

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

GERALDO MOISÉS WANDERLEY AMORIM

**EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* DE UM COMPOSTO DE SELÊNIO EM
LINHAGEM HUMANA DE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**

**João Pessoa, PB
2025**

Geraldo Moisés Wanderley Amorim

**Efeito antitumoral *in vitro* de um composto de selênio em linhagem humana de
câncer do colo do útero**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento às exigências para obtenção do
título de Mestre em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos. Área de concentração:
Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Carlos Ferreira

João Pessoa, PB
2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A524e Amorim, Geraldo Moisés Wanderley.

Efeito antitumoral in vitro de um composto de selênio em linhagem humana de câncer do colo do útero / Geraldo Moisés Wanderley Amorim. - João Pessoa, 2025.
98 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Coorientação: Rafael Carlos Ferreira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Atividade antitumoral. 2. Colo do útero - câncer.
3. Citotoxicidade. 4. Composto de selênio. 5. Apoptose.
6. Estresse oxidativo. 7. MAPK. I. Sobral, Marianna
Vieira. II. Ferreira, Rafael Carlos. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.277.3(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



Ata da 524ª (quingentésima vigésima quarta) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Geraldo Moisés Wanderley Amorim**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h30) do dia vinte e dois de setembro do ano de dois mil e vinte e cinco (22/09/2025), no Auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Geraldo Moisés Wanderley Amorim**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Karina Carla de Paula Medeiros, Ph.D em Farmacologia; Rafael Carlos Ferreira, Ph.D em Farmacologia; Ricardo Dias Castro, Ph.D em Farmacologia e Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia. Sendo a primeira, integrante do corpo docente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, o segundo, docente da Universidade Federal de Campina Grande e os demais integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Marianna Vieira Sobral, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Geraldo Moisés Wanderley Amorim**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO* DE UM COMPOSTO DE SELÊNIO EM LINHAGEM HUMANA DE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Geraldo Moisés Wanderley Amorim** legalmente habilitado(a) a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.^a Dr.^a Marianna Vieira Sobral (Orientadora)

Prof. Dr. Rafael Carlos Ferreira (Coorientador)

Prof.^a Dr.^a Karina Carla de Paula Medeiros (Examinadora)

Prof. Dr. Ricardo Dias Castro (Examinador)

Geraldo Moisés Wanderley Amorim (Discente)

À minha mãe, por todas as orações
e pelo imensurável amor. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Eu acredito que a vida é uma caminhada linda e curta. É curta pois coexistimos e temos a chance de vivenciar as belas coisas feitas por Deus apenas uma vez. E é linda porque compartilhamos essa única chance com outras pessoas, vivendo suas únicas chances, que a tornam especial. Viver é estar e se fazer presente de diferentes maneiras. E é por isso que eu agradeço imensamente as seguintes pessoas que fizeram e fazem parte dessa jornada comigo:

Agradeço a minha mãe, **Jovita**, por todas as orações a mim intencionadas. A senhora tem uma fé e um amor incondicional que move montanhas e sempre será uma inspiração para mim. Também agradeço ao meu pai **Camilo**, e a minha querida irmã **Regina**, que mesmo longe consegue se fazer presente. Obrigado por serem meu porto seguro em todos os momentos e sempre me incentivarem. Vocês são a melhor família que eu poderia ter.

Agradeço imensamente a minha companheira de vida, minha Dra, minha noiva, **Yanna**. Obrigado por dividir e deixar meus dias mais felizes, por enfrentar os desafios comigo, por sempre me apoiar e me incentivar. Os últimos meses foram desafiadores e a realização desse trabalho só foi possível com a sua ajuda. Você é luz na minha vida e eu amo amar você.

À minha querida família que mesmo de longe sempre está torcendo pelo meu sucesso. Minhas queridas tias **Dalva, Maria, Dalvani** e meus queridos primos **Robson, Izaías, Brenda e Junielly**. Assim, como minha amiga e sogra **Francely**, que também sempre me incentivou.

Aos meus amigos da graduação que perduraram até a pós-graduação, **Alissa, Junior, Myllena, Nayana e Brena**. Obrigado por também estarem comigo nessa jornada que foi o mestrado. Não teria sido o mesmo sem vocês.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Oncofarmacologia: **Karinne, Ramon, Geovana, Junior, Paulo, Gabriela, Isabela, Mariana, Isione, Juan, Samia, Ana Paula, Erika, Heivila, Isabela, Victor, Patricyane e Pablo**. Obrigado por serem uma excelente equipe. O ONCOFAR é o que é por conta da nossa determinação e união. Até mesmo os maiores desafios não nos amedrontam e isso mostra o quanto somos fortes.

Aos meus diferentes núcleos de amizade, que mesclam todas essas incríveis pessoas. Jamais teria aproveitado tanto esse tempo se não fossem nossas conversas

mais aleatórias possíveis e nossa rede de apoio psicológico. Foram muitas risadas compartilhadas, muitas fofocas e muita parceria envolvida.

À minha querida orientadora, **Marianna Sobral**, por toda a confiança depositada em mim desde o início da minha graduação. Tenho certeza de que o que sou hoje foi também fruto da sua atenção durante esse tempo, pois tudo que recebe atenção, cresce. Eu agradeço imensamente por todo cuidado e seu amor de mãe comigo, saiba que a senhora está marcada na minha história.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Rafael Ferreira**, que me deu total apoio no desenvolvimento até a correção impecável desse trabalho. Rafa, você sempre foi uma inspiração acadêmica desde a nossa relação de IC e Pós-graduando. Ter você hoje como membro desse trabalho é motivo de muito orgulho.

Agradeço a **Ana Paula**, por sempre cuidar tão bem do nosso laboratório e ser praticamente uma mãe pra gente e por sempre me incentivar com suas boas intenções quando eu saía da cultura dizendo que tinha dado tudo errado.

A **Samia**, que nunca mediu esforços para nos ajudar no desenvolvimento de métodos e nos experimentos e ao **Prof. Juan** que sempre esteve nos auxiliando e ajudando nos diversos temas.

Agradeço imensamente a participação de todos da minha banca avaliadora, **Prof. Dr. Ricardo Castro** por ter aceitado o convite de prontidão e **Profa. Dra. Karina Medeiros**, por não hesitar aceitar o convite mesmo morando em outro estado. Assim como os suplentes **Prof. Dr. Hemerson Iury** e **Prof. Dr. Davi Farias**. Eu tenho certeza de que as contribuições são do mais alto nível. Deixo aqui expressa a minha grande admiração por vocês.

Finalmente, agradeço a **Universidade Federal da Paraíba (UFPB)** enquanto instituição promotora da educação, por ser responsável pela minha formação acadêmica. Ao **PgPNSB** e a toda a equipe docente e administrativa. Assim como ao **CNPq**, pela concessão da bolsa que me ajudou a desenvolver esse trabalho.

E a **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa:

Muito obrigado!

“O começo de todas as ciências é o
espanto de as coisas serem o que são.”

- Aristóteles

AMORIM, G. M. W. **Efeito antitumoral *in vitro* de um composto de selênio em linhagem humana de câncer do colo do útero.** 2025. 100 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer do colo do útero (CCU) apresenta alta prevalência mundial. Apesar dos avanços alcançados em relação ao tratamento do CCU, a quimioterapia ainda apresenta limitações como efeitos colaterais significativos e resistência das células tumorais aos agentes citotóxicos. Assim, emerge a necessidade de novas alternativas terapêuticas menos tóxicas e mais seletivas para as células malignas. O objetivo desse trabalho foi investigar a atividade antitumoral *in vitro* do composto de selênio *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) em linhagem celular de câncer do colo do útero. A citotoxicidade do SeNitro foi avaliada pelo ensaio do MTT utilizando linhagens celulares tumorais (SK-MEL-28, HeLa, HCT-116, MCF-7 e MDA-MB-231) e não tumoral (HEK-293) humanas. O tipo de morte celular induzida pela molécula teste foi investigado por microscopia confocal a *laser* utilizando laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP), Hoechst 34580, ou JC-1. Para a avaliação do envolvimento de ROS e das MAPKs na citotoxicidade do SeNitro, foi realizado o ensaio do MTT na presença ou ausência de NAC e na presença ou ausência de inibidores de MAPKs, respectivamente. Após 72 h, SeNitro apresentou CI_{50} de $5,03 \pm 0,45 \mu M$ para a linhagem de células de CCU HeLa, a mais sensível ao tratamento. Já para a linhagem não tumoral, SeNitro apresentou $CI_{50} = 93,00 \pm 16,13 \mu M$. A partir desses resultados, foi possível determinar o Índice de Seletividade (IS) do SeNitro, que se apresentou 18 vezes mais seletivo para a linhagem tumoral ($IS = 18,49$). No ensaio utilizando LA/IP, após 24 h de tratamento com o SeNitro, foi possível observar aumento significativo de apoptose inicial de células HeLa ($2,5 \mu M$: $83,76 \pm 4,23\%$; $5,0 \mu M$: $81,72 \pm 1,21\%$; $10 \mu M$: $84,25 \pm 2,07\%$; $p < 0,0001$ para todos). No ensaio do Hoechst 34580, foi observado aumento significativo da fluorescência de células HeLa após o tratamento com o SeNitro ($5 \mu M$: $240,0 \pm 6,93\%$; $10 \mu M$: $254,1 \pm 4,78\%$, $p < 0,0001$). No ensaio do JC-1, observou-se diminuição da razão de fluorescência agregados/monômeros após tratamento com a molécula teste ($5 \mu M$: $0,24 \pm 0,02$; $10 \mu M$: $0,20 \pm 0,01$, $p < 0,0001$). O pré-tratamento com NAC preveniu significativamente a citotoxicidade do SeNitro ($5 \mu M$: $97,57 \pm 3,88\%$; $10 \mu M$: $80,44 \pm 2,10\%$, $p < 0,0001$) em comparação ao grupo tratado com SeNitro na ausência de NAC ($5 \mu M = 54,50 \pm 1,49\%$; SeNitro, $10 \mu M = 39,20 \pm 1,71\%$). Em adição, o pré-tratamento com os inibidores de ERK e JNK reduziram significativamente a viabilidade celular após tratamento com o SeNitro (Na presença do inibidor de ERK = $35,02 \pm 1,00\%$; e inibidor de JNK = $39,58 \pm 3,04\%$; $p < 0,05$ para ambos), em comparação ao grupo tratado com o SeNitro na ausência dos inibidores ($58,73 \pm 6,79\%$, $p < 0,05$). Diante desses resultados é possível inferir que o SeNitro possui uma alta seletividade para as células HeLa e induz nessa linhagem apoptose dependente de estresse oxidativo e inibição das proteínas ERK e JNK.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Composto de selênio; Apoptose; Estresse oxidativo; MAPK; Colo do útero.

AMORIM, G. M. W. **In Vitro Antitumor Effect of a Selenium Compound on a Human Cervical Cancer Cell Line**. 2025. 100 f. **Dissertation** (Master's Degree in Natural and Synthetic Bioactive Products) - Federal University of Paraíba, Health Sciences Center, João Pessoa.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) exhibits a high global prevalence. Despite the advances achieved in CC treatment, chemotherapy still presents limitations such as significant side effects and tumor cell resistance to cytotoxic agents. Therefore, there is an emerging need for new therapeutic alternatives that are less toxic and more selective toward malignant cells. The aim of this study was to investigate the *in vitro* antitumor activity of the selenium compound N-(4-nitrophenyl)benzoseleno-ethylenolactamide (SeNitro) in a cervical cancer cell line. The cytotoxicity of SeNitro was assessed using the MTT assay in human tumor cell lines (SK-MEL-28, HeLa, HCT-116, MCF-7, and MDA-MB-231) and a non-tumor cell line (HEK-293). The type of cell death induced by the test molecule was investigated by laser confocal microscopy using acridine orange (AO) and propidium iodide (PI), Hoechst 34580, or JC-1. To evaluate the involvement of ROS and MAPKs in SeNitro-induced cytotoxicity, the MTT assay was performed in the presence or absence of NAC and in the presence or absence of MAPK inhibitors, respectively. After 72 h, SeNitro showed an IC_{50} of $5.03 \pm 0.45 \mu M$ for the HeLa cervical cancer cell line, which was the most sensitive to treatment. For the non-tumor cell line, SeNitro presented an IC_{50} of $93.00 \pm 16.13 \mu M$. Based on these results, the Selectivity Index (SI) of SeNitro was determined, showing that the compound was 18 times more selective for the tumor cell line ($SI = 18.49$). In the AO/PI assay, after 24 h of treatment with SeNitro, a significant increase in early apoptosis was observed in HeLa cells ($2.5 \mu M$: $83.76 \pm 4.23\%$; $5.0 \mu M$: $81.72 \pm 1.21\%$; $10 \mu M$: $84.25 \pm 2.07\%$; $p < 0.0001$ for all). In the Hoechst 34580 assay, a significant increase in fluorescence intensity was observed in HeLa cells following treatment with SeNitro ($5 \mu M$: $240.0 \pm 6.93\%$; $10 \mu M$: $254.1 \pm 4.78\%$; $p < 0.0001$). In the JC-1 assay, a decrease in the aggregate/monomer fluorescence ratio was observed after treatment with the test molecule ($5 \mu M$: 0.24 ± 0.02 ; $10 \mu M$: 0.20 ± 0.01 ; $p < 0.0001$). Pre-treatment with NAC significantly prevented SeNitro-induced cytotoxicity ($5 \mu M$: $97.57 \pm 3.88\%$; $10 \mu M$: $80.44 \pm 2.10\%$; $p < 0.0001$) compared to the group treated with SeNitro in the absence of NAC ($5 \mu M = 54.50 \pm 1.49\%$; $10 \mu M = 39.20 \pm 1.71\%$). Additionally, pre-treatment with ERK and JNK inhibitors significantly reduced cell viability after SeNitro treatment (with ERK inhibitor = $35.02 \pm 1.00\%$; with JNK inhibitor = $39.58 \pm 3.04\%$; $p < 0.05$ for both) compared to the group treated with SeNitro alone ($58.73 \pm 6.79\%$; $p < 0.05$). Taken together, these results indicate that SeNitro exhibits high selectivity toward HeLa cells and induces apoptosis in this cell line through a mechanism dependent on oxidative stress and inhibition of ERK and JNK signaling pathways.

Keywords: Cytotoxicity; Selenium compound; Apoptosis; Oxidative stress; MAPK; Cervical cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das taxas estimadas de incidência de casos de câncer cervical nas regiões do Brasil	22
Figura 2. Organização anatômica do colo uterino	23
Figura 3. Estágios do câncer de colo do útero	25
Figura 4. Mecanismos moleculares e celulares que impulsionam a progressão do câncer cervical induzido por HPV	27
Figura 5. Mecanismo de carcinogênese induzida pelo Papilomavírus humano (HPV) no colo uterino	28
Figura 6. Patogênese do câncer do colo do útero	30
Figura 7. Mecanismo molecular de ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose	37
Figura 8. Efeitos dos diferentes níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) na célula	41
Figura 9. Via de sinalização da família de Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK)	44
Figura 10. Via de sinalização das Cinases c-Jun N-terminal (JNK)	47
Figura 11. Estrutura química e massa molar do composto <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro)	56
Figura 12. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) de células de câncer cervical humano HeLa incubadas com <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) por 24 h	67
Figura 13. Imagens representativas detalhadas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) de células de câncer cervical HeLa incubadas com <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) por 24 h	68
Figura 14. Indução da apoptose pelo <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento	69
Figura 15. Imagens representativas de alterações nucleares induzidas pelo SeNitro (5 ou 10 μ M) ou DXR marcadas por coloração Hoeschst 34580 em células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento	70
Figura 16. Percentual de fluorescência da marcação com Hoechst 34580 após o tratamento de células de câncer cervical HeLa com SeNitro (5 ou 10 μ M) ou DXR em após 24 h de tratamento	71
Figura 17. Imagens representativas da avaliação do potencial de membrana mitocondrial por coloração de JC-1 em células de câncer cervical humano HeLa incubadas com <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) ou carbonil cianeto <i>M</i> -clorafenilhidrazona (CCCP) após 24 h de tratamento	72
Figura 18. Avaliação do potencial mitocondrial em células tratadas com o SeNitro (5 ou 10 μ M) ou CCCP analisado por coloração JC-1 em células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento	73

Figura 19. Citotoxicidade do SeNitro (2,5, 5 ou 10 μ M) em linhagem de células de câncer cervical humano HeLa na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) por 72 horas	74
Figura 20. Efeito citotóxico do <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida.(SeNitro) (5 ou 10 μ M) ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência de inibidores de ERK1/2 (U0126) (5 μ M), JNK (SP600125) (20 μ M) ou p38 MAPK (PD 169316) (20 μ M) em linhagem de células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas	58
Tabela 2. Citotoxicidade do <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) e da doxorubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento	65
Tabela 3. Citotoxicidade do <i>N</i> -(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) nas linhagens celulares humanas HeLa (câncer cervical) e HEK-293 (sadia embrionária renal) após 24, 48 e 72 h de tratamento	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	Adenocarcinoma
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
As	Arsênio
ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
Ba	Bário
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BID	BH3-interacting domain death agonist
CAT	Catalase
CBiotec/UFPB	Laboratório de Biofotônica do Centro de Biotecnologia da UFPB
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CCU	Câncer do Colo do Útero
Cd	Cádmio
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DD	Death Domain
DEDs	Death Effector Domains
DMSO	Dimetilsulfóxido
DQ	Departamento de Química
DISC	Death-inducing signaling complex
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermico
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
ERK	Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares
FADD	Fas-associated death domain
Fas L-C	Fas ligand
Fe	Ferro
FGFR	Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos
GPx	Glutathione Peroxidase
GPx2	Glutathione Peroxidase 2
GRBz/Shc/SOS	Growth factor receptor-bound protein 2, SHC-transforming protein, Son of Sevenless homolog
Hg	Mercúrio
HIFs	Fatores Induzidos por Hipoxia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papiloma Vírus Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
I	Iodo
IGFR	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	Iodeto de Propídeo
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de Seletividade

JEC	Junção Escamocelular
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
LA	Laranja de acridina
LPBS	Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
MAPRs	Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos
Mn	Manganês
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
NAC	N acetil-cisteína
Ni	Níquel
NIC	Neoplasias Intraepiteliais Cervicais
OMS	Organização Mundial da Saúde
OncoFar	Laboratório de OncoFarmacologia
Pb	Chumbo
PD-1	Programmed Death 1
PDGFR	Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RFE	Radiografia de Feixe Externo
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SAPK	Proteína Cinase Ativada por Estresse
Smac/DIABLO	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low p/
Se	Selênio
SeNitro	N-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida
Sep15	Selenoproteína 15
SOD	Superoxido Dismutase
TBS	Sistema Bethelsda
tBID	Truncated BID
TCR	Receptor de Linfócitos T
Thr-Pro-Tyr	Treonina-Proteína-Tirosina
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte Therapy
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TR1	Tioredoxina Redutase
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
XIAP	X-linked inhibitor of Apoptosis Protein
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Câncer do Colo do Útero	22
2.1.1 Epidemiologia	22
2.1.2 Fisiopatologia e classificações do câncer do colo do útero	23
2.1.3 Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e o desenvolvimento do câncer do colo do útero	26
2.1.4 Rastreamento e diagnóstico do câncer do colo do útero	30
2.1.5 Prevenção e tratamento do câncer do colo do útero	32
2.2 Apoptose e o câncer do colo do útero	35
2.3 Estresse oxidativo e o câncer do colo do útero	39
2.4 Vias de sinalização intracelulares das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)	42
2.4.1 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer do colo do útero	43
2.4.2 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer do colo do útero	45
2.4.3 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer do colo do útero	47
2.5 Compostos de selênio	49
2.5.1 SeNitro	51
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo geral	54
3.2 Objetivos específicos	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Local da pesquisa	56
4.2 Material	56
4.2.1 Amostra teste	56
4.2.2 Preparo da Amostra	56
4.2.3 Substâncias e reagentes	57
4.2.4 Equipamentos	57
4.2.5 Linhagens Tumerais e não tumoral humana	57
4.3 Métodos	58
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade do SeNitro em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)	58
4.3.2 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo SeNitro em células HeLa	59
4.3.2.1 Análise morfológica por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo	59
4.3.2.2 Análise de alterações nucleares em células HeLa por microscopia confocal após coloração com Hoechst 34580	60
4.3.2.3 Análise do efeito de SeNitro no potencial de membrana mitocondrial de células HeLa por microscopia confocal após coloração com JC-1	61
4.3.2.4 Investigação do efeito de SeNitro no estado redox celular: citotoxicidade na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)	62

4.3.3 Avaliação da citotoxicidade do SeNitro na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)	62
4.3.4 Análise estatística	63
5 RESULTADOS	65
5.1 Citotoxicidade em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do índice de seletividade (IS)	65
5.2 Morfologia das células HeLa por análise de microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo	66
5.3 Alterações nucleares induzidas pelo SeNitro em células HeLa por análise de microscopia confocal após marcação com Hoechst 34580	69
5.4 Efeito do SeNitro sobre o potencial de membrana mitocondrial de células HeLa por análise de microscopia confocal após coloração com JC-1	71
5.5 Citotoxicidade do SeNitro na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)	73
5.6 Efeito citotóxico do SeNitro em células HeLa na presença ou ausência de inibidores de proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs)	74
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	88

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças multifatoriais caracterizado pela proliferação descontrolada de células malignas, resultante de mutações genéticas ou alterações epigenéticas que comprometem processos de controle celular, como o reparo do DNA, conferindo às células tumorais capacidade de invasão e disseminação (Schwartz, 2024, Xia *et al.*, 2024). Trata-se de um problema de saúde pública em nível global, com cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes registradas em 2022 (Bray *et al.*, 2024). Apenas no Brasil, estima-se cerca de 700 mil casos entre 2023 e 2025 (INCA, 2022).

