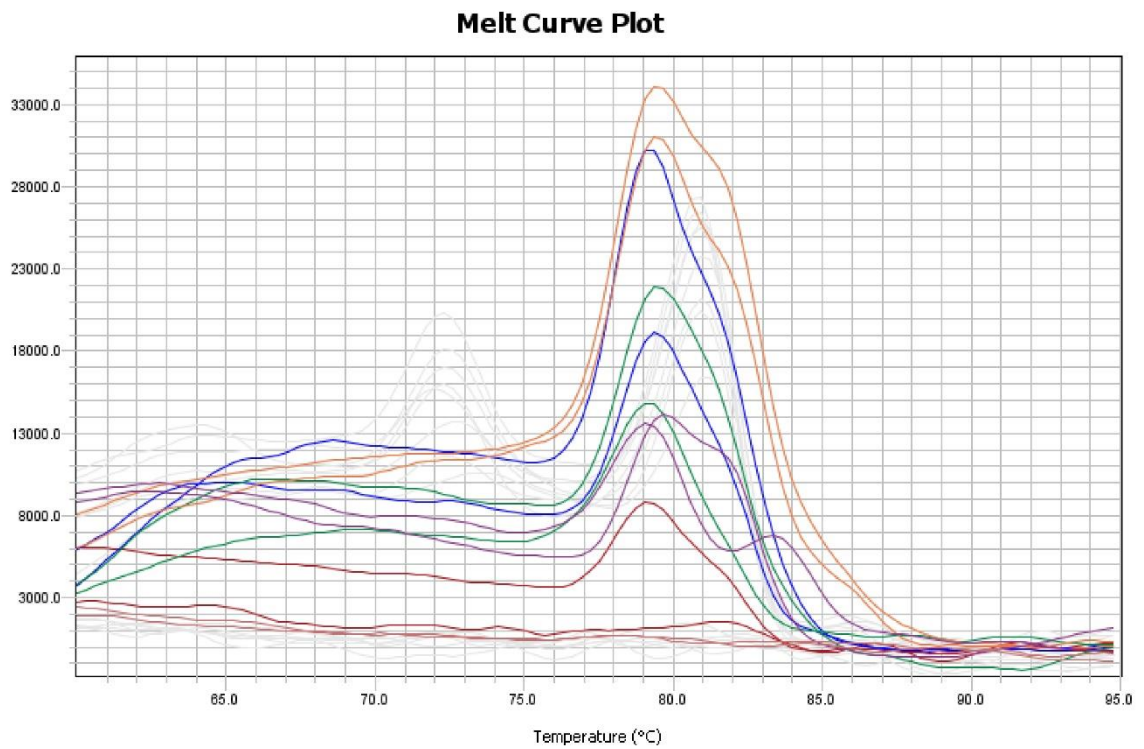


Figura 22. Gráfico da curva de melting para HPV18.

## 8.2 GEL DE POLIACRILAMIDA – PCR CONVENCIONAL DNA VIRAL

**Figura 19**



**Figura 19.** Gel de poliacrilamida pós PCR convencional do DNA viral. Amplificação de fragmentos de DNA com 150 pares de base (pb) referentes a proteína L1 do vírus HPV (primers GP5 e GP6) através de PCR convencional. Observam-se fragmentos com 150 pb em todas as amostras (CN1 24, CC1 24, LET1 24, CN1 48, CC1 48 e LET1 48), confirmando a presença e integridade do DNA viral.