O câncer do colo do útero (CCU) é o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres no mundo, com aproximadamente 660 mil novos casos em 2022 e elevada mortalidade. Afetando principalmente mulheres mais jovens, a idade média ao diagnóstico é de 50 anos. Apesar dos avanços na prevenção e no tratamento, o CCU continua impactando mulheres globalmente, sobretudo devido à baixa cobertura vacinal contra o principal agente etiológico, o Papilomavírus Humano (HPV), e à insuficiência de programas de rastreamento (Francoeur *et al.*, 2025).

Quando a doença está instalada, algumas opções de tratamento estão disponíveis, como a cirurgia, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia. Essas abordagens podem ser usadas de forma isolada ou em combinação (Yu *et al.* 2021). A quimioterapia, sendo uma forma de tratamento amplamente utilizada e disponível, enfrenta desafios devido ao desenvolvimento de resistência pelas células tumorais e aos efeitos colaterais que incluem fadiga, anemia, toxicidade gastrointestinal e hematológica, alopecia, artralgia e perda de apetite (Choulli *et al.*, 2024).

A busca por novas terapias contra o câncer inclui compostos sintéticos, podendo-se desenvolver estruturas totalmente novas ou modificar as já existentes por reações químicas com o intuito de potencializar os efeitos biológicos (Tossetta *et al.*, 2023). Nesse sentido, pode-se inserir o selênio (Se), microelemento essencial descoberto em 1817 por Jöns Jacob Berzelius, e que apresenta diversos benefícios à saúde humana e animal, incluindo a redução da incidência de alguns tipos de câncer (Busto *et al.*, 2024) e proteção cardiovascular (Ali *et al.*, 2023).

Diante da urgência na busca por novos candidatos a fármacos antitumorais, cresce o interesse em pesquisas que investigam compostos de selênio associados a diferentes estruturas químicas. Evidências na literatura indicam que esses compostos podem controlar ou eliminar a expansão desordenada de células tumorais por meio

de múltiplos mecanismos. Entre suas ações, destacam-se efeitos citotóxicos diretos, modulação do estado redox celular e indução de apoptose por vias de sinalização específicas, envolvendo proteínas reguladoras do ciclo celular, contribuindo para a inibição da proliferação e progressão tumoral (He *et al.*, 2025).

Nesse contexto, destaca-se o *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro), uma lactamida contendo selênio sintetizada a partir de ácidos orgânicos, que apresenta atividades biológicas promissoras. Estudos recentes demonstram o potencial do SeNitro, com relatos de efeitos antiparasitário e antibacteriano (Sousa *et al.*, 2023; Sousa *et al.*, 2025).

Considerando a problemática global do CCU, respaldada por dados epidemiológicos alarmantes, e os desafios enfrentados pelas terapias atuais, o presente trabalho se propôs a investigar o potencial farmacológico do SeNitro, um produto sintético com selênio em sua estrutura, avaliando seu efeito citotóxico e os possíveis mecanismos antitumorais associados.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer do colo do útero

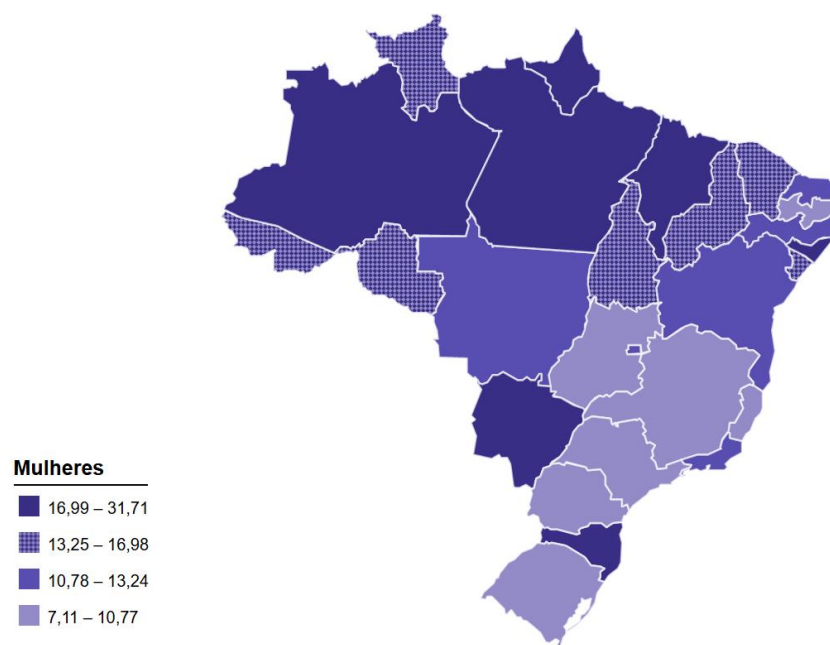
2.1.1 Epidemiologia

O câncer do colo do útero (CCU) é um problema de saúde pública em nível mundial e todos os anos atinge milhares de mulheres, sendo o mais prevalente na ginecologia e o quarto tipo de câncer mais comum na população em geral (Caruso *et al.*, 2025).

Dados da Organização Mundial da Saúde (2024) estimaram mais de 660.000 novos casos e cerca de 350.000 mortes em todo o mundo apenas no ano de 2022. Esses números ainda revelam a prevalência de incidência e mortalidade em países subdesenvolvidos e emergentes, sendo cerca de 94% do total de mortes oriundas deles.

No Brasil, excluindo o câncer não melanoma, o CCU é o terceiro tipo mais incidente em mulheres. Estima-se a ocorrência de 17.010 casos por ano no triênio 2023-2025, sendo cerca de 15 casos para cada 100 mil mulheres. Na região Nordeste, esse índice aumenta para 17,59 casos a cada 100 mil mulheres, enquanto a maior taxa está na região Norte (20,48/100 mil) e a menor na região Sudeste (12,93/100 mil) (Instituto Nacional de Câncer, 2022) (Figura 1).

Figura 1. Representação das taxas estimadas de incidência de casos de câncer cervical nas regiões do Brasil.



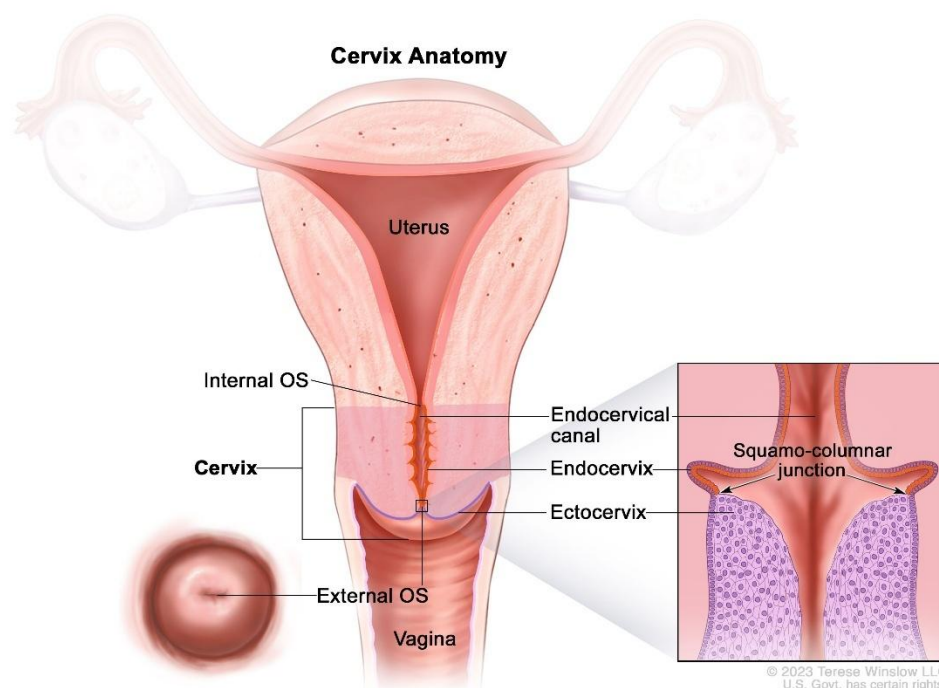
Fonte: Instituto Nacional de Câncer, 2023.

2.1.2 Fisiopatologia e classificações dos cânceres do colo do útero

O colo do útero é a porção inferior e estreita do útero, que conecta a cavidade uterina à vagina por meio de um canal curto e cilíndrico chamado canal endocervical. Esse canal termina no óstio externo, por onde o espermatozoide entra no útero e onde são coletadas amostras para exames como o exame citopatológico cervical, conhecido popularmente como Papanicolaou. Internamente, é revestido por células glandulares que produzem muco cervical, que é essencial para a fertilidade, e externamente por células escamosas (Nicoladelli *et al.*, 2023).

O local onde ocorre a transição (metaplasia escamosa) entre células endocervicais e escamosas, conhecida como zona de transformação ou Junção Escamocolumnar (JEC), é uma área importante na detecção precoce do câncer do colo do útero (Járay, Schaff, 2022) (Figura 2). Esta área é composta por células glandulares colunares e células escamosas, sendo o principal sítio de desenvolvimento de lesões intraepiteliais e neoplasias cervicais, o que a torna de extrema relevância nos programas de rastreamento do CCU (NCI, 2023).

Figura 2. Organização anatômica do colo uterino



Legenda: O colo do útero constitui a porção inferior e estreita do útero, estabelecendo a conexão entre a cavidade uterina e a vagina. Anatomicamente, é subdividido em orifício interno (limite entre o útero e o canal cervical), endocervix (porção interna que forma o canal endocervical), ectocervix (porção externa que se projeta na vagina) e orifício externo (abertura entre o colo do útero e a vagina).

Fonte: Adaptado do *National Cancer Institute* (2023).

Pode-se dividir o CCU em dois principais subtipos histológicos, sendo o carcinoma de células escamosas (CEC) e o adenocarcinoma (AC). O CEC é mais comum, responsável por cerca de 90% dos casos, origina-se no epitélio escamoso na zona de transição, enquanto o AC está em cerca de 10% e origina-se no epitélio glandular, sendo associado a um pior prognóstico e menor sobrevida (Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica, 2024).

Além da diferenciação quanto à origem, tais subtipos diferem quanto os métodos de rastreamento e prognóstico da doença. Ambos os subtipos estão associados ao Papilomavírus Humano (HPV) como principal fator etiológico, variando de acordo com os fatores comportamentais de risco, como a associação ao tabagismo, principalmente quanto ao desenvolvimento do CEC (Whang *et al.*, 2024). Embora a maioria das infecções seja assintomática e seja eliminada espontaneamente num período de 1 a 2 anos, a persistência da infecção pelos tipos de HPV de alto risco, ou oncogênicos (principalmente o 16 e 18), pode levar ao CCU e outras doenças (Goldstein *et al.*, 2024).

A infecção persistente pelo HPV de alto risco pode levar ao desenvolvimento de lesões precursoras do CCU. Essas lesões podem ser categorizadas citologicamente como LSIL (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau) ou HSIL (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau), e, histologicamente, classificadas como NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical), também conhecida, de forma menos usual, de displasia cervical (Cui *et al.*, 2025).

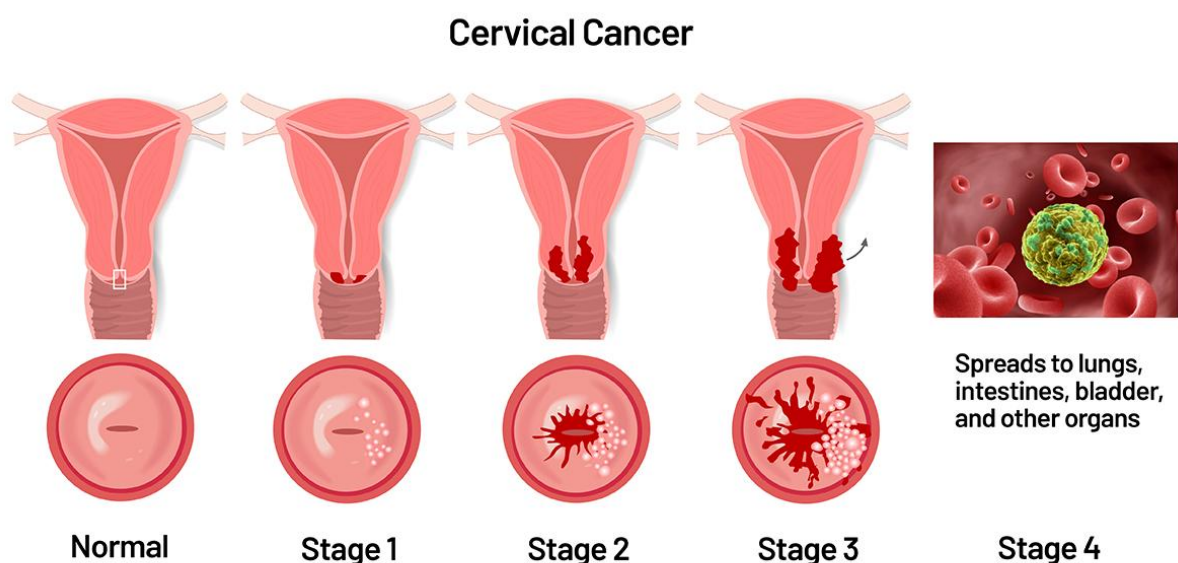
Essa condição é classificada em três graus: NIC 1, geralmente associada a LSIL, corresponde à displasia leve com alterações celulares discretas, restritas ao terço basal do epitélio, considerada lesão pré-cancerosa de baixo risco e alta chance de regressão; NIC 2, geralmente associada a HSIL, que representa displasia moderada, envolvendo até dois terços da espessura epitelial, com menor probabilidade de regressão e maior risco de progressão; e NIC 3 ou carcinoma *in situ*, também associada a HSIL, que indica displasia grave com alterações celulares mais acentuadas, comprometendo toda a espessura epitelial, mas sem evidência de invasão do tecido subjacente, considerada lesão de alto risco (Gupta *et al.*, 2023; Sabale *et al.*, 2025).

As LSIL são resultado da infecção do vírus em células que já estão em processo de diferenciação, permitindo uma produção ativa dele. Já as HSIL resultam de uma proliferação anormal das células escamosas, causada pela expressão descontrolada

das proteínas virais precoces E6 e E7, ocorrendo após a integração do DNA viral ao genoma da célula. Essas proteínas interferem nos mecanismos regulatórios do ciclo celular, como os genes *p53* e *RB1*, levando à superexpressão da proteína p16, que é supressora tumoral e pode ser inibida pelo HPV, sendo um marcador amplamente utilizado no diagnóstico por imuno-histoquímica (Meenakshi, 2023).

Clinicamente, a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (2023) classifica o CCU em quatro estágios. O Estágio I corresponde ao tumor restrito ao colo do útero. No Estágio II, o tumor se estende além do colo, mas sem alcançar a parede pélvica ou o terço inferior da vagina. O Estágio III indica comprometimento da parede pélvica, do terço inferior da vagina e/ou presença de hidronefrose ou metástase em linfonodos pélvicos ou para-aórticos. Já o Estágio IV representa a disseminação do câncer para órgãos adjacentes, como bexiga e reto (IVA), ou para locais distantes (IVB), incluindo fígado, pulmões, linfonodos distantes, bexiga ou reto (Instituto Nacional de Câncer, 2022; *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 2023). Ainda, pode-se destacar a reincidência desse tipo de câncer, que após tratado, pode retornar ao colo do útero ou surgir em outra parte do corpo (*National Institutes of Health*, 2025) (Figura 3).

Figura 3. Estágios do câncer de colo do útero



Legenda: Representação dos estágios do câncer do colo do útero, desde a invasão restrita ao útero (Estágio I), passando pela disseminação para estruturas adjacentes na pelve (Estágio II e III), até o comprometimento de órgãos como bexiga e reto e a presença de metástases à distância (Estágio IV).

Fonte: Adaptado de *Saint John's Cancer Institute* (2025)

2.1.3 Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e o desenvolvimento de câncer do colo do útero

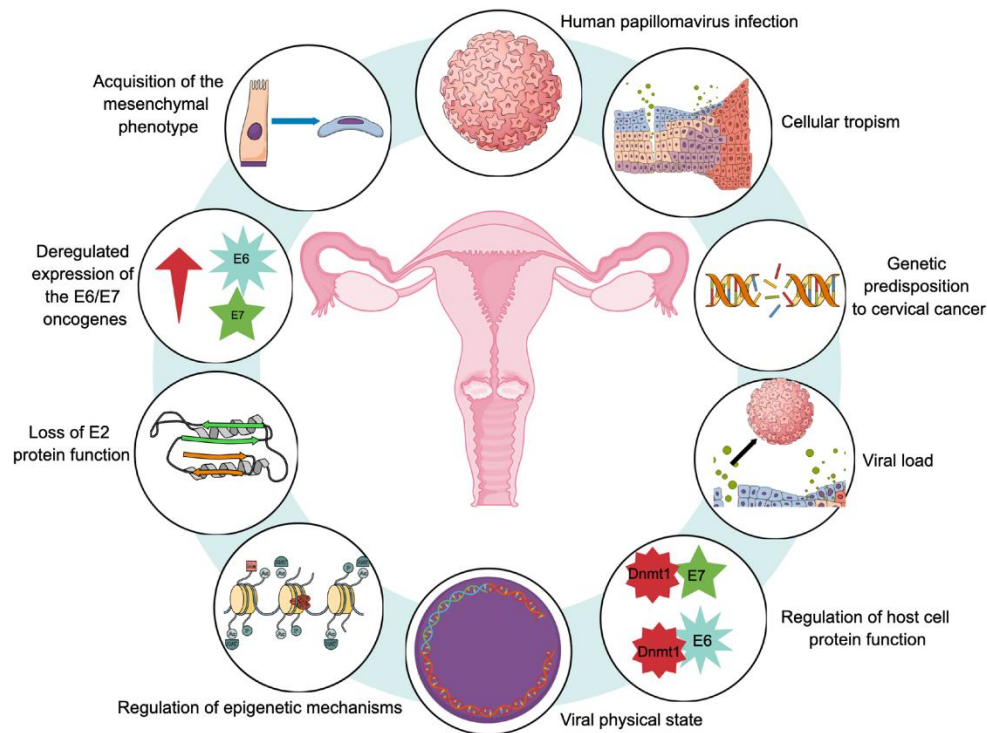
No decorrer do desenvolvimento e progressão do câncer, as células malignas adquirem características específicas, tais como a insensibilidade aos sinais que normalmente suprimiriam o crescimento celular, sinalização proliferativa contínua, resistência à morte celular programada, habilidade de replicação ilimitada, reprogramação do metabolismo energético, evasão do sistema imunológico e a capacidade de invadir tecidos diferentes daquele de origem, resultando na formação de metástases (Hanahan; Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

Diversos fatores influenciam na maquinaria de predisposição e instalação do CCU. Fatores genéticos e epigenéticos estão incluídos, como: a predisposição genética do indivíduo associada a polimorfismos; a carga viral que pode agravar o risco de acordo com a idade ou tipos de vírus; a ativação da maquinaria de metilação celular no DNA e os padrões de acordo com a evolução da doença; rearranjo de histonas que podem modificar a via da p53 desregulando as vias celulares e favorecendo a transformação anormal; perda de função da proteína E2 que regula negativamente a E6 e E7, promovendo uma expressão desregulada desses oncogenes; aquisição de fenótipo mesenquimal, que é clássico na progressão tumoral, conferindo maior capacidade de invasão e metástase e resistência a terapias (Rosendo-Chalma *et al.* 2024) (Figura 4).

A infecção persistente pelo HPV promove o aparecimento de lesões precursoras cervicais, oriundas de alterações provocadas pelo vírus de alto risco e variando no nível de gravidade. A progressão dessas lesões pode levar muitos anos, o que abre espaço para métodos de prevenção e intervenção na neoplasia (Zhang *et al.*, 2025).

Outros fatores associados ao desenvolvimento do CCU são histórico familiar, higiene inadequada da região genital, comportamento sexual de risco, tabagismo, imunossupressão (como nos casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), uso prolongado de contraceptivos orais, idade precoce na primeira gestação ou múltiplas gestações, baixa condição socioeconômica e não participação em programas de rastreamento do câncer cervical (Huang *et al.*, 2022).

Figura 4. Mecanismos moleculares e celulares que impulsionam a progressão do câncer cervical induzido pelo Papilomavírus Humano (HPV)



Legenda: A infecção por tipos oncogênicos do Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco desencadeia uma cascata de alterações patológicas, incluindo tropismo celular específico, fatores genéticos predisponentes, carga viral elevada, forma física do vírus (integrado ou episomal), disfunções em proteínas reguladoras da célula hospedeira, modificações epigenéticas, inativação da proteína E2 e superexpressão das oncoproteínas virais E6 e E7. Esses processos favorecem a aquisição de características mesenquimais pelas células infectadas, contribuindo para a transformação neoplásica e a progressão do câncer do colo do útero. **Fonte:** Adaptado de Rosendo-Chalma *et al.* (2024) e Hakim *et al.* (2024).

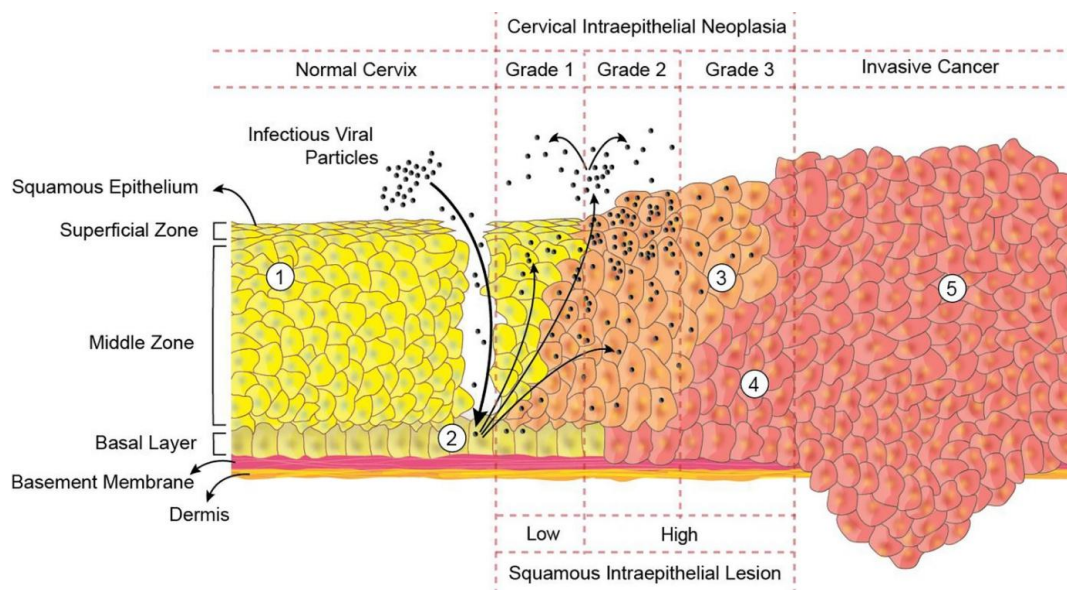
A infecção pelo HPV é uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns no mundo, especialmente entre mulheres com menos de 25 anos. Estima-se que cerca de 90% das mulheres sejam expostas ao HPV ao longo da vida, mas, na maioria dos casos, a infecção é eliminada pelo organismo antes que o vírus se integre ao genoma da célula hospedeira (Sharifian *et al.*, 2023). Esse vírus é transmitido pelo contato direto com o epitélio cutâneo ou mucoso, afetando tanto homens como mulheres. As manifestações benignas da infecção comumente incluem papilomas (ou verrugas) (Hazazi *et al.*, 2024).

Aproximadamente 10% das infecções por HPV são persistentes, o que o torna a principal causa do câncer do colo do útero (Gomez, Romero, 2024). Entre mais de 200 tipos identificados do vírus, cerca de 40 infectam a região genital e 13 são considerados de alto risco oncogênico (hrHPV), como os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (Xu *et al.*, 2024). O HPV-16 é responsável por aproximadamente 50 a 60% dos casos e o HPV-18 por 10 a 20%; os demais 10%

envolvem os outros tipos oncogênicos (Yoshida, Shiraishi, Kato, 2021). Além da prevalência em câncer de colo do útero, também estão associados a outros tipos de neoplasias, como os cânceres de cabeça e pescoço (Zheng *et al.*, 2023).

O ciclo de vida do HPV segue o maquinário de diferenciação das células hospedeiras. Em um cenário normal, apenas as células basais da camada inferior do epitélio possuem capacidade proliferativa, migrando para a superfície já diferenciadas como parte do processo fisiológico de regeneração. O vírus infecta majoritariamente essas células, integrando o material genético e aproveitando-se do processo até liberar novos vírions na superfície (Figura 5) (Goldstein *et al.*, 2024).

Figura 5. Mecanismo de carcinogênese induzida pelo Papilomavírus humano (HPV) no colo uterino



Legenda: O processo inicia-se com o epitélio escamoso cervical saudável (1), seguido pela infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (2), momento em que o DNA viral permanece de forma episomal (separado do genoma celular) no núcleo das células. Em seguida, as células começam a expressar genes virais precoces e tardios (3). Com a progressão da lesão, há uma superexpressão das oncoproteínas E6 e E7 (4), que promovem alterações celulares e instabilidade genética. Finalmente, ocorre o desenvolvimento do câncer metastático, caracterizado pela integração completa do DNA viral ao genoma celular (5), favorecendo o crescimento tumoral invasivo.

Fonte: Adaptado de Sravani, Ghate, Lewis, 2023.

Quando o indivíduo é infectado, o DNA viral pode permanecer em estado latente nas células basais epiteliais e mesmo após anos, pode evoluir para a forma agressiva do CCU. Essa associação ao genoma do hospedeiro é um ponto chave na progressão tumoral, estando vinculada a alterações no número de cópias gênicas (CNA), abundância e *splicing* de transcritos de mRNA, como também rearranjos cromossômicos. As alterações estão relacionadas a proteínas que afetam os

mecanismos regulatórios do ciclo celular e outras vias como a PI3K-Akt-mTOR (Chen *et al.*, 2023).

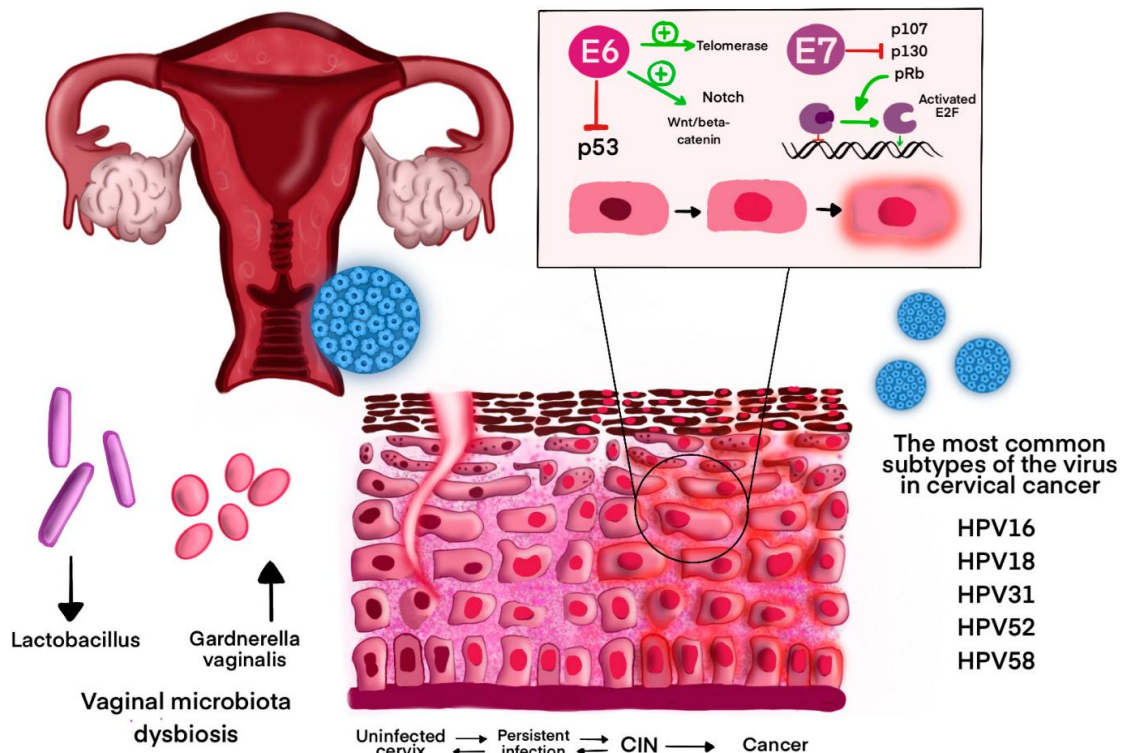
O genoma do HPV codifica 10 proteínas, com cerca de 8 kb de DNA circular de fita dupla (dsDNA), dividido em três regiões principais (Hazazi *et al.*, 2024). A primeira é a região precoce (*early*), que contém os genes *E1* a *E8*. *E1* e *E2* estão relacionados à replicação viral, *E4* participa da maturação das partículas virais, enquanto *E5*, *E6* e *E7* possuem papel oncogênico, sendo *E6* e *E7* os principais, com ação sobre as proteínas supressoras de tumor *p53* e *pRb*. A segunda região é a tardia (*late*), composta pelos genes *L1* e *L2*, que codificam as proteínas do capsídeo viral. A terceira é a regulatória, conhecida como LCR, contendo elementos que promovem a regulação da transcrição gênica e replicação viral (Volkova *et al.*, 2021).

As oncoproteínas *E6* e *E7* desempenham papel crucial na promoção e manutenção do CCU. Elas são amplamente expressas durante o processo de transformação celular e atuam de forma sinérgica, podendo ativar diferentes *hallmarks* do câncer (Araldi *et al.*, 2018; Hanahan, 2022). A *E6* tem um papel de destaque na imortalização celular, sendo capaz de se ligar e degradar a *p53*, que normalmente está ativada em resposta de danos ao DNA celular de células saudáveis. Com a *p53* degradada, há o impedimento da apoptose celular (Scarth *et al.*, 2021) (Figura 6).

Já a ligação da *E7* na *pRB* também leva a degradação e consequente inativação de fatores transcricionais, o que vai favorecer a proliferação das células mutadas. O fenótipo agressivo e invasivo do câncer ocorre em decorrência da superexpressão associada a erros genéticos sucessivos e duradouros, tornando a *E6* e *E7* potenciais marcadores (Downham *et al.*, 2024).

Ainda, estudos recentes mostram que a *E5*, considerada uma oncoproteína de menor potencial transformador, possui uma alta atividade mitogênica em ensaios *in vitro* e frequentemente é relacionada a lesões cervicais. Ela pode influenciar na proliferação, diferenciação e apoptose, e ainda pode interferir no metabolismo e comunicação celular. Sabendo que esses mecanismos desempenham papéis essenciais na carcinogênese, a atuação dessa proteína tem sido explorada como alvo terapêutico (Janiszewska *et al.*, 2024).

Figura 6. Patogênese do câncer do colo do útero



Legenda: A patogênese do câncer cervical relacionado ao Papilomavírus Humano (HPV) envolve uma sequência de eventos iniciada pela infecção do epitélio cervical. Essa infecção pode se tornar crônica, evoluindo para alterações pré-malignas classificadas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC ou CIN) e, subsequentemente, para o carcinoma invasivo. O mecanismo molecular relacionado à carcinogênese envolve, principalmente, as oncoproteínas virais E6 e E7. A proteína E6 atua na inibição da proteína supressora tumoral p53, além de ativar a telomerase, favorecendo a proliferação celular descontrolada. Essa proteína também estimula as vias de sinalização Wnt/ β -catenina e Notch, alterando processos essenciais de diferenciação e regulação celular. Por outro lado, a proteína E7 desativa proteínas reguladoras do ciclo celular, como pRB, p107 e p130. A inativação de pRB promove a ativação constante do fator de transcrição E2F, desencadeando a transição desregulada da fase G1 para a fase S do ciclo celular, resultando na divisão celular contínua. Além disso, alterações na microbiota vaginal podem influenciar a progressão da infecção por HPV. A redução de *Lactobacillus* spp., associada ao aumento de *Gardnerella vaginalis*, favorece a persistência viral e contribui para a progressão para lesões malignas. Os genótipos de HPV de alto risco mais frequentemente associados ao câncer cervical incluem: HPV16, HPV18, HPV31, HPV52 e HPV58.

Fonte: Adaptado de Wloszek *et al.*, 2025.

2.1.4 Rastreamento e diagnóstico do câncer do colo do útero

O principal objetivo do rastreamento do CCU é reduzir a incidência e a mortalidade da doença. No CCU, a principal ferramenta é realizar a detecção precoce de lesões que possam ser precursoras desse tipo de câncer, como a neoplasia intraepitelial cervical (NIC). O rastreamento requer uma estratégia de triagem para alcançar resultados positivos. Assim, pode-se destacar três modalidades de rastreamento essenciais para a realização de intervenção precoce e prevenção da doença (Sznurkowski *et al.*, 2024).

O exame citológico Papanicolau, publicado pela primeira vez em 1941, é uma das principais formas de rastrear o CCU. Nele, é feita uma coleta das células do colo

uterino para identificar microscopicamente alterações que indicam câncer cervical. Recomenda-se que seja feito num intervalo de três anos para pessoas de 21 a 29 anos de idade. Já para pessoas de 30 a 65 anos, recomenda-se o exame a cada cinco anos se for combinado com o teste de HPV (Waghe, Acharya, 2024).

Outro importante exame é o teste molecular para HPV de alto risco, ou teste de DNA-HPV, indicado pela OMS, com foco na detecção de tipos de HPV de alto risco que estão intimamente relacionados ao CCU. Na rotina, ele é feito em conjunto com o exame de Papanicolau e oferece uma abordagem mais sensível no rastreamento de displasias cervicais de alto grau, precursoras do CCU. Identificar os genes dos tipos HPV 16 e 18 por genotipagem combinada com a citologia tem sido o método mais recomendado (Thrall *et al.*, 2025).

Nos indivíduos com resultados alterados no exame de Papanicolau ou com teste positivo para HPV, pode-se complementar a avaliação com a realização de uma colposcopia, indicada como procedimento de seguimento do diagnóstico (Dayalane *et al.*, 2025). Esse exame ginecológico não invasivo consiste numa procura mais detalhada no colo do útero, usando um colposcópio para buscar lesões. Caso sejam detectadas áreas suspeitas, pode-se realizar então uma biópsia direcionada na confirmação histopatológica de células pré-cancerosas ou cancerosas (Mishra *et al.*, 2025).

Como alternativas aos testes tradicionais, algumas novas opções estão sendo consideradas, tais como o *Dual Stain* para *p16/Ki-67*, que é baseado em biomarcadores que identificam a transformação oncogênica em células cervicais com uma sensibilidade maior que a observada na citologia. Ainda, pode-se incluir a genotipagem ampla e testes de metilação (Harper *et al.*, 2025).

O rastreamento do CCU varia também de acordo com o subtipo histológico e o método utilizado na detecção. O exame Papanicolau, por exemplo, é mais eficiente na detecção de lesões precursoras e do CEC nos estágios ainda iniciais, podendo falhar na detecção de AC devido à particularidade de sua localização ser mais interna no canal endocervical. Em relação ao prognóstico, casos com AC tendem a desfechos piores quando comparados aos de CEC, apresentando menores taxas de sobrevida. Ainda, os piores resultados de sobrevida estão associados a pacientes com AC submetidas a radioterapia definitiva ou quimiorradioterapia, quando comparadas aos pacientes com CEC tratadas da mesma maneira (Whang *et al.*, 2024).

No diagnóstico, o Sistema Bethesda (TBS) é o mais utilizado nos resultados citológicos. Para considerar uma citologia positiva e fazer o encaminhamento do paciente para uma investigação complementar pode variar de acordo com as células encontradas na lesão. A presença de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) ou LSIL são conduzidas dependendo do contexto. Por exemplo, todas as mulheres que tiverem resultados que indicam células escamosas atípicas, não podendo excluir as demais lesões já mencionadas, deverão ser encaminhadas para o exame de colposcopia (Banerjee *et al.*, 2022).

Dessa forma, seguir os passos e diretrizes para o rastreamento torna-se um ponto crucial na detecção de possíveis lesões, permitindo que intervenções sejam realizadas no início das lesões. Para isso, é fundamental que a conduta clínica seja utilizada com base na idade e nos fatores de risco, além da periodicidade para melhorar os desfechos. Essas ações em conjunto visam contribuir com a diminuição da morbimortalidade associada à doença e minimizar o impacto de terapias mais agressivas (Kaur *et al.*, 2023).

2.1.5 Prevenção e tratamento do câncer do colo do útero

A vacinação contra o HPV é uma das estratégias mais eficazes para a prevenção do CCU, sendo as campanhas adotadas pelos países um ponto chave no controle da disseminação do vírus e incidência desse tipo de câncer. Atualmente, existem três plataformas vacinais: uma bivalente (HPV 16 e 18), quadrivalente (HPV 6, 11, 16, 18) e nonavalente (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58). Elas são formuladas com partículas semelhantes a vírus, em que a parte externa do HPV é mimetizada sem o conteúdo infeccioso. O público-alvo principal são meninas pré-adolescentes, porém é recomendada a vacinação em meninos e mulheres adultas quando possível (Hernández-Silva *et al.*, 2024).

Tais vacinas podem sustentar a imunidade por pelo menos 12 anos, sendo sustentada pela ativação de células B de memória. A OMS recomenda a vacinação para meninas de 9 a 14 anos, no esquema de uma ou duas doses antes do início da vida sexual. Já na faixa de 15 a 20 anos, indica-se uma ou duas doses, enquanto para idades acima de 21, duas doses com intervalo de 6 meses (Basu *et al.*, 2021; Kamolratanakul *et al.*, 2021).

Além das vacinas no modelo de prevenção, pode-se destacar o desenvolvimento de vacinas terapêuticas, que estimulam a resposta imune para

atacar células infectadas pelo HPV. Como exemplo, têm-se a vacina de DNA VB10.16, direcionada ao HPV-16, que demonstrou a capacidade de aumentar a resposta imune contra células infectadas e aumentar a capacidade de eliminar NIC2/3, atuando na parada da progressão do CCU (Boilesen *et al.*, 2021).

O estágio clínico do CCU e as comorbidades associadas são determinantes para o tipo de tratamento a ser seguido, que pode incluir a cirurgia, quimioterapia e radioterapia ou a combinação desses métodos. No CCU em estágio inicial, a cirurgia é o tratamento principal. Existem diversas abordagens cirúrgicas, como a cirurgia transabdominal que oferece uma maior sobrevida, mas apresenta o maior sangramento intraoperatório, maior incidência de febre pós-operatória. A histerectomia radical transvaginal, que pode ser usada em casos complicados para a cirurgia aberta ou pacientes com comorbidades, porém tem um campo cirúrgico limitado. Já a cirurgia minimamente invasiva, tem algumas vantagens, como a redução das complicações e incisões menores (Chun *et al.*, 2021).

Apesar da elevada taxa de sucesso e do baixo risco de complicações imediatas, como sangramento, infecção e dor, a remoção cirúrgica de tumores do colo do útero pode estar associada a riscos a longo prazo. Mulheres em idade fértil requerem maior atenção, uma vez que a recorrência ocorre em cerca de 10% dos casos nos primeiros cinco anos após a cirurgia. Essa taxa pode aumentar significativamente, alcançando aproximadamente 28% em situações de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e entre mulheres residentes em países em desenvolvimento (D'Oria *et al.*, 2022; Schubert *et al.*, 2023; Burmeister *et al.*, 2025).

A radioterapia é uma das alternativas, utilizando radiação de alta energia contra as células tumorais. Entre os principais métodos, pode-se destacar a radioterapia de feixe externo (RFE), que geralmente é administrada em sessões diárias ao longo de 5 a 6 semanas, muitas vezes combinada com quimioterapia para potencializar seus efeitos, e a braquiterapia, que consiste na inserção de fontes radioativas diretamente no tumor, permitindo uma ação localizada mais intensa com menor impacto aos tecidos adjacentes. Embora eficaz, a radioterapia pode causar efeitos colaterais tanto a curto quanto a longo prazo. Entre os sintomas imediatos estão fadiga, náuseas, irritação vaginal e alterações menstruais, enquanto complicações tardias podem incluir estenose e secura vaginal, problemas intestinais e urinários crônicos, fragilidade óssea e linfedema (American Cancer Society, 2025).

Historicamente, a quimioterapia à base de cisplatina é utilizada no CCU, tanto nos estágios localmente avançados quanto nos que estão em metástase. O mecanismo de ação da cisplatina se dá pela formação de adutos de platina com o DNA, que induz quebras na fita dupla. Porém, essa abordagem enfrenta o mecanismo de resistência quimioterápica à monoterapia, pois a superexpressão de proteínas associadas ao reparo de DNA, como ERCC1 e PARP1 está associada à resistência (Nguyen *et al.*, 2022), oriundas principalmente de alterações epigenéticas (Mbodi *et al.*, 2024).

Atualmente a combinação da cisplatina com outros agentes como bevacizumabe, topotecano, paclitaxel, 5-fluororacil ou bleomicina, demonstram maior eficácia no tratamento clínico. Em pacientes com CCU recorrente ou metastático, impossibilitados de uma cirurgia, o tratamento padrão é quimioterapia à base de platina associada ao bevacizumabe, oferecendo uma sobrevida de 14,3 a 18,3 meses (Monk *et al.*, 2022). Para os pacientes com o CCU localmente avançado, o padrão é a quimiorradioterapia, que promove melhoria na sobrevida global quando comparada a radioterapia de forma isolada (Stuopelyte *et al.*, 2023).

Ainda, estudos recentes abordam o direcionamento de resposta contra proteínas virais do HPV, como terapia de linfócitos infiltrantes de tumor (*Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy* – TIL) e terapias com células T receptoras de antígeno (TCR) geneticamente modificadas tendo como alvo as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16. Os estudos não clínicos realizados demonstram eficácia contra células tumorais infectadas com HPV, abrindo possibilidade de uso em neoplasias tanto cervicais, quanto vulvares, anais e orofaríngeas (Baba *et al.*, 2025).

Novas substâncias inovadoras, como o *Nocardia rubra cell wall skeleton*, aprovado recentemente na China, demonstrando potencial em reduzir a exaustão de linfócitos T e melhorar a resposta imune local de pacientes com HPV ou NIC. A imunoterapia é uma das alternativas mais específicas contra o CCU, pois a utilização de inibidores de *check-points* imunológicos, que agem como bloqueadores da proteína 1 de morte programada (PD-1), como anticorpos tremelimumabe, pembrolizumabe, nivolumabe e durvalumabe ganham destaque no tratamento de casos mais avançados da doença (Ferrall *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

Dentre todas as possibilidades, a quimioterapia e a radioterapia continuam sendo escolha principal no tratamento de casos mais graves, como recorrentes e metastáticos. Os novos esquemas de tratamento com a utilização do bevacizumabe

em combinação com quimioterápicos, por exemplo, se tornam não tão custo-efetivos e ainda apresentam toxicidade que limita seu uso, além da prevalência de efeitos adversos graves (Anjun *et al.*, 2025).

Diante desse cenário, a quimioterapia se destaca como protagonista de tratamentos oncológicos, podendo ser classificada de acordo com os objetivos terapêuticos: (i) usada como tratamento primário, (ii) adjuvante para eliminar células após o tratamento principal e reduzir a recidiva, (iii) neoadjuvante para promover a redução da massa tumoral antes do tratamento principal e (iv) paliativa, que tem como objetivo melhorar a qualidade de vida e aliviar sintomas relacionados à doença (Brianna *et al.*, 2023). Contudo, a resistência quimioterapia segue como um obstáculo nas terapias (Gu *et al.*, 2025). Ela pode ser dividida em dois principais grupos: a intrínseca, que está presente antes do início do tratamento; e a adquirida, que se desenvolve ao decorrer do tratamento (Ramos *et al.*, 2021).

A resistência quimioterápica em lesões de CCU está associada a uma diversidade de processos, que incluem alteração na disponibilidade intracelular de compostos à base de platina, o aumento da capacidade reparativa do DNA, expressão de chaperonas associadas ao estresse celular e alterações ao DNA por meio de metilações (Mbodi *et al.*, 2024). Nesse contexto, a ação sistêmica quimioterápica associada aos elevados efeitos colaterais, faz com que a comunidade científica busque alternativas que contornem esses eventos negativos.

2.2 Apoptose e o câncer do colo do útero

A manutenção da homeostase dos organismos multicelulares depende de um processo essencial e altamente orquestrado de morte celular. Trata-se de uma resposta fisiológica normal a diversos estímulos, infecções ou danos celulares, envolvidos tanto na proliferação quanto na eliminação de células, atuando em momentos de renovação tecidual ou diante de ameaças patogênicas, por exemplo. Dentre os tipos de morte, a apoptose se destaca como uma morte programada pela célula, sendo altamente controlada por moléculas chave (Mustafa *et al.*, 2024).

Esse tipo de morte celular programada tem algumas características morfológicas, tais como desaparecimento das junções celulares, condensação da cromatina, redução do volume celular, lise nuclear, contração citoplasmática, aumento do retículo endoplasmático, vesículas na membrana plasmática e fragmentação em

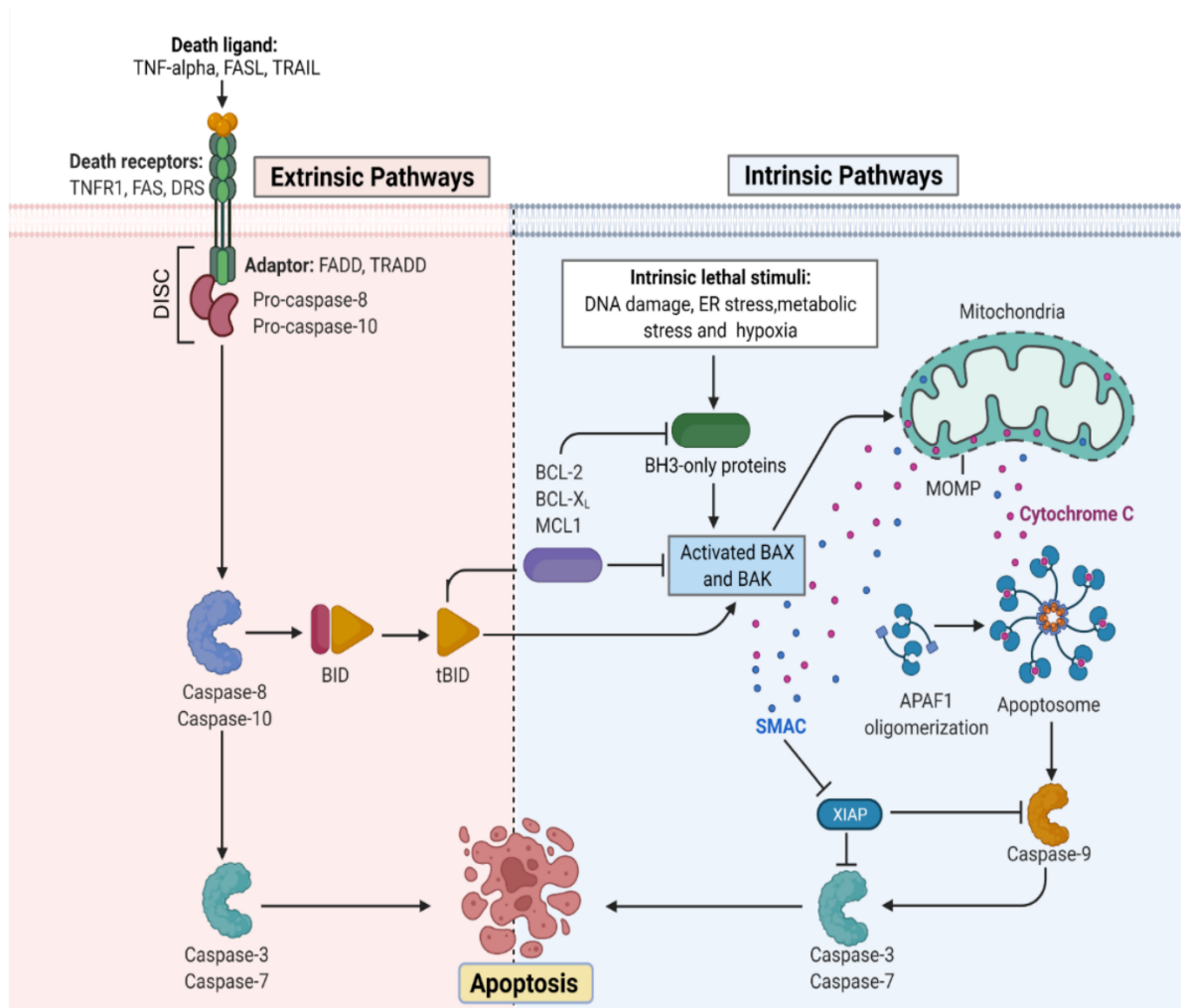
corpos apoptóticos, que contém fragmentos de organelas e cromatina (Chen *et al.*, 2024).

O maquinário molecular da apoptose é bem caracterizado e ocorre a partir da ativação de proteases, por duas vias diferentes. Ela por ocorrer tanto pela via intrínseca quanto pela extrínseca, tendo alterações em as moléculas efetoras e estímulos. A via intrínseca é desencadeada pela permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane permeabilization*), enquanto a extrínseca é ativada por receptores de morte como Fas e DR4/5, respondendo aos seus ligantes específicos FasL e TRAIL, respectivamente (Morana *et al.*, 2022) (Figura 7).

Ambas as vias convergem na ativação de um grupo de cisteíno-proteases, denominadas como caspase. A execução da apoptose ocorre a partir das caspases efetoras (3, 6 e 7), que quando ativadas promovem a clivagem de substratos intracelulares que acabam formando corpos apoptóticos, e então morte celular. As caspases iniciadoras, como a caspase-9 (via intrínseca) e as caspases 8 e 9 (via extrínseca) atuam ativando as caspases efetoras. Ainda, existe um grupo de caspases (1, 4, 5 e 11) que está envolvido em processos inflamatórios e na piroptose, que é um tipo de morte celular (Moyer *et al.*, 2025).

A via extrínseca é desencadeada principalmente por ligantes pró-apoptóticos, como FasL (*Fas ligand*), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) que se ligam aos seus respectivos receptores na membrana plasmática, como Fas (CD95/APO-1), TNFR1 ou TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5, induzindo a sua trimerização (Mustafa *et al.*, 2024). Assim, há a exposição do domínio de morte DD (*death domain*) desses receptores na região intracelular, provocando o recrutamento da proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*), que atrai procaspases-8 e/ou -10, por meio dos domínios de recrutamento de caspases DEDs (do inglês *death effector domains*), formado o complexo DISC (do inglês *death-inducing signaling complex*). A partir disso, as procaspases sofrem clivagem, tornando-se ativas. As caspases iniciadoras ativas clivam e ativam caspases efetoras, como as caspases 3, 6 e 7, que degradam proteínas da estrutura celular levando a alterações morfológicas clássicas da apoptose. Em algumas células, a caspase-8 também cliva a proteína BID (do inglês *BH3-interacting domains death agonist*) em tBid (do inglês *truncated BID*), que se transloca para a mitocôndria e ativa a via intrínseca (Vitale *et al.*, 2023; Qian *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024) (Figura 7).

Figura 7. Mecanismo molecular de ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose



Legenda: Ambas as vias dependem de sinais específicos para iniciar uma cascata de eventos moleculares dependente de energia, levando à ativação de caspases iniciadoras e, subsequentemente, à ativação das caspases executoras, como a caspase-3. Entre os componentes envolvidos estão TNF (fator de necrose tumoral), FASL (ligante associado ao antígeno de superfície FS-7), TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), TNFR1 (receptor 1 do fator de necrose tumoral), DRS (receptores de morte), DISC (complexo indutor de sinal de morte), BID (domínio de interação BH3), MCL (proteína de diferenciação de leucemia mieloide), ER (retículo endoplasmático), BAX (proteína X associada à Bcl-2), BAK (Bcl-2 killer), SMAC (ativador mitocondrial secundário de caspases), XIAP (inibidor de apoptose ligado ao X), MOMP (permeabilização da membrana externa mitocondrial) e APAF (fator ativador de protease apoptótica).

Fonte: Adaptado de Wani *et al.* 2024.

Já a via intrínseca ou mitocondrial é ativada por sinais internos de estresse, tais como dano ao DNA, hipóxia, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outros. Esses estímulos estão envolvidos na modulação de proteínas da família Bcl-2, que controlam a permeabilidade mitocondrial externa (MOMP). Com isso, as proteínas pró-apoptóticas Bax (*Bcl-2-associated X protein*) e Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) são ativadas e se oligomerizam na membrana da mitocôndria,

resultando na formação de poros que permitem a liberação de proteínas do espaço intermembranar, como o citocromo *c*, Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / Direct IAP-Binding protein with Low pI*) e AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) (Lossi, 2022; Schofield, Schafer, 2023). O citocromo *c*, agora no citosol, liga-se ao Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) na presença de ATP/dATP, formando o apoptossomo, que recruta e ativa a procaspase-9 por dimerização. A caspase 9 inicia a cascata de ativação das caspases efetoras, culminando na degradação de componentes celulares. De forma paralela, Smac/DIABLO inibe proteínas antiapoptóticas como a XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), potencializando a ação das caspases (Abbas *et al.*, 2020; Wani *et al.*, 2023) (Figura 7).

No câncer do colo do útero, majoritariamente iniciado pelo HPV, a proteína E5 está associada a modulação das vias de sinalização referentes à resistência apoptótica. E5 pode inibir apoptose por influenciar proteínas reguladoras da família Bcl-2, protegendo a célula de estresse ou morte mediada pelo sistema imunológico. Tal inibição possibilita as células infectadas de continuarem se proliferando mesmo com danos ao DNA ou com outros estímulos oncogênicos, configurando como um escape e resistência à apoptose (Hakim *et al.*, 2025)

As proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 tem sido avaliadas pela sua relação com a progressão do CCU. Diversos estudos avaliaram a associação da expressão de Bcl-2 em diferentes graus de NICs e no carcinoma *in situ*. Como resultado, um estudo observou o aumento dessa proteína de acordo com o avanço do grau da lesão, enquanto outro estudo relacionou a redução dos membros dessa família de proteínas ao desenvolvimento e resistência ao tratamento de CCU. A inibição funcional de proteínas dessa família pode resultar na restauração da apoptose em células tumorais, sendo os membros dessa família também potenciais biomarcadores (Bostanci *et al.*, 2025).

Atualmente, o desenvolvimento de tumores não está relacionado apenas à proliferação descontrolada, mas também ao desequilíbrio no processo de apoptose nas células tumorais. Assim, os novos alvos estão sendo propostos por intervenções no processo apoptótico, como miméticos de SMACs e inibidores das proteínas IAPs (Liu *et al.*, 2021).

2.3 Estresse oxidativo e o câncer do colo do útero

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), são moléculas que contêm oxigênio, geradas a partir de reações celulares, sendo subprodutos de respiração celular e produção de energia, por exemplo. Elas também podem ser produzidas quando há exposição da célula à radiação, poluentes atmosféricos e outras substâncias tóxicas. As principais moléculas desse grupo presente nos organismos vivos são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kozlov *et al.*, 2024).

ROS são moléculas altamente reativas, produzidas por organismos vivos oriundas da manutenção da homeostase de fatores ambientais, que, em altas quantidades, podem danificar ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, causando alterações funcionais. Pode-se incluir como fonte endógena de ROS as células inflamatórias, mitocôndrias e os peroxissomos. Na cadeia respiratória mitocondrial, a maior parte do oxigênio utilizado é reduzido a água, porém até 5% pode ser convertido em ânion superóxido. Outras fontes são por meio da ação de NADPH oxidase, xantina oxidase, lipoxigenases e cicloxigenases. Os peroxissomos, por exemplo, detêm a produção de quantidades elevadas de peróxido de hidrogênio e superóxido, mas concentram antioxidantes como catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) (Kozlov *et al.*, 2024; Sikder *et al.*, 2025).

As ROS estão, aparentemente, conectadas a todos os processos biológicos conhecidos, com papéis relevantes na modulação fisiológica e de doenças. Em alguns contextos, ROS podem atuar no controle de cascatas de sinalização e, em outros, podem iniciar danos a macromoléculas como proteínas e DNA. Ainda, podem causar citotoxicidade levando a morte de células, o que está associado a um desbalanço de componentes antioxidantes (Hecht *et al.*, 2024).

Sabe-se que em condições fisiológicas, baixas concentrações de ROS atuam como moléculas sinalizadoras na proliferação, migração, diferenciação celular e ativação de mecanismos de sobrevivência frente ao estresse. Por outro lado, os altos níveis podem culminar em danos celulares significativos, como quebras de fita simples no DNA, despolarização da membrana mitocondrial, peroxidação lipídica e alterações na estrutura secundária de proteínas. Por isso, no intuito de contornar esses efeitos, os organismos mantêm sistemas complexos que fazem o equilíbrio entre ROS e

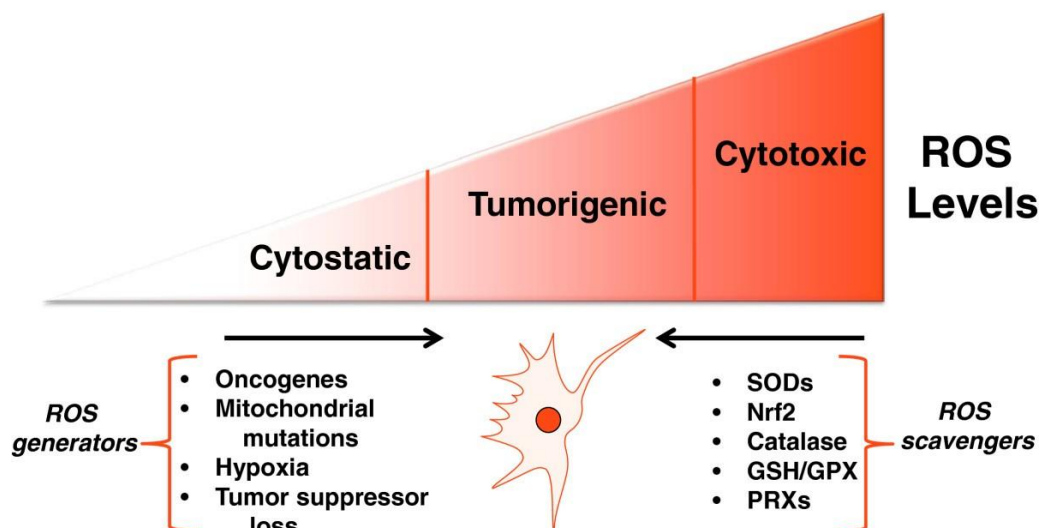
antioxidantes, promovendo uma homeostase redox (Azmanova; Pitto-Barry, 2022) (Figura 8).

As células dispõem de um sistema de defesa para manter os níveis de ROS dentro de limites adequados, composto por enzimas antioxidantes capazes de converter radicais livres em moléculas mais estáveis e menos danosas. Entre as principais vias de neutralização, incluem-se: a conversão de O_2^- em H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD); a ação da catalase sobre o H_2O_2 , gerando H_2O e O_2 ; a decomposição de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) pela glutathione peroxidase; a redução de H_2O_2 pelo ciclo da tioredoxina, formando H_2O ; e a detoxificação exógena catalisada pela glutathione transferase (Jomova *et al.*, 2023; Jomova *et al.*, 2024).

No microambiente tumoral, existe uma elevada atividade metabólica e frequentemente é possível encontrar condições de hipóxia. Devido à rápida proliferação e vascularização insuficiente, as células tumorais tendem a produzir altas concentrações de ROS para provocarem danos ao DNA e simultaneamente ativarem vias moleculares redox-sensíveis, a partir da ativação de fatores induzidos por hipóxia (HIFs), induzem a expressão de diversos genes relacionados à vascularização tumoral, à transição epitélio-mesenquimal (EMT), à invasão e metástase, ao metabolismo específico do câncer, à evasão do sistema imune e à aquisição de características de células-tronco cancerígenas, que estarão envolvidas na resistência terapêutica, sobrevivência e progressão tumoral (Arfin *et al.*, 2021; Bae *et al.*, 2024).

Em inflamações crônicas, ocorre a ativação de células mediadoras inflamatórias que produzem ROS e espécies reativas de nitrogênio (ERN), aumentando o desequilíbrio redox, havendo uma superação da resposta antioxidante endógena, o que causa danos irreversíveis a componentes essenciais. Dentre as vias de sinalização responsáveis pela proliferação das células tumorais e associadas a ROS, pode-se destacar a do EGFR, Nrf2, RAS/RAF, MAPK (ERK1/2, MEK), PI3K, fosfolipase C e proteína cinase C. Ainda, pode-se destacar a expressão alterada de p53, que regula a apoptose, contribuindo com a progressão da célula tumoral (Iqbal *et al.*, 2024; Plociniczak *et al.*, 2025).

Figura 8. Efeitos dos diferentes níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) na célula



Legenda: O equilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) permite que as células cancerígenas mantenham níveis de ROS dentro da faixa tumorigênica. A ativação da produção mitocondrial de ROS, induzida por oncogenes, mutações mitocondriais, hipóxia ou perda de genes supressores de tumor, intensifica a sinalização redox, promovendo a tumorigênese. Paralelamente, células tumorais apresentam níveis elevados de proteínas antioxidantes, que impedem que o aumento de ROS atinja concentrações citotóxicas incompatíveis com a sobrevivência e proliferação celular.

Fonte: Adaptado de Sullivan *et al.* 2014.

Assim, a perda de equilíbrio redox é presente em vários tipos de câncer, incluindo no CCU. Pode-se destacar como os fatores que contribuem com seu desenvolvimento a inflamação crônica em decorrência de traumas na região cervical, infecções bacterianas e, principalmente a infecção pelo HPV (Munkherjee *et al.*, 2023). Este último, está envolvido no processo de carcinogênese cervical por aumentar o estresse oxidativo principalmente pela persistência ativa do sistema imunológico nessa situação. Ainda, essa geração de ROS pode promover alterações genéticas no epitélio cervical, o que também favorece o aparecimento de neoplasias (Anton *et al.*, 2025).

Dados da literatura mostram que, antes mesmo do tratamento oncológico, os níveis de moléculas antioxidantes nos pacientes são baixos em detrimento de um aumento nas espécies oxidantes. Além disso, o estado redox celular tem relevância na determinação do prognóstico da doença em relação ao tratamento, direcionando um plano terapêutico adequado a cada situação. Atualmente, é reconhecido que alguns quimioterápicos utilizados clinicamente promovem apoptose das células tumorais por indução do estresse oxidativo causado pelo aumento da geração de ROS, como a doxorrubicina, a cisplatina e o paclitaxel (Jelic *et al.*, 2025).

2.4 Vias de sinalização intracelulares das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

Codificadas por genes específicos, as MAPKs integram o grupo de proteínas cinases serina/treonina. Pode-se subdividi-las em três famílias: as cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2), as cinases N-terminais de c-Jun ou cinases ativadas por estresse (JNK1/2/3) e as isoformas de p38 MAPK (α , β , γ , δ) (Yan *et al.*, 2024). As ERK1 e ERK2 correspondem a MAPK3 e MAPK1, enquanto as ERKs atípicas ERK3 e ERK4 correspondem a MAPK6 e MAPK4. Já as MAPKs ativadas por estresse p38 α MAPK e p38 β MAPK são conhecidas como MAPK14 e MAPK11 (Morgos *et al.*, 2024). A ativação dessa cascata de sinalização ocorre em três níveis: primeiro, há a ativação de uma MAPK cinase cinase (MAP3K), seguida pela fosforilação de uma MAPK cinase (MAP2K), que segue para uma dupla fosforilação das proteínas da subfamília MAPK (Katopodis *et al.*, 2021).

As vias de transdução de sinal mediadas pelas MAPKs atuam como importantes mecanismos reguladores dos processos vitais celulares e de alterações anormais. Na constante pesquisa sobre o câncer, diversas cinases já foram associadas intimamente ao desenvolvimento e progressão da doença. Por exemplo, o gene *KRAS* está associado a cerca de 25% das mutações genéticas presentes em cânceres humanos, e ainda não existem agentes terapêuticos direcionados e de fato eficazes para esse alvo (Shi *et al.*, 2024).

As MAPKs desempenham um papel fundamental em eventos celulares e estão amplamente expressas em células eucarióticas. Elas participam da regulação de processos como proliferação, diferenciação e resposta ao estresse oxidativo e apoptose (Morgos *et al.*, 2024).

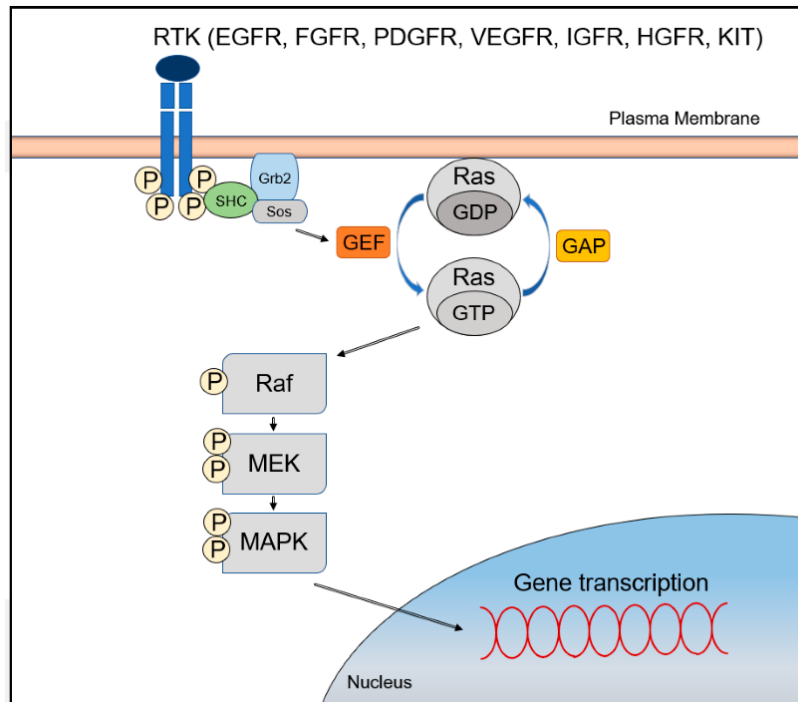
2.4.1 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer do colo do útero

A família de Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) consiste nas isoformas ERK1 (p44) e ERK2 (p42), intimamente relacionadas aos fatores de crescimento celular. Essa via é ativada por receptores localizados na superfície da célula, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR); receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR); receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR) (Bahar *et al.*, 2023).

A ligação dos fatores de crescimento a estes receptores, culmina na ativação da porção catalítica de RTKs na membrana plasmática, que irá fosforilar resíduos de tirosina localizadas na região citoplasmática do receptor. Esse evento promove o recrutamento de um complexo adaptador chamado GRB2/Shc/SOS (do inglês *Growth factor receptor-bound protein 2*, *SHC-transforming protein*, *Son of Sevenless homolog*, respectivamente) para a membrana plasmática, que por sua vez induz a conversão de RAS-GDP na conformação ativa RAS-GTP (Hendrikse *et al.*, 2023). Após essa ativação, a cinase serina/treonina RAF (A-RAF, B-RAF e C-RAF) é atraída para a membrana celular e ativada por processos de fosforilação e dimerização com complexos de ancoragem. As proteínas RAF agem regulando diretamente as cinases MEK1 e MEK2, que fosforilam e ativam ERK1/ERK2. Quando ativadas, as ERKs irão se translocar para o núcleo, promovendo a ativação de dois importantes fatores de transcrição da família AP-1: c-JUN e c-FOS (Moon *et al.*, 2021; García-Hernández *et al.*, 2022; Adamopoulos *et al.*, 2024). Tais fatores irão induzir a transcrição de genes que estão envolvidos na progressão do ciclo celular e em outros processos, ligando-se às porções AP-1 das regiões promotoras. Ainda, sabe-se que genes codificadores de fatores de crescimento possuem sítios de ligação para ativadores induzidos pela via ERK, o que leva a uma autossuficiência de sinais proliferativos e a uma contínua estimulação de crescimento celular em um cenário de ativação anormal dessa via (Fei *et al.*, 2025) (Figura 9).

Como a via da ERK desempenha um papel fundamental e importante no controle de processos celulares como sobrevivência e proliferação, quando sua ativação está aberrante, ela é fortemente associada a eventos de transformação celular e carcinogênese. Por exemplo, essa via pode inibir proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como BAX e BIM, e ainda pode induzir a expressão de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-XL, levando a um desbalanço e sobrevivência celular (Barbosa *et al.*, 2021).

Figura 9: Via de sinalização da família de Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK)



Legenda: A ativação da via MAPK/ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase*) inicia quando ligantes se ligam a receptores de membrana, como o EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), o FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) e o VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) ativando RTKs que fosforilam resíduos de tirosina. Esse evento recruta o complexo adaptador GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) / Shc (*SHC-transforming protein*) / SOS (*Son of Sevenless homolog*), que converte RAS (*Rat Sarcoma protein*) de sua forma inativa ligada a GDP (*Guanosina Difosfato*) para a forma ativa ligada a GTP (*Guanosina Trifosfato*). RAS ativo atrai e ativa as cinases RAF, que por sua vez ativam MEK1/2, culminando na fosforilação e ativação de ERK, gerando sinais proliferativos e de sobrevivência celular.

Fonte: Adaptado de Moon *et al.* 2021.

No contexto do HPV, principal agente causador do CCU, as oncoproteínas E6 e E7 contribuem para o aumento da atividade das vias MAPK. Em vários tipos de CCU, oncogenes derivados de células transformadas são ativados e superexpressos por meio da via ERK. A oncoproteína E5, por exemplo, desempenha um papel central na regulação de EGFR e VEGF, promovendo a expressão de VEGF através da ativação de ERK, ao mesmo tempo em que regula sua fosforilação e estabiliza o VEGF. Além disso, a E5 também está envolvida na resistência à autofagia e à apoptose, por meio da regulação da ERK (Bonab *et al.*, 2021).

Embora a sinalização via ERK1/2 seja frequentemente associada a efeitos pró-tumorais, também há relatos de que essas MAPKs podem induzir a morte de células tumorais, dependendo do tipo celular e do estímulo aplicado. Esse efeito antitumoral ocorre por meio da ativação da apoptose, seja pela via intrínseca, envolvendo a liberação de citocromo c e ativação da caspase-9, ou pela via extrínseca, mediada pela ativação da caspase-8. Diversos estímulos têm sido apontados como capazes

de desencadear essa morte celular via ERK1/2, incluindo ROS e alguns agentes quimioterápicos, como cisplatina, doxorrubicina, etoposídeo, carboplatina e paclitaxel (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021).

Diante do exposto, a via ERK desempenha um papel central no CCU ao estar envolvida nos processos de proliferação celular, sobrevivência e progressão tumoral, evidenciando seu potencial como alvo terapêutico para estratégias de intervenção direcionadas.

2.4.2 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer do colo do útero

A JNK (cinase c-Jun N-terminal) faz parte das proteínas da família MAPK pode ser ativada por estímulos externos como radiação ultravioleta, citocinas, fatores de crescimento, ROS, choque térmico, patógenos, entre outros (Yan *et al.*, 2024). No início, essa cascata de sinalização foi identificada no fígado de camundongos e foi chamada de proteína cinase ativada por estresse (SAPK), porém depois de alguns estudos recebeu o nome de JNK por ser capaz de fosforilar e ativar o fator de transcrição c-Jun. Assim como outras vias MAPK, elas são encontradas em três isoformas: JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) e JNK3 (MAPK10). As duas primeiras são encontradas em quase todos os tecidos, enquanto a terceira é restrita ao cérebro, coração e testículos (Hammouda *et al.*, 2020).

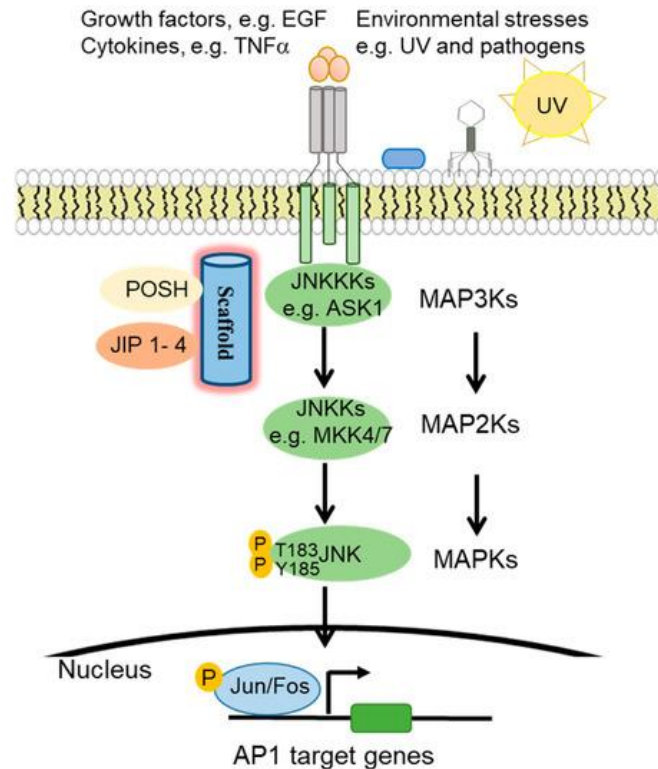
A via da JNK regula a expressão de vários genes *downstream*. Quando uma célula recebe um estímulo de estresse extracelular, a fosforilação de MAPKKK (por exemplo, MEKK1-4, ASK1/2, TAK1, MLK2) leva a fosforilação de MAPKK (por exemplo, MKK4 e MKK7), que resulta na fosforilação das JNKs em sítios de treonina e tirosina no motivo Thr-Pro-Tyr (Treonina-Prolina-Tirosina). As MAPKKs são apresentadas a uma regulação adicional por proteínas *scaffold* (responsáveis por organizar os componentes para garantir a interação proteica) tais como as proteínas associadas à JNK (JIP1, JIP2 e JIP3) proteínas SH3 (por exemplo, a POSH) e o complexo associado à IκB quinase (IKAP) (Hammouda *et al.*, 2020). Quando ativadas, ativam e modulam diversas proteínas tanto nucleares quanto não nucleares. JNK ativa proteínas Jun (por exemplo, MKK4 e MKK7) que se dimerizam com proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1/2), culminando na formação do fator de transcrição AP-1, responsável pela expressão dos genes envolvidos na progressão e proliferação

tumoral. Ainda, podem modular proteínas como p53, Bcl-2 e BAX, que são importantes no processo tumoral (Pua *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2025) (Figura 10).

A via da JNK está presente em diversos processos biológicos, tais como desenvolvimento embrionário, metabolismo e crescimento, longevidade, morte celular programada, migração, reparo e proliferação celular entre outros. Ainda, é visto um papel dual dessa via atuando tanto na morte quanto na sobrevivência celular, a depender do contexto e do tipo de célula que está envolvida (Corrales *et al.*, 2021).

Dentre os estudos que abordam o CCU induzido pelo HPV, é relatado na literatura uma forte relação com a via de sinalização JNK. Um estudo realizado por Morgan e colaboradores (2021) demonstrou que essa via se encontra ativada tanto em lesões cervicais quanto no CCU, a partir de uma fosforilação de JNK induzida pelo oncogene E6. Para isso, foi realizado um bloqueio da via com inibidores específicos ou o silenciamento do substrato c-Jun, resultado em uma redução da proliferação celular e indução da apoptose em células de câncer do colo do útero. Ainda, observam que esse efeito está parcialmente associado à ativação dependente de JNK da via do EGFR, com aumento da expressão de EGFR e de seus ligantes. A sinalização JNK/c-Jun também favoreceu a invasão tumoral ao induzir fatores relacionados à transição epitélio-mesenquimal (EMT), como Slug e vimentina, além de sustentar a expressão dos oncogenes virais E6/E7, criando um circuito de retroalimentação positiva que promove proliferação, sobrevivência e EMT no câncer do colo do útero.

Figura 10: Via de sinalização das Cinases c-Jun N-terminal (JNK)



Legenda: Em resposta a estresses ambientais, fatores de crescimento e citocinas, as JNKKKs (*c-Jun N-terminal Kinase Kinase Kinases* ou Cinases c-Jun N-terminais de terceira ordem, como ASK1 – *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*) fosforilam as JNKKs (*c-Jun N-terminal Kinase Kinases* ou Cinases c-Jun N-terminais de segunda ordem), especificamente MKK4 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4* / Quinase 4 da MAP2K) e MKK7 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7* / Cinase 7 da MAP2K). Essas MAP2Ks (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases* / Cinases da MAP2K), por sua vez, ativam as JNKs (*c-Jun N-terminal Kinases* / Cinases c-Jun N-terminais), que finalmente modulam os fatores de transcrição da família AP-1 (*Activator Protein 1* / Proteína Ativadora 1), promovendo a regulação de genes envolvidos em proliferação, apoptose, diferenciação e respostas ao estresse celular.

Fonte: Adaptado de Hammouda *et al.*, 2020.

Portanto, a via JNK modula de forma crítica a sobrevivência e a apoptose no CCU, influenciando a expressão dos oncogenes E6/E7 do HPV e a capacidade invasiva tumoral, reforçando seu valor como alvo para abordagens terapêuticas.

2.4.3 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer do colo do útero

A via de sinalização da família p38 MAPK é composta por quatro isoformas codificadas por genes distintos: p38 α MAPK (MAPK14), p38 β MAPK (MAPK11), p38 γ MAPK (MAPK12) e p38 δ MAPK (MAPK13). Essas isoformas compartilham alta homologia estrutural, mas apresentam diferenças quanto à expressão tecidual e

funções biológicas. A p38 α MAPK é a isoforma mais bem caracterizada, amplamente expressa e essencial para a regulação de processos inflamatórios, apoptóticos e diferenciação celular (Yin *et al.*, 2025).

A ativação da p38 MAPK ocorre em resposta a estresses ambientais, radiação UV, choque térmico, hipóxia, osmolaridade alterada, além de estímulos inflamatórios mediados por citocinas e fatores de crescimento. A cascata inicia-se pela ativação de MAP3Ks (como ASK1 e TAK1), que fosforilam as MAP2Ks MKK3 e MKK6, responsáveis pela fosforilação nos resíduos Thr180 e Tyr182 da p38 MAPK, levando à sua ativação. Uma vez ativada, a p38 MAPK transloca-se ao núcleo e fosforila diversos substratos, incluindo fatores de transcrição como ATF2, Elk-1 e p53, além de proteínas reguladoras da resposta inflamatória, apoptose e ciclo celular. A ativação da p38 MAPK é modulada por proteínas *scaffold*, que organizam espacial e temporalmente os complexos de sinalização, definindo a intensidade da sinalização. Entre os principais alvos da via, destacam-se a regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IL-1 β (Interleucina-1 beta) e IL-6 (Interleucina-6), além da modulação da apoptose e controle da diferenciação de células imunes e musculares (García-Hernández *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2023).

A via é controlada principalmente por fosfatases, especialmente pela ação de fosfatases de serina/treonina, tirosina e de dupla especificidade (DUSP/MKP), que atuam desfosforilando resíduos críticos da p38 MAPK ou de seus alvos a montante. A DUSP4, por exemplo, tem sido associada a diferentes desfechos clínicos no câncer, exercendo papéis oncogênicos ou supressores conforme o tipo tumoral. Evidências demonstram que sua baixa expressão em câncer de mama e colorretal correlaciona-se com pior prognóstico, enquanto no carcinoma papilífero de tireoide está relacionada a melhor desfecho. Em contrapartida, em tumores gástricos e mamários, a DUSP4 associa-se a quimiorresistência (Canovas; Nebreda, 2021).

Alguns estudos recentes indicam que a via p38 MAPK desempenha um papel fundamental na modulação do CCU. Compostos demonstraram efeitos antitumorais, promovendo apoptose por meio da ativação de p38 MAPK e da clivagem de caspases. A ativação de p38 MAPK, especificamente, foi responsável pela indução da cascata apoptótica, enquanto a inibição desta MAPK reduziu significativamente a apoptose (Lee *et al.*, 2024).

Tais achados reforçam a relevância de p38 MAPK como um alvo terapêutico potencial em estratégias de tratamento do câncer do colo do útero, destacando seu papel na regulação da sobrevivência e morte celular nesse tipo tumoral.

2.5 Compostos de selênio

No corpo humano, existem cerca de 70 micronutrientes em concentrações tão pequenas que representam aproximadamente 0,005-0,01% do peso total do organismo. Esses elementos são primordiais para o adequado funcionamento fisiológico e podem ser classificados como elementos essenciais e não essenciais. Os nutrientes essenciais, como o ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), cromo (Cr), cobalto (Co), manganês (Mn) e iodo (I), não podem ser sintetizados pelo organismo, sendo, portanto, obtidos exclusivamente por meio da dieta. Por outro lado, os nutrientes não essenciais, como o arsênio (As), cádmio (Cd), níquel (Ni), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e bário (Ba) podem ser sintetizados pelo organismo e são necessários em pequenas quantidades (Moses *et al.*, 2025).

Após a segunda guerra mundial, houve um aumento da ingestão de alimentos em todo o mundo. No entanto, a qualidade não foi acompanhada, culminando em uma deficiência de minerais e microelementos, principalmente de ferro, zinco, cobre e selênio. Essa deficiência refere-se ao conceito de “fome oculta”, pela falta prolongada desses micronutrientes. Por exemplo, a Organização Mundial da Saúde recomenda que um adulto ingira cerca de 55 µg de selênio por dia, a fim de manter a homeostase desse elemento no organismo. No entanto, é estimado que a ingestão diária seja metade do que é recomendado (Organização Mundial da Saúde, 1996; Shenkin, 2006; Venturelli *et al.*, 2022).

A forma orgânica do selênio é majoritariamente a selenocisteína, incorporada em 25 genes humanos, presente principalmente nas selenoproteínas atuando como oxidoredutases com Sec sendo o resíduo catalítico. A capacidade protetora do selênio contra radicais livres está relacionada à sua posição estratégica nos centros ativos de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase, fortalecendo as defesas do organismo contra danos oxidativos. Elas desempenham um papel fundamental em diversos processos bioquímicos e fisiológicos devido principalmente a suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias por regular células do sistema imunológico (Başegmez, 2023). A tioredoxina redutase 1 (TR1), a selenoproteína de

15 kDa (Sep15) e a glutathione peroxidase 2 (GPx2) são mais estudadas em relação ao câncer e pertencem a essa família (Venturelli *et al.*, 2022).

No âmbito fisiológico, o selênio quando em doses nutricionais atua como um antioxidante, enquanto em altas doses torna-se oxidante. O efeito oxidante do selênio é usado no tratamento de tumores, pois estudos mostram que células tumorais são mais suscetíveis a ação oxidante do selênio (Razaghi *et al.*, 2021). Sua deficiência está relacionada a doenças como cardiomiopatias, doenças degenerativas e disfunções imunológica. Já a exposição a altos níveis cronicamente pode culminar em queda de cabelo, erupções cutâneas, entre outros (Radomska *et al.*, 2021).

Dessa forma, o efeito dual de compostos de selênio está vinculado à sua concentração. Ao mesmo tempo que o selênio integra sistemas antioxidantes e protege a célula de mutações e danos ao DNA, as altas concentrações podem induzir a morte celular (Anjum *et al.*, 2025). Um estudo *in vitro* realizado por Díaz-Argelich e colaboradores (2017) usou compostos inéditos de selênio para avaliar a citotoxicidade em células de linhagens humanas de câncer de mama (MCF-7), próstata (PC-3), colorretal (HT-29), pâncreas (PANC-1) e pulmão (HTB-54). Foi possível identificar o efeito citotóxico dos compostos por inibirem a proliferação celular em concentrações inferiores a 10 µM, provocando parada do ciclo celular na fase G2/M, alteração do estado redox e indução de morte celular apoptótica e autofágica.

O papel do selênio no câncer ainda permanece parcialmente controverso, exigindo investigações mais aprofundadas e abrangentes para esclarecer sua influência sobre a saúde. Nesse contexto, é fundamental considerar aspectos como a forma química do selênio (inorgânico, como o selenito de sódio, ou orgânico, como a selenometionina), a dose administrada, a biodisponibilidade, os níveis basais de selênio na população estudada, bem como o tipo e o estágio do câncer, entre outros fatores determinantes (He *et al.*, 2025).

Assim, a crescente resistência dos tumores a tratamentos convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia, aliada aos efeitos colaterais severos frequentemente associados a esses métodos, têm motivado a busca por novos agentes anticâncer. Nesse contexto, os compostos de selênio emergem como uma promissora alternativa, tendo como vantagens sua menor toxicidade, maior seletividade e eficácia quando comparado aos quimioterápicos tradicionais, além da capacidade de atenuar os efeitos adversos das terapias anticâncer convencionais (Radomska *et al.*, 2021).

2.5.1 SeNitro

No contexto da necessidade de novas abordagens terapêuticas antitumorais, pode-se inserir o *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro). Um composto organosselado obtido com rendimento de 59% e ponto de fusão entre 180-182 °C. As análises espectroscópicas do composto confirmaram a presença dos grupos funcionais esperados, como as carbonilas associadas às ligações N–CO e Se–CO, além de sinais característicos de anéis aromáticos e do grupo nitro. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) evidenciaram a correta distribuição dos hidrogênios aromáticos e alifáticos, bem como os carbonos do sistema etilenolactâmico, corroborando a estrutura proposta (De Sousa *et al.*, 2023).

Um estudo conduzido com o SeNitro demonstrou atividade antimicrobiana contra a cepa laboratorial *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra em ensaios *in vitro*. O valor de concentração inibitória mínima (CIM) foi de 80 µM, indicando eficácia moderada em comparação aos demais compostos da série, que apresentaram CIMs entre 10 e 20 µM. Para fins de referência, os agentes terapêuticos padrão utilizados, isoniazida e rifampicina, exibiram CIMs de 1,9 e 0,03 µM, respectivamente. Apesar da atividade relativamente mais baixa, os resultados indicam que o composto possui efeito antimicrobiano sobre *M. tuberculosis*, sinalizando seu potencial como candidato a investigação adicional, possivelmente em combinações terapêuticas ou modificações estruturais visando otimização de sua potência (De Sousa *et al.*, 2025).

Além disso, o SeNitro demonstrou atividade antiparasitária contra múltiplas espécies de *Leishmania*. O experimento foi conduzido em cepas de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major* e *L. amazonensis*, e o composto apresentou valores de CI_{50} superiores a 50 µM para todas as cepas testadas. Esses resultados corroboram os achados preditivos obtidos por modelos de triagem virtual, nos quais o composto apresentou probabilidades de atividade entre 50 e 61%, sugerindo que ele pode exercer efeito leishmanicida sobre a forma promastigota do parasita. Essa consistência entre os dados preditivos e experimentais sugere que o composto mantém efeito leishmanicida sobre a forma promastigota do parasita e reforça seu potencial como candidato promissor para otimizações futuras, podendo servir como base para o desenvolvimento de derivados mais potentes e seletivos contra *Leishmania* (De Sousa *et al.*, 2023).

Embora os resultados do SeNitro tenham apresentado atividade biológica moderada, sua estrutura química, derivada de seleno-etilenolactamida, evidencia características promissoras de interação biológica. A presença de átomos de selênio e grupos aromáticos estrategicamente posicionados sugere potencial para modular processos celulares e redox, conferindo ao composto um perfil interessante para investigação em outros contextos biológicos.

Esses atributos estruturais e a capacidade demonstrada de atuar sobre alvos biológicos justificam o teste do SeNitro em um modelo de citotoxicidade contra células tumorais, já que ele pode atuar em vias que são comuns a células cancerosas. Portanto, esse trabalho se propôs a explorar a potencial atividade do SeNitro frente à linhagens tumorais, contribuindo para o avanço científico na descoberta de novos compostos terapêuticos à base de selênio e ampliando as possibilidades de estratégias inovadoras no tratamento do câncer.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a atividade antitumoral *in vitro* do SeNitro em linhagem celular de câncer do colo do útero.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do SeNitro em diferentes linhagens de células tumorais humanas (HeLa, SK-MEL-28, HCT-116, MCF-7; MDA-MB-231);
- Avaliar a citotoxicidade do SeNitro em linhagem de células sadias de rim embrinário humano HEK-293;
- Determinar o índice de seletividade (IS) do SeNitro;
- Identificar o tipo de morte celular induzida pelo SeNitro (apoptose ou necrose) em células HeLa;
- Investigar o envolvimento do estresse oxidativo no efeito citotóxico do SeNitro em células HeLa;
- Avaliar a participação de Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) na citotoxicidade do SeNitro em células HeLa.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

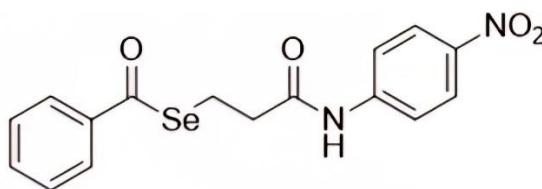
As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e no Laboratório de Biofotônica do Centro de Biotecnologia da UFPB (CBiotec/UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Amostra teste

O composto *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) (Figura 11) foi sintetizado conforme descrito por Sousa e colaboradores (2023) e fornecido gentilmente pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e Prof. Dr. Helivaldo Diogenes da Silva Souza do Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) do Departamento de Química (DQ) pertencente ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O produto foi mantido em *via* a temperatura ambiente.

Figura 11. Estrutura química do composto *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro)



Fonte: Sousa *et al.*, 2023.

4.2.2 Preparo da amostra

Para a realização dos ensaios farmacológicos, o composto SeNitro (MM: 377,25 g/mol) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) puro (100%), resultando em uma solução estoque com concentração final de 40 mM. A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas a fim de obter as diferentes concentrações necessárias para os testes. Em todos os experimentos, assegurou-se que a concentração final de DMSO em cada poço não excedesse 1%.

4.2.3 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: azul de tripan - (Sigma-Aldrich®, EUA); Solução fosfato tamponada (PBS, IpeFarM, Brasil); Dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma-Aldrich®, EUA); MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich®, EUA), meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma Aldrich®, EUA), meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (SigmaAldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), Soro fetal bovino – SBF (Nutricell®, Brasil), Solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma Aldrich®, EUA), Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma Aldrich®, EUA), Tripsina (GIBCO®, Irlanda). doxorubicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), N-acetilcisteína (NAC) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), iodeto de propídeo (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), JC-1 (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), Hoechst 34580 (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA). Os inibidores SP600125, U-0126, PD169316 foram adquiridos na Cayman Chemical®, Ann Arbor, Michigan, EUA.

4.2.4 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH Zentrifugen - Rotina 380 R, Alemanha); Microscópio invertido (Olympus®, Japão); Balança analítica (GEHAKA® AG 200, Japão); Fluxo laminar vertical modelo PA-300 (Pachane®, Brasil), Estufa de CO₂ modelo TE-399 (TECNAL®, Brasil), Leitor de Multidetecção Synergy HT (BioTek®, Brasil), Autoclave vertical CS (PRISMATEC®, Brasil), Estufa de secagem e esterilização (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Brasil), microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha), banho maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrolux®, Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.2.5. Linhagens tumorais e não tumoral humanas

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, foram utilizadas as seguintes linhagens celulares tumorais: SK-MEL-28 (melanoma humano), HeLa (câncer cervical humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário), HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano), MCF-7 (câncer de mama humano). Já a linhagem não tumoral usada foi a de rim embrionário humano (HEK-293).

Tabela 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas

Linhagem	Classificação	Origem	Meio de cultura ^a
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
HeLa	Adenocarcinoma cervical	Humana	DMEM
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário	Humana	DMEM
HCT-116	Adenocarcinoma colorretal	Humana	RPMI
MCF-7	Adenocarcinoma mamário	Humana	DMEM
HEK 293	Rim embrionário	Humana	DMEM

Legenda: ^aDMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute* 1640.

Fonte: Elaborado pelo autor

A manipulação das células foi feita em fluxo laminar e mantidas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento foi feito a cada 24 horas, realizando o procedimento de repique sempre que as garrafas atingissem cerca de 80% de confluência. Para isso, em todas as linhagens, adicionaram-se 2 mL de solução de tripsina por 3 minutos, promovendo o desprendimento das células aderidas à superfície do frasco. Em seguida, o meio contendo SBF (10%) foi adicionado na mesma proporção para inativar a tripsina. As células foram centrifugadas a 500 × *g* por 5 minutos, ressuspensas em meio suplementado e, então, submetidas à contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade foi verificada por exclusão com azul de tripan, e a concentração ajustada para 5 × 10⁴ células/mL.

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade do SeNitro em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)

O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliação da citotoxicidade do SeNitro frente as diferentes linhagens celulares. Esse método envolve a avaliação da viabilidade e proliferação celular através da atividade redutora de enzimas mitocondriais e citoplasmáticas. O MTT, um corante amarelo solúvel em água, é convertido em cristais de formazan insolúveis de cor azul-púrpura pela atividade de desidrogenases (principalmente a desidrogenase succínica) de células viáveis, resultando na clivagem do anel tetrazol. Após a lise da célula, os cristais são liberados e a subsequente solubilização permite a quantificação via espectrofotometria (Mosmann, 1983; Kumar *et al.*, 2018).

Para o ensaio do MTT, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 2×10^5 (HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, HEK-293 e SK-MEL-28) ou 3×10^5 (HCT-116) células/mL, adicionando-se 100 μ L por poço. Após 24 h de aderência, foram adicionados 100 μ L das soluções de SeNitro (1,17–100 μ M) ou doxorrubicina (DXR) (0,16–20 μ M), diluídos em DMSO a uma concentração final não superior a 1%. As células foram incubadas por 24, 48 ou 72 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após a incubação, 110 μ L de sobrenadante foi removido, e 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL) adicionado. As placas foram incubadas por mais 4 horas. Após esse tempo, 100 μ L de uma solução de hidrocloreto de dodecil sulfato de sódio ácido (SDS-HCl) a 10% foi adicionado para dissolver os cristais de formazan produzidos. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 570 nm. Estes dados foram utilizados para calcular a CI₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular). Para cada linhagem celular, foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata.

A partir deste parâmetro foi escolhida a linhagem celular mais sensível, a fim de investigar os mecanismos de ação antitumorais responsáveis pelo efeito citotóxico. O Índice de Seletividade (IS) foi determinado de acordo com a fórmula abaixo:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem celular não tumoral}}{CI_{50} \text{ da linhagem celular tumoral}}$$

4.3.2 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo SeNitro em células HeLa

4.3.2.1 Análise morfológica por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo

Neste ensaio, foi realizada a análise morfológica das células após tratamento com o SeNitro, utilizando a coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). O LA é um corante metacromático, permeável às membranas celulares, que se ligará aos ácidos nucleicos (Gao *et al.*, 2020). Células viáveis serão coradas em verde, devido à ligação do LA ao RNA citoplasmático e nuclear (Bankó *et al.*, 2021). Ao contrário do LA, o IP não consegue penetrar em células com membrana intacta, ligando-se apenas em DNA de células comprometidas, diferenciando de células viáveis (Crowley *et al.*, 2016).

Para a realização do ensaio, as células HeLa foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^4 células/mL em placas de 24 poços (1 mL por poço) e incubadas *overnight* a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram tratadas com o SeNitro em diferentes concentrações (2,5, 5 ou 10 µM) ou DXR (4 µM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas a $500 \times g$, 25 °C, por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 20 µL de solução contendo os corantes LA a 1 mg/mL e IP a 10 µg/mL.

As células coradas foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser, com aumento de 4000 x, utilizando *lasers* com comprimentos de onda de excitação de 488 e 552 nm, e detecção de emissão nas faixas de 510–541 nm e 639–701 nm. Para cada amostra, foram obtidas imagens de quatro campos aleatórios, sendo o experimento repetido três vezes, em duplicata. A quantificação celular em cada campo foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ (Sousa *et al.*, 2023).

Os critérios estabelecidos para a análise morfológica foram: a) Células viáveis: núcleo verde claro e estrutura celular intacta; b) Células em apoptose inicial: núcleo verde brilhante, mostrando cromatina em condensação; c) Células em apoptose tardia: áreas alaranjadas densas (coradas em verde e vermelho) com condensação da cromatina e formação de bolsas apoptóticas (*blebs*) na membrana; e d) Células necróticas ou mortas: coradas apenas em vermelho (Robbins, Marcus, 1963; Renviosé *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2019).

4.3.2.2 Análise de alterações nucleares em células HeLa por microscopia confocal após coloração com Hoechst 34580

Durante o processo de apoptose, diversas alterações celulares podem ser observadas, incluindo modificações nucleares como condensação e/ou fragmentação da cromatina e encolhimento nuclear (picnose). O Hoechst 34580 é um marcador fluorescente permeável à membrana celular que se liga à cromatina, permitindo a visualização de alterações nucleares relacionadas à apoptose. Ele se liga preferencialmente ao sulco menor do DNA, com afinidade aumentada por regiões ricas em pares de bases adenina-timina (A–T). Assim, quanto maior a fluorescência observada, mais pronunciadas são as alterações nucleares nas células afetadas (Bucevičius, 2018).

Para a realização do ensaio, as células HeLa foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^4 células/mL em placas de 24 poços (1 mL por poço) e incubadas *overnight* a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram tratadas com o SeNitro em diferentes concentrações (5 ou 10 µM) ou DXR (4 µM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas a $500 \times g$, 25 °C, por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em uma solução de 20 µL contendo o corante Hoechst (10 µg/mL) por 20 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. As células recém-coradas foram então analisadas utilizando um microscópio confocal de varredura a *laser*, para identificar alterações nucleares características de células em apoptose. Foi utilizada uma ampliação de 4000 x, utilizando laser de excitação a 405 nm e detecção de emissão entre 410 e 600 nm. Para cada amostra, foram adquiridas quatro imagens de campos aleatórios, totalizando três experimentos independentes em duplicata. A fluorescência foi mensurada utilizando o *software* ImageJ, e os dados analisados no *software* GraphPad Prism. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.3.2.3 Análise do efeito de SeNitro no potencial de membrana mitocondrial de células HeLa por microscopia confocal após coloração com JC-1

A avaliação das alterações no potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando o corante fluorescente JC-1 (cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), um composto lipofílico e catiônico capaz de apresentar dois padrões distintos de emissão fluorescente. Em mitocôndrias funcionais, o JC-1 se acumula na matriz mitocondrial formando agregados, os quais emitem fluorescência vermelha. Por outro lado, em condições de despolarização mitocondrial, como ocorre em células em apoptose, o corante permanece em sua forma monomérica, emitindo fluorescência verde. Assim, a transição do sinal vermelho para o verde indica a perda do potencial de membrana mitocondrial (Sivandzade; Bhalerao; Cucullo, 2019).

Para a realização do ensaio, as células HeLa foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^4 células/mL em placas de 24 poços (1 mL por poço) e incubadas *overnight* a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram tratadas com o SeNitro em diferentes concentrações (5 ou 10 µM) ou com o controle positivo carbonil cianeto clorofenilidrazona (CCCP) (50 µM) por 24 horas. Após o período de tratamento, as

células foram coletadas e centrifugadas a $500 \times g$, 25 °C, por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em uma solução de 20 μL contendo o corante e visualizadas com 2000 x de magnificação, utilizando o *laser* de 488 nm, e emissão nas faixas de 520-542 nm e 580-614 nm. A fluorescência foi mensurada utilizando o *software* Image J.

4.3.2.4 Investigação do efeito de SeNitro no estado redox celular: citotoxicidade na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Para avaliar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito citotóxico do SeNitro, as células foram pré-tratadas com N-acetilcisteína (NAC), uma molécula antioxidante que neutraliza ROS e serve como precursora na síntese de glutathione (Marco; Foti; Corsico, 2022). As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^5 células/mL (100 μL). Após 24 h, as células foram incubadas na presença ou ausência de NAC (5 mM) por 3 h. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de SeNitro (5 ou 10 μM) ou DXR (4 μM) (100 μL). Após 72 h de incubação, o sobrenadante foi descartado (110 μL), a solução de MTT (5 mg/mL, 10 μL) foi adicionada e a placa incubada novamente por 4 h. O formazan formado foi dissolvido com SDS (100 μL) *overnight* (Mosmann, 1983). A absorbância foi medida com um comprimento de onda de 570 nm usando um espectrofotômetro para determinar a viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.3 Avaliação da citotoxicidade do SeNitro na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

Com o objetivo de investigar o papel das vias das MAPKs na citotoxicidade induzida pelo SeNitro, as células HeLa foram submetidas a um pré-tratamento com inibidores específicos de ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) e p38 MAPK (PD 169316). Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 2×10^5 células/mL (100 μL). Após 24 horas, foram incubadas por 1 hora na presença ou ausência dos inibidores: 40 μM de iMEK ERK1/2, 20 μM de iJNK ou 20 μM de ip38 MAPK. Em seguida, foram tratadas com o SeNitro (5 μM) ou com DXR (4 μM) (100 μL). Após 72 h de incubação, o sobrenadante foi descartado (110 μL), a solução de MTT (5 mg/mL, 10 μL) foi adicionada e a placa incubada novamente por 4 h. O formazan formado foi dissolvido com SDS (100 μL) *overnight* (Mosmann, 1983). A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro para determinar a

viabilidade celular (%), com um comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata.

4.3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o GraphPad Prism®, e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

A análise dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). A concentração que inibe 50% da viabilidade celular (CI_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por análise de regressão não-linear.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do índice de seletividade (IS)

Inicialmente, a citotoxicidade do *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) foi testada em diferentes linhagens celulares tumorais humanas utilizando o ensaio do MTT após 72 h de tratamento. A linhagem celular menos sensível ao tratamento foi a de carcinoma colorretal HCT-116 (CI_{50} , concentração que inibe 50% da viabilidade celular, $> 100 \mu M$), enquanto a linhagem de câncer cervical HeLa foi a mais sensível, com CI_{50} de $5,03 \pm 0,45 \mu M$. Em relação à linhagem não tumoral HEK-293, o SeNitro apresentou CI_{50} de $93,00 \pm 16,13 \mu M$, enquanto a doxorrubicina obteve CI_{50} $0,51 \pm 0,03 \mu M$ (Tabela 2).

A partir dos valores de CI_{50} obtidos, foi possível determinar o índice de seletividade (IS) para o SeNitro e DXR usando os dados da linhagem de célula renal embrionária humana HEK-293 como modelo não tumoral. Como resultado, observou-se que o SeNitro apresentou maior IS para a linhagem HeLa (IS = 18,49), sendo esta a linhagem celular escolhida para dar prosseguimento aos experimentos.

Tabela 2. Citotoxicidade do *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) e da doxorrubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento

Linhagem celular ^a	CI_{50}^b (μM)		IS ^c	
	SeNitro	DXR	SeNitro	DXR
HeLa	$5,03 \pm 0,45$	$3,80 \pm 1,10$	18,49	0,13
MDA-MB-231	$24,39 \pm 2,78$	$0,2 \pm 0,02$	3,81	2,55
MCF-7	$65,03 \pm 5,67$	$1,53 \pm 0,20$	1,43	0,33
SK-MEL-28	$76,64 \pm 15,37$	$3,55 \pm 1,67$	1,21	0,14
HCT-116	> 100	$2,57 \pm 0,001$	-	0,20
HEK-293	$93,00 \pm 16,13$	$0,51 \pm 0,03$	-	-

Legenda: ^aHCT-116: carcinoma colorretal; HeLa: câncer cervical; MCF-7 (superexpressa receptores estrogênio e progesterona) e MDA-MB-231 (triplo negativa para hormônios): adenocarcinoma mamário; SK-MEL-28: melanoma; HEK-293: linhagem de rim embrionário humano. ^bConcentração que inibe 50% da viabilidade celular; ^cIS: índice de seletividade (CI_{50} linhagem não tumoral/ CI_{50} linhagem tumoral). Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Em adição, a citotoxicidade do SeNitro foi avaliada em diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72 h) na linhagem celular HeLa. Conforme apresentado na tabela 3, a molécula teste apresentou citotoxicidade significativa nos tempos avaliados, com valores de CI_{50} de $15,88 \pm 1,45$, $11,04 \pm 0,94$ e $5,03 \pm 0,45 \mu M$, respectivamente.

Tabela 3. Citotoxicidade do *N*-(4-nitrofenil)benzoselena-etilenolactamida (SeNitro) nas linhagens celulares humanas HeLa (câncer cervical) e HEK-293 (sadia embrionária renal) após 24, 48 e 72 h de tratamento.

Linhagem celular ^a	CI ₅₀ ^b (μM)			
	SeNitro ^c			DXR ^d
	24 h	48 h	72 h	72 h
HeLa	15,88 ± 1,45	11,04 ± 0,94	5,03 ± 0,45	3,80 ± 1,10
HEK-293	> 100	> 100	93,00 ± 16,13	0,51 ± 0,03

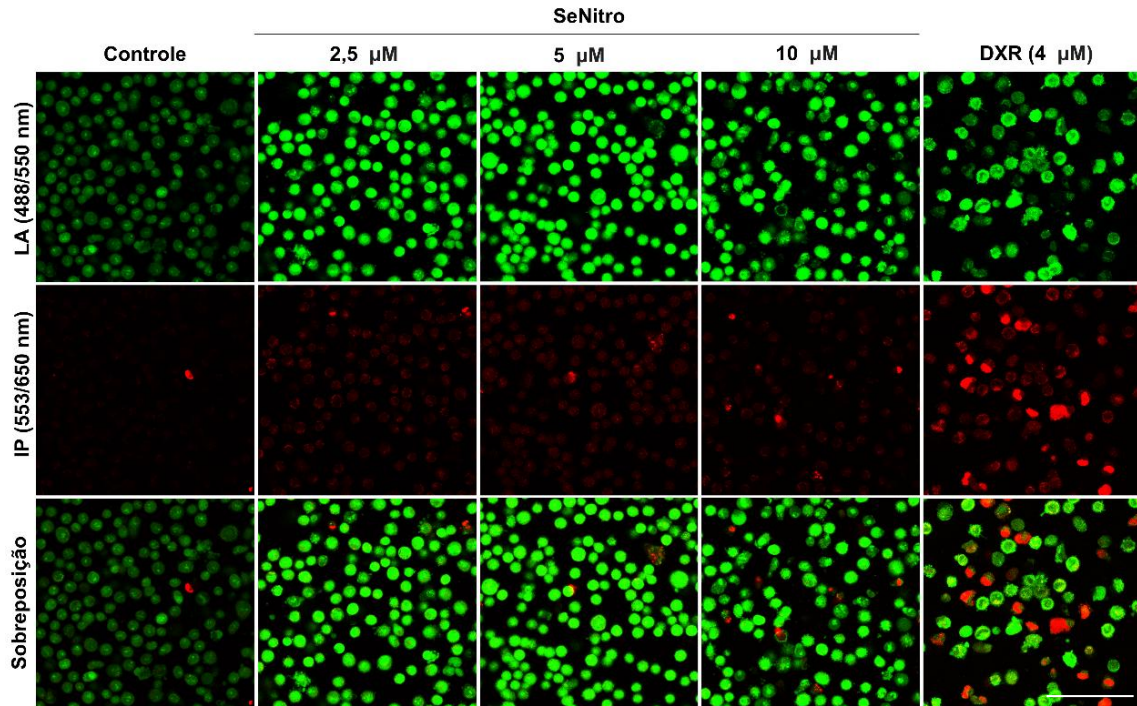
Legenda: HeLa: câncer cervical; HEK-293: linhagem de rim embrionário humano. ^bConcentração que inibe 50% da viabilidade celular após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com o SeNitro. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de CI₅₀ obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. ^c*N*-(4-nitrofenil)benzoselena-etilenolactamida (SeNitro). ^ddoxorubicina. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

5.2 Morfologia das células HeLa por análise de microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo

A Figura 12 (A) ilustra alterações morfológicas características do processo apoptótico nos grupos tratados com SeNitro ou DXR. As células viáveis apresentam núcleo verde claro e uma estrutura intacta, enquanto células em apoptose inicial exibem núcleo verde brilhante mostrando condensação da cromatina. Já as células em apoptose tardia mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina, enquanto as necróticas apresentam núcleo vermelho.

Na Figura 13 (B) observam-se eventos típicos da fase de execução da apoptose, como a condensação da cromatina e a formação de *blebs* na membrana plasmática.

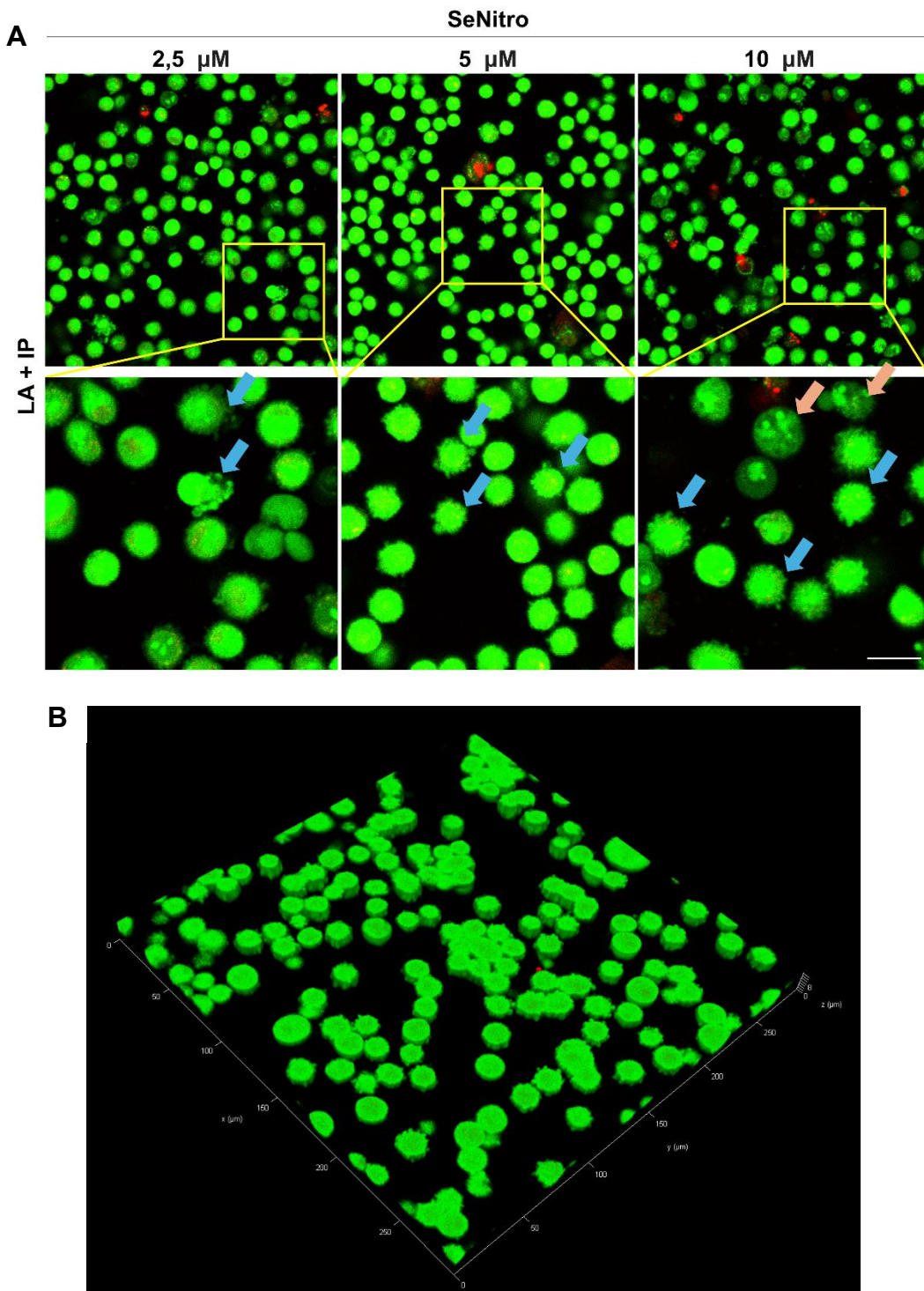
Figura 12: Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) de células de câncer cervical humano HeLa incubadas com *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) por 24 h



Legenda: células marcadas com laranja de acridina (LA) (10 mg/mL) e iodeto de proídeo (IP) (10 mg/mL) após o tratamento com SeNitro (2,5, 5 ou 10 μM) ou DXR (4 μM) por 24 h. Imagens observadas por microscopia confocal a laser, utilizando-se os lasers 488 e 552 nm, e emissão nas faixas de 510-541 e 639-701 nm. As células viáveis apresentam núcleo verde claro e uma estrutura intacta. Células em apoptose inicial exibem núcleo verde brilhante mostrando condensação da cromatina. As células em apoptose tardia mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina, enquanto as necróticas apresentam núcleo vermelho. Barra de escala: 100 μm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13: Imagens representativas detalhadas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) de células de câncer cervical HeLa incubadas com N-(4-nitrofenil)benzoselono-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) por 24 h



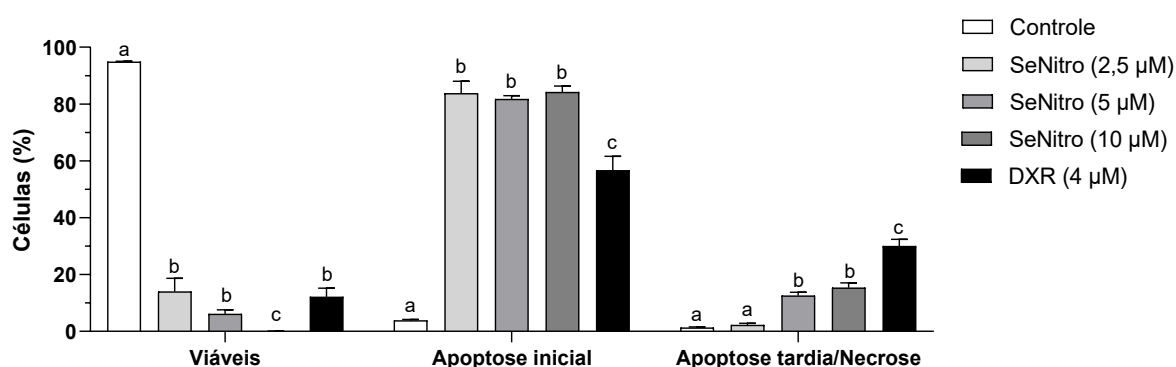
Legenda: Células marcadas com laranja de acridina (LA) (10 mg/mL) e iodeto de propídeo (IP) (10 mg/mL) após o tratamento com SeNitro (2,5, 5 ou 10 µM) ou DXR (4 µM) por 24 h. Imagens observadas por microscopia confocal a laser, utilizando-se os lasers 488 e 552 nm, e emissão nas faixas de 510-541 e 639-701 nm. (A) As setas azuis indicam *blebs* de membrana e as setas rosas indicam alterações de cromatina celular. (B) Imagem 3D das células HeLa tratadas com 5 µM de SeNitro. Barra de escala: 50 µm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses dados são apresentados de maneira quantitativa na Figura 14, que mostra o percentual de células HeLa marcadas com LA e/ou IP, após 24 h de tratamento com o SeNitro (2,5, 5 ou 10 μM) ou DXR (4 μM). Pode-se observar que o SeNitro induziu, comparado ao grupo controle ($3,83 \pm 0,34\%$), aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial (2,5 μM : $83,76 \pm 4,23\%$; 5,0 μM : $81,72 \pm 1,21\%$; 10 μM : $84,25 \pm 2,07\%$; $p < 0,0001$ para todos). Em adição, a molécula teste induziu aumento significativo do percentual de células em apoptose tardia/necrose nas concentrações de 5,0 e 10 μM ($12,55 \pm 1,22\%$ e $15,33 \pm 1,77\%$, respectivamente; $p < 0,0001$ para ambos), comparado ao grupo controle ($1,33 \pm 0,26\%$).

No grupo tratado com a DXR, observou-se um aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial e tardia/necrose ($56,71 \pm 4,91$ e $30,00 \pm 2,43\%$, respectivamente, $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle.

Figura 14: Indução da apoptose pelo *N*-(4-nitrofenil)benzoselono-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento



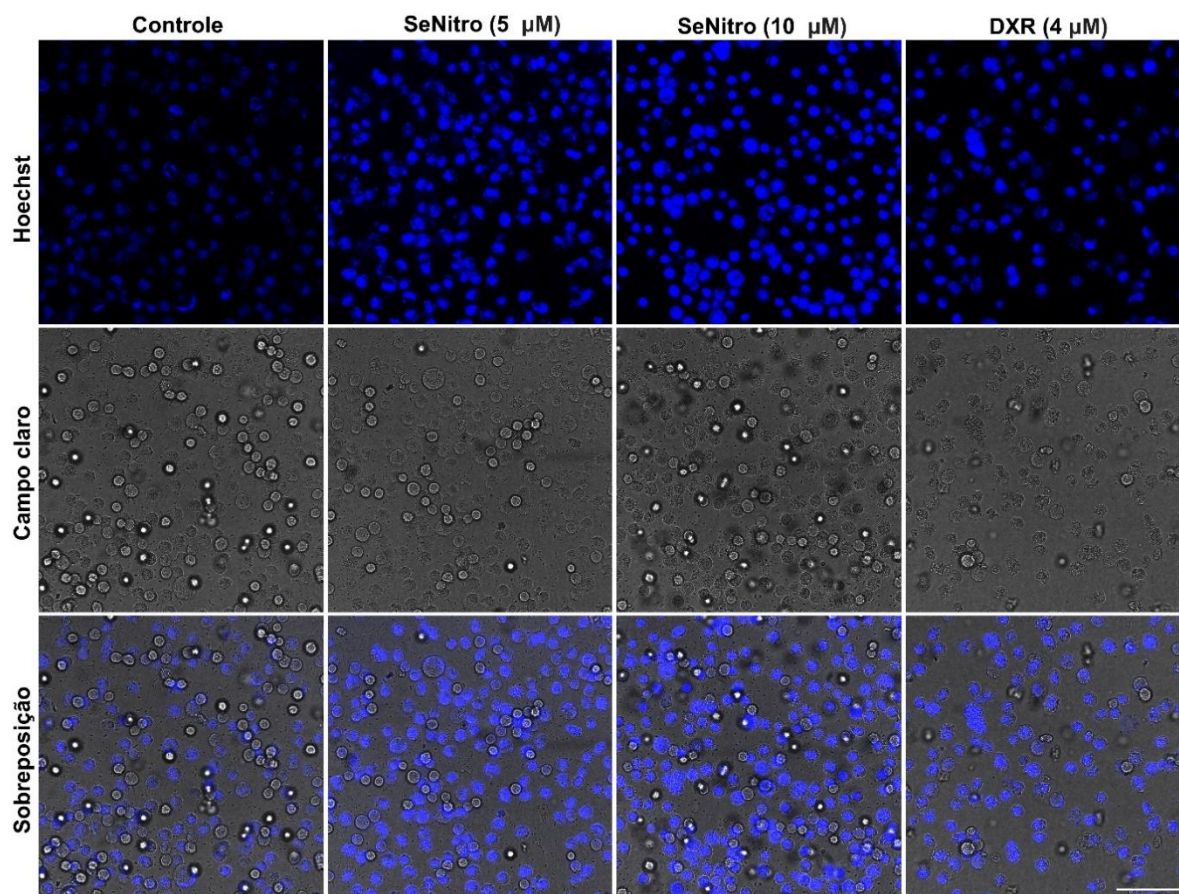
Legenda: Percentual de células marcadas com laranja de acridina (LA) (10 mg/mL) e iodeto de propídeo (IP) (10 mg/mL) após o tratamento com SeNitro (2,5, 5 ou 10 μM) ou DXR (4 μM) por 24 h. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguidos de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos experimentais de cada condição ($p < 0,0001$). SeNitro: *N*-(4-nitrofenil)benzoselono-etilenolactamida.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Alterações nucleares induzidas pelo SeNitro em células HeLa por análise de microscopia confocal após marcação com Hoechst 34580

A Figura 15 apresenta imagens representativas da fluorescência dos grupos controle e tratados com o SeNitro (5 ou 10 μM) ou DXR (4 μM) após marcação das células com o Hoechst 34580. O aumento da intensidade da fluorescência, comparado ao grupo controle, indica aumento de alterações relacionadas na cromatina nuclear características da apoptose, como condensação.

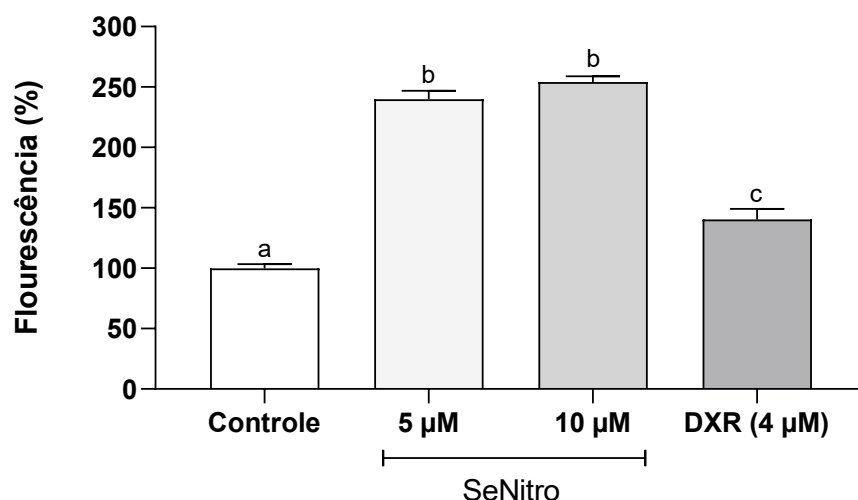
Figura 15: Imagens representativas de alterações nucleares induzidas pelo SeNitro (5 ou 10 μM) ou DXR marcadas por coloração Hoeschst 34580 em células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento



Legenda: Células marcadas com Hoeschst 34580 após o tratamento com SeNitro (5 ou 10 μM) ou DXR por 24 h, observadas por microscopia confocal a laser com laser a 405 nm e emissão 410-600 nm. SeNitro: *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida. Barra de escala: 100 μm . **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A figura 16 apresenta o percentual de fluorescência de Hoeschst 34580 nas células HeLa após 24 h de tratamento com o SeNitro (5 ou 10 μM) ou DXR (4 μM). Pode-se observar que os tratamentos com o SeNitro, nas duas concentrações utilizadas, aumentaram significativamente o percentual de células fluorescentes (5 μM : $240,0 \pm 6,93\%$; 10 μM : $254,1 \pm 4,78\%$, $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle. O tratamento com a DXR aumentou significativamente o percentual em cerca de 40% ($140,4 \pm 8,78\%$; $p < 0,0001$), quando comparado ao grupo controle.

Figura 16: Percentual de fluorescência da marcação com Hoechst 34580 após o tratamento de células de câncer cervical HeLa com SeNitro (5 ou 10 μ M) ou DXR em após 24 h de tratamento



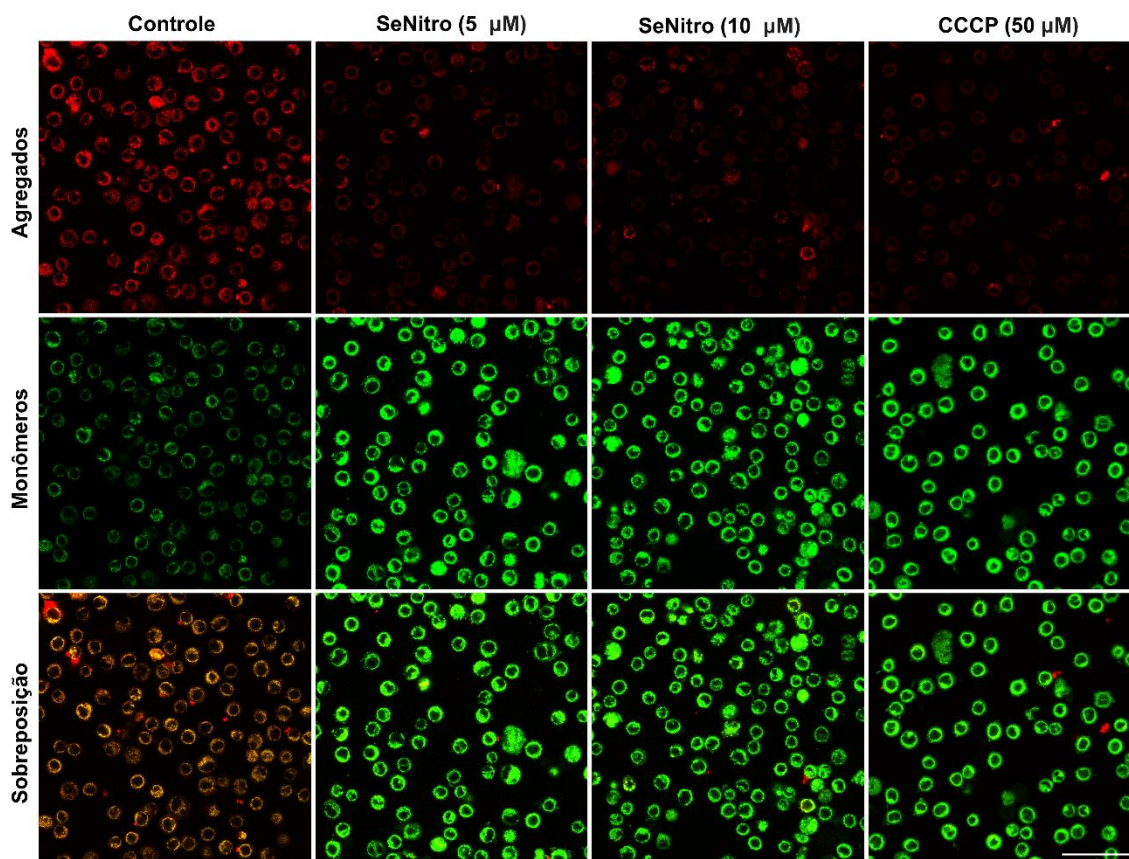
Legenda: Percentual de intensidade de fluorescência de células marcadas com Hoechst 34580 (10 mg/mL) após o tratamento com SeNitro (5 ou 10 μ M) ou DXR (4 μ M) após 24 h. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,0001$). SeNitro: *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Efeito do SeNitro sobre o potencial de membrana mitocondrial de células HeLa por análise de microscopia confocal após coloração com JC-1

A Figura 17 contém imagens representativas das fluorescências de JC-1 em monômeros (verde), caracterizando células com perda de potencial de membrana mitocondrial; e agregados (vermelho), indicando células com mitocôndrias íntegras, dos grupos tratados com SeNitro (5 ou 10 μ M) ou com o controle positivo carbonil cianeto *M*-clorafenilhidrazona (CCCP) (50 μ M).

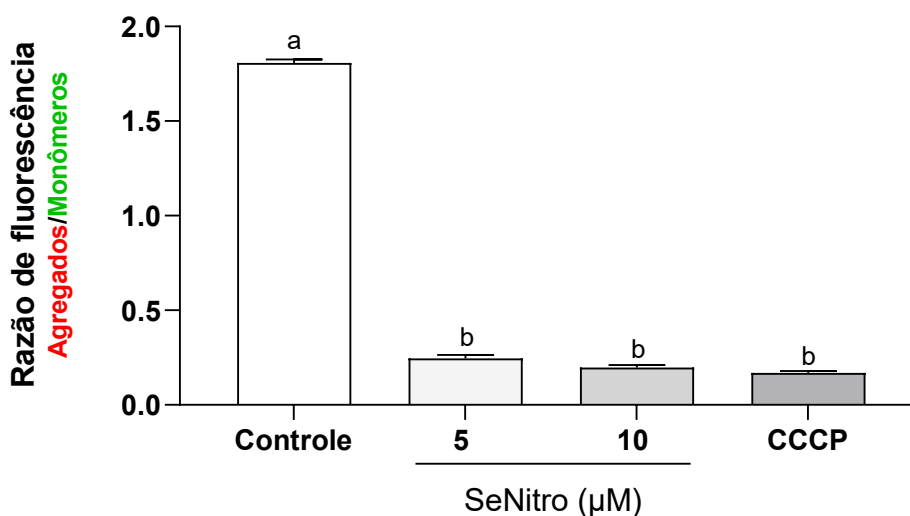
Figura 17: Imagens representativas da avaliação do potencial de membrana mitocondrial por coloração de JC-1 em células de câncer cervical humano HeLa incubadas com *N*-(4-nitrofenil)benzoselono-etilenolactamida (SeNitro) ou doxorubicina (DXR) ou carbonil cianeto M-clorafenilhidrazona (CCCP) após 24 h de tratamento



Legenda: Células marcadas com JC-1 após o tratamento com SeNitro (5 ou 10 µM) ou CCCP após 24 h, observadas por microscopia confocal a *laser*, utilizando o *laser* 488 nm e emissão 520-542 e 580-614 nm. SeNitro: *N*-(4-nitrofenil)benzoselono-etilenolactamida. Barra de escala: 100 µm. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A Figura 18 apresenta a razão de fluorescência entre os agregados de JC-1 e sua forma monomérica nas células HeLa, após 24 h de tratamento com SeNitro ou CCCP. Observa-se que ambos os compostos promoveram uma redução significativa na razão de fluorescência (SeNitro, 5 µM: $0,24 \pm 0,02$; SeNitro, 10 µM: $0,20 \pm 0,01$; CCCP: $0,17 \pm 0,01$; $p < 0,0001$ para todos), comparado ao grupo controle ($1,81 \pm 0,13$).

Figura 18: Avaliação do potencial mitocondrial em células tratadas com o SeNitro (5 ou 10 μ M) ou CCCP analisado por coloração JC-1 em células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento



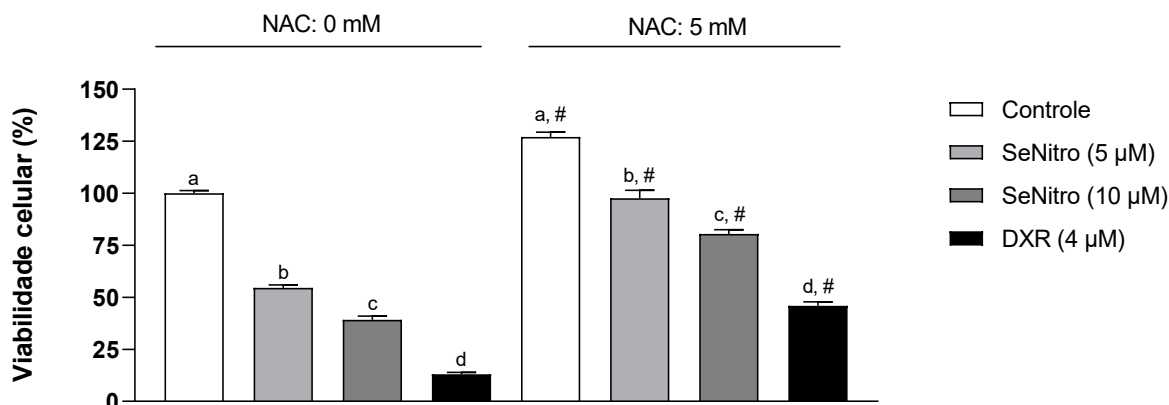
Legenda: Fluorescência dos agregados vermelhos em razão dos monômeros verdes de células HeLa marcadas com JC-1 (2,5 μ M) após o tratamento com SeNitro (5 ou 10 μ M) ou CCCP (50 μ M) por 24 h. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguidos de Tukey. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,0001$). SeNitro: *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

5.5 Citotoxicidade do SeNitro na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

A figura 19 apresenta os dados dos experimentos nas diferentes condições. Como esperado, na ausência de NAC, após 72 h de tratamento com o SeNitro, foi observada significativa redução da viabilidade celular (5 μ M: $54,50 \pm 1,49\%$; 10 μ M: $39,20 \pm 1,71\%$; $p < 0,0001$ para todos), quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 1,26\%$) (Figura 19). Já o pré-tratamento de 4 h com NAC (5 mM) preveniu significativamente o efeito citotóxico de SeNitro quando comparado aos grupos tratados na ausência de NAC, nas duas concentrações testadas (5 μ M: $97,57 \pm 3,88\%$; 10 μ M: $80,44 \pm 2,10\%$, $p < 0,0001$ para ambos).

No grupo tratado com DXR na ausência de NAC, verificou-se uma redução significativa da viabilidade celular ($13,01 \pm 0,89\%$; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Por outro lado, a presença do NAC preveniu significativamente o efeito citotóxico da DXR, aumentando a viabilidade celular para $45,93 \pm 1,92\%$ ($p < 0,0001$), quando comparado ao grupo tratado com DXR na ausência do antioxidante (Figura 19).

Figura 19: Citotoxicidade do SeNitro (2,5, 5 ou 10 μ M) em linhagem de células de câncer cervical humano HeLa na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) por 72 horas



Legenda: Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com SeNitro ou DXR na presença ou ausência de NAC. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos experimentais de cada condição ($p < 0,0001$). # $p < 0,0001$ comparado ao seu respectivo grupo na ausência de NAC. SeNitro: N-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida. DXR: doxorubicina; NAC: N-acetilcisteína

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Efeito citotóxico do SeNitro em células HeLa na presença ou ausência de inibidores de proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs)

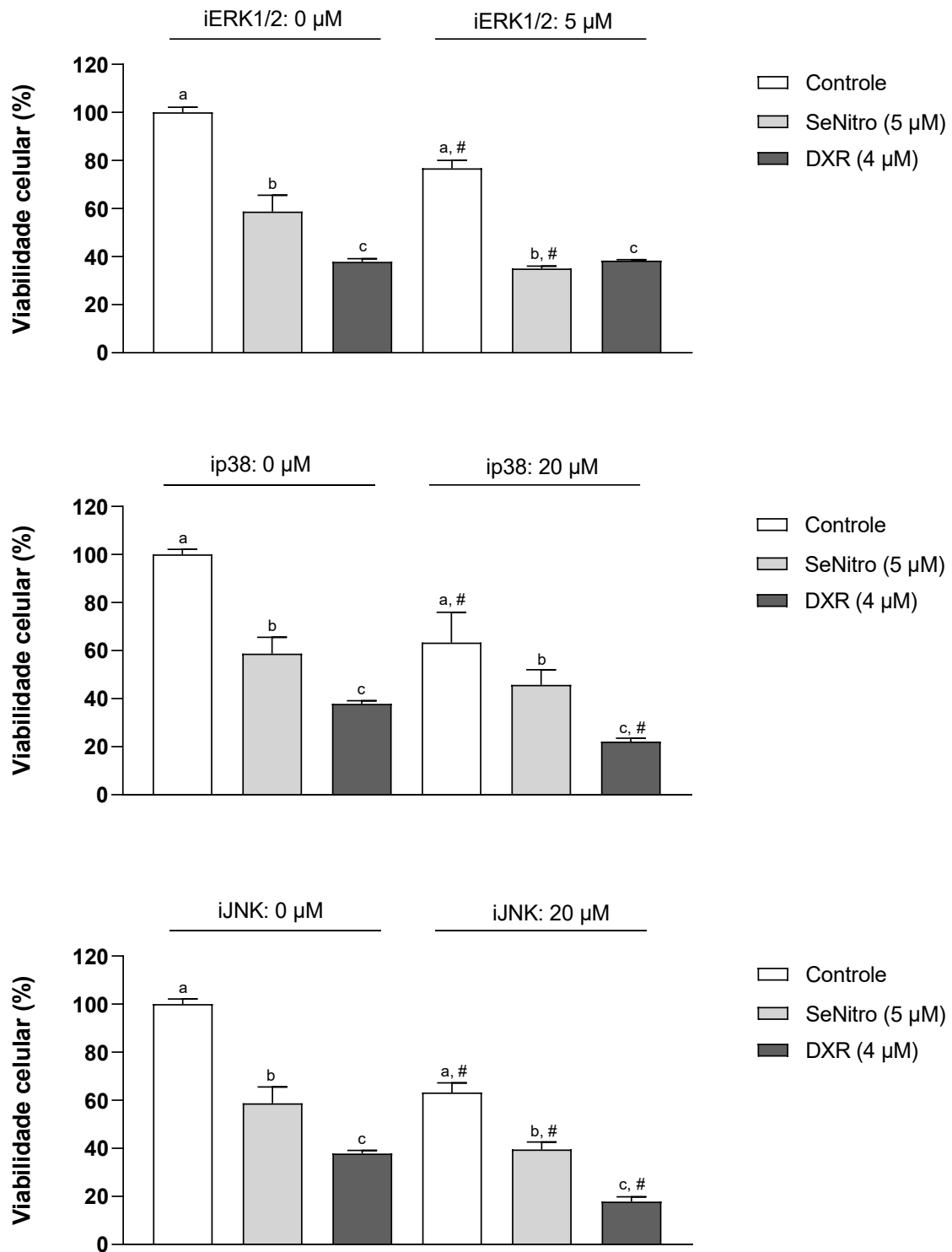
A Figura 20 apresenta os resultados da avaliação do efeito citotóxico do SeNitro ou DXR na presença ou ausência de inibidores das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) após 72 h de tratamento.

Na ausência de pré-tratamento com os inibidores, como esperado, foi observada uma redução significativa da viabilidade celular na concentração de 5 μ M de SeNitro ($58,73 \pm 6,79\%$, $p < 0,05$) e no grupo tratado com 4 μ M de DXR ($37,82 \pm 1,35\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao controle ($100,00 \pm 2,18\%$).

Na presença dos inibidores iERK1/2 ou iJNK (Figura 20 A e C), observou-se uma redução significativa da viabilidade celular após o tratamento com 5 μ M de SeNitro ($35,02 \pm 1,00\%$ e $39,58 \pm 3,04\%$, respectivamente; $p < 0,05$ para ambos) quando comparado aos grupos tratados com 5 μ M de SeNitro na ausência desses inibidores. Já o pré-tratamento com ip38 MAPK não provocou alteração significativa da viabilidade celular após o tratamento com 5 μ M de SeNitro ($45,71 \pm 6,34\%$) (Figura 20 B).

Na presença dos ip38 MAPK ou iJNK (Figura 20 B e C), o tratamento com DXR reduziu significativamente a viabilidade celular ($22,15 \pm 1,42\%$ e $17,85 \pm 2,04\%$, respectivamente; $p < 0,05$ para ambos), comparado aos grupos tratados com DXR na ausência desses inibidores. Contudo, o pré-tratamento com iERK1/2 (Figura 20 A) não foi capaz de alterar significativamente o efeito citotóxico da DXR, comparado ao grupo tratado com essa droga padrão na ausência do inibidor de ERK1/2 (viabilidade celular: $38,36 \pm 1,00\%$).

Figura 20: Efeito citotóxico do *N*-(4-nitrofenil)benzoselono-etilenolactamida (SeNitro) (5 ou 10 μ M) ou doxorubicina (DXR) na presença ou ausência de inibidores de ERK1/2 (U0126) (5 μ M), JNK (SP600125) (20 μ M) ou p38 MAPK (PD 169316) (20 μ M) em linhagem de células de câncer cervical humano HeLa após 24 h de tratamento



Legenda: Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com SeNitro ou DXR na presença ou ausência dos inibidores ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD 169316). Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguidos de Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos experimentais de cada condição e # denota diferença significativa entre as condições experimentais ($p < 0,05$, para todos).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer do colo do útero (CCU) é um problema a nível mundial. Ele é o quarto tipo de câncer mais prevalente, com números dominantes tanto em incidência quanto mortalidade entre mulheres de todo o mundo. Ainda que seja um problema global, áreas de países de baixa renda e emergentes apresentam alta incidência da doença (Mengistie *et al.*, 2025). Atualmente, o tratamento contra o câncer enfrenta diversos desafios clínicos que incluem a elevada recorrência e metástase. Assim, há uma necessidade da comunidade científica em contornar efeitos como a baixa eficácia dos tratamentos disponíveis, impulsionando a demanda para o desenvolvimento de novas abordagens como o aumento do arsenal farmacológico (Wang *et al.*, 2024)

Nesse contexto, pode-se inserir o *N*-(4-nitrofenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeNitro), um composto que contém o microelemento selênio em sua estrutura, como candidato. Ele é uma substância com atividade ainda restrita na literatura a dois estudos. Os artigos disponíveis mostram uma atividade considerável do SeNitro como antiparasitário contra *Leishmania* e antibacteriano contra *M. tuberculosis* (Sousa *et al.*, 2023; Sousa *et al.*, 2025). No entanto, não foi relatado o efeito citotóxico em células tumorais humanas, encorajando a investigação da atividade tumoral *in vitro* desse composto.

Assim, foi avaliada a citotoxicidade do SeNitro frente a linhagens de células tumorais e não tumoral humanas, por meio do ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Esse método permite estimar a viabilidade celular, uma vez que o MTT, um sal de coloração amarela, é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis, originando cristais de formazan, insolúveis em água e de coloração púrpura. A formação de formazan pode ser quantificada em espectrofotômetro, sendo a intensidade da coloração diretamente proporcional à viabilidade celular (Mosmann, 1983). Trata-se de um ensaio amplamente utilizado para avaliar o metabolismo celular, devido à sua simplicidade metodológica e à rapidez na obtenção dos resultados (Ghasemi *et al.*, 2021).

Nesse trabalho, a doxorubicina (DXR) foi utilizada como droga padrão. Ela é um agente antineoplásico amplamente estudado e usado em esquemas de tratamento com quimioterápicos, sendo consolidada como um dos mais utilizados clinicamente. A DXR apresenta diversos mecanismos de ação, que incluem inibição da topoisomerase II, aumento do estresse oxidativo e modulação de vias das MAPK (Xia

et al., 2025; Shackebaei *et al.*, 2025). Além disso, há uso recorrente em ensaios não-clínicos como a avaliação da citotoxicidade *in vitro* em diversas células tumorais, incluindo HeLa (Pummarin *et al.*, 2024).

Como resultado do ensaio de viabilidade pelo MTT, dentre todas as linhagens testadas, o SeNitro demonstrou um significativo efeito citotóxico contra a linhagem celular humana de câncer do colo do útero HeLa (CI_{50} de $5,03 \pm 0,45 \mu M$ em 72 h). Tais células são uma linhagem de CCU imortalizadas, coletadas de Henrietta Lacks, uma mulher afro-americana de 31 anos que faleceu em 1951. Essas células foram as primeiras a serem cultivadas com sucesso em laboratório e até hoje contribuem com o desenvolvimento de pesquisas científicas, como o estudo de vacinas, doença de Parkinson, Covid-19 e câncer (MacDonald; Forman, 2024).

Um estudo realizado por Huang e colaboradores (2021) utilizando complexos a base de selênio (Se-NHC) avaliou o potencial citotóxico em linhagens de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), de câncer de ovário humano (A2780) e de células sadias de epitélio ovário humano (IOSE80). Foi observada ausência de efeito em HepG2, mas significativa atividade citotóxica frente à linhagem A2780, sem toxicidade significativa em IOSE80. Os compostos mais ativos foram 2a ($CI_{50} = 9,7 \mu M$), 2b ($CI_{50} = 6,4 \mu M$) e 2h ($CI_{50} = 13,0 \mu M$). Já os derivados 2e e 2g apresentaram atividade moderada, enquanto outros mostraram baixa eficácia. Os dados sugerem que substituintes aromáticos e grupos fenila no anel imidazólico são cruciais para a atividade antitumoral e conferem seletividade para células tumorais.

Outro estudo abordou os disselenetos, uma classe de compostos orgânicos contendo ligação Se–Se, como promissores na atividade antitumoral. Foram relatados diferentes perfis de citotoxicidade frente a células tumorais. O difenil disseleneto demonstrou efeito citotóxico em linhagem de câncer de colon HT-29 a $80 \mu M$. Seus derivados 4,4'-dimetoxi e 3,3'-ditrifluorometil-difenil disseleneto foram mais ativos, com citotoxicidade em HT-29 a $20 \mu M$. O 3',5',3,5-tetratrifluorometil-difenil disseleneto apresentou valores de $IC_{50} = 8 \mu M$ em HL-60 (células de linhagem de leucemia humana), $13 \mu M$ em PC-3 (células de linhagem humana de câncer de próstata), $18 \mu M$ em MCF-7 (células de linhagem humana de câncer de mama) e $27 \mu M$ em HCT-116 (células de linhagem de câncer colorretal). O 1,2-bis(cloropiridazinil) disseleneto (12) exibiu CI_{50} de $10,34 \mu M$ em MCF-7, enquanto o composto *N,N'*-((diselanediylbis(2,1-fenileno))bis(metileno))di(etanoamina) mostrou citotoxicidade em HeLa ($IC_{50} = 20 \mu M$) e MCF-7 ($30 \mu M$) (Radomska *et al.*, 2021).

A quimioterapia apresenta algumas limitações no seu uso clínico, tanto pela significativa toxicidade em células normais, que é responsável pelos efeitos colaterais, quanto pelo desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais, indicando reduzida seletividade dos compostos quimioterápicos que são utilizados atualmente (Blagosklonny *et al.*, 2023). Sabendo disso, pode-se destacar a citotoxicidade apresentada pelo SeNitro. Com o ensaio do MTT realizado em linhagem de células renais embrionárias humanas (HEK-293), foi possível definir o índice de seletividade (IS) do composto para as células tumorais. O SeNitro apresentou uma seletividade cerca de 18 vezes maior ($IS = 18,49$) para a linhagem tumoral HeLa, indicando uma alta seletividade quando comparado a da DXR, droga amplamente usada na clínica, que foi de apenas 0,13 vez, sendo considerada pouco seletiva.

De acordo com dados da literatura, a seletividade de um composto em relação às células tumorais pode ser categorizada em quatro níveis: alta, quando o IS é igual ou superior a 6; moderada, para valores entre 3 e 6; baixa, quando varia entre 1 e 3; e ausente, quando o IS é inferior a 1 (Dobiasová *et al.* 2021).

Um estudo feito por Karakaş e colaboradores (2025) avaliou a atividade anticâncer de sais benzimidazolio fluorados complexados com selênio (Se-NHC) por meio do ensaio do MTT em células HCT-116 e em linhagem murina de fibroblastos L929. Os resultados demonstraram significativa citotoxicidade contra a linhagem tumoral, exibindo CI_{50} de $58,91 \pm 0,97 \mu M$ para o composto 3b e $19,62 \pm 0,79 \mu M$ para o 3c. O destaque ficou para o composto 3d, que a CI_{50} foi $6,46 \mu M$ e ainda apresentou o maior índice de seletividade, sendo 11,21 vezes mais seletivo para a célula tumoral, indicando baixa toxicidade e alta seletividade (CI_{50} em L929 = $74,34 \mu M$).

Desse modo, ao considerar a significativa citotoxicidade e a alta seletividade para a linhagem HeLa, o composto SeNitro demonstrou-se promissor para prosseguimento dos experimentos a fim de investigar e elucidar seu efeito antitumoral nessa linhagem tumoral. Dessa forma, os experimentos seguintes foram realizados para determinar as concentrações usadas nas investigações dos mecanismos de citotoxicidade induzidos pelo SeNitro. Assim, foram observadas as concentrações citotóxicas do SeNitro em diferentes tempos de tratamento. Como resultado, não houveram diferenças significativas entre os dados nos tempos de tratamento avaliados, sendo escolhido o menor valor de CI_{50} associado ao menor tempo de tratamento. A escolha das condições do ensaio de citotoxicidade é uma estratégia consolidada na avaliação farmacológica, pois a abordagem de usar tempos curtos e

concentrações baixas permite identificar efeitos precoces sem induzir adaptações celulares ou consequências que venham a mascarar o efeito principal (Komissarova *et al.*, 2005; Matotoka *et al.*, 2025). Assim, foram utilizadas as concentrações de 2,5 μM (correspondente à metade da concentração da CI_{50} em 72 h), 5 μM (correspondente à concentração da CI_{50} em 72 h) e 10 μM (correspondente ao dobro da concentração da CI_{50} em 72 h) de SeNitro para os experimentos subsequentes.

Estudos recentes têm demonstrado que os compostos de selênio exercem atividade antitumoral por múltiplos mecanismos, incluindo indução de apoptose, indução do estresse oxidativo intracelular e regulação de vias de sinalização essenciais para a sobrevivência celular, como as vias das Proteínas Cinase Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (Garbo *et al.*, 2022; Whang *et al.*, 2023; Shaaban *et al.*, 2024).

A apoptose é um tipo de morte celular programada, caracterizada por eventos morfológicos específicos, incluindo a condensação da cromatina e redução do volume celular como características iniciais; e fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos como finais (Saraste *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2024).

Dentre as diversas metodologias para avaliar esse tipo de morte, pode-se destacar o método de dupla coloração LA/IP (laranja de acridina/iodeto de propídio). A LA penetra todas as células, emitindo fluorescência verde nos núcleos, enquanto o IP entra apenas em células com membranas danificadas, emitindo fluorescência vermelha/alaranjada. Células verdes indicam células viáveis; verde-brilhante com cromatina condensada, apoptose inicial; alaranjadas, apoptose tardia; e vermelhas, necrose (Ude *et al.*, 2022; Jabbari *et al.*, 2022).

Nesse ensaio, as imagens obtidas por microscopia de fluorescência, revelaram características morfológicas clássicas de apoptose nas células HeLa após tratamento com o SeNitro, incluindo a formação de *blebs* na membrana celular e a condensação e fragmentação da cromatina.

Em seu estudo, Zhang e colaboradores (2015) utilizaram um selenodiazol na avaliação do efeito antitumoral em células das linhagens HeLa e de fibrossarcoma humano HT-1080. Após verificarem que o composto de selênio apresentou atividade citotóxica e dependente de tempo nessas linhagens, os pesquisadores buscaram observar a indução da apoptose por meio da coloração com o LA, na qual foi possível observar condensação da cromatina e fragmentação nuclear, que são características desse tipo de morte. Ainda, verificaram que a citotoxicidade do composto testado envolve a ativação de proteínas ligadas à apoptose e parada do ciclo celular na fase

G2/M. Tais resultados indicam o potencial anticâncer desse agente baseado em selênio.

Estudos recentes também demonstram a utilização da dupla coloração com LA/IP analisadas por microscopia de fluorescência na investigação do efeito antitumoral de compostos de selênio. Santos e colaboradores (2022) usaram esse método para avaliar células da linhagem de glioblastoma humano A172 após o tratamento com o composto de selênio Se-IP-06. Como resultado, observaram aumento significativo do percentual de células em apoptose, confirmado por alterações morfológicas observadas por microscopia, que incluem condensação da cromatina e alterações nucleares típicas de células apoptóticas.

Combinar técnicas para investigação do tipo de morte celular induzida por compostos com potencial antitumoral é uma estratégia para obter resultados mais robustos e bem elucidados. Nesse sentido, pode-se realizar a técnica do Hoechst para a análise de alterações nucleares durante o processo apoptótico. Esse corante é amplamente empregado na identificação de alterações características desse tipo de morte, como a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear, sendo capaz de detectar alterações em células por atravessar a membrana plasmática (Majtnerová *et al.*, 2021).

O aumento significativo da fluorescência celular após a marcação do DNA com o Hoeschst 34580, observado em células tratadas com SeNitro, evidencia características típicas da apoptose, como fragmentação nuclear e condensação da cromatina. Esses achados corroboram os resultados obtidos no ensaio do LA/IP, reforçando que o efeito citotóxico dessa molécula em células HeLa está associado à indução da apoptose.

Recentes estudos mostram o uso do Hoechst em ensaios de análise morfológica de células tumorais. Foi o que Yu e colaboradores (2022) observaram ao usar esse corante para avaliar a atividade de dois compostos de polissacarídeos selenizados (SeLP1 e SeLP2) ao compará-los com o composto sem o selênio em sua estrutura. O estudo realizado em HT-29 foi capaz de mostrar alterações morfológicas como retração e fragmentação dos núcleos, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos nos grupos tratados com os compostos quando comparados ao grupo sem o selênio. Assim, propuseram que a selenização do polissacarídeo foi responsável pela atividade antitumoral dos compostos.

Fu e colaboradores (2011) investigaram a indução da apoptose em células HeLa utilizando selenito de sódio. Após 24 h de tratamento, a coloração com Hoechst revelou alterações morfológicas típicas de apoptose, incluindo intensa condensação da cromatina e fragmentação nuclear. As análises de fluorescência indicaram que a porcentagem de células apoptóticas variou entre 18% e 32%, enquanto no grupo controle a ocorrência de apoptose foi praticamente nula.

A apoptose pode ser desencadeada por vias intrínseca e extrínseca. A via intrínseca, em particular, envolve a mitocôndria como reguladora central, que responde a sinais de estresse celular liberando proteínas pró-apoptóticas e alterando o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Lossi, 2022). Alterações nesse potencial são sinais precoces de apoptose e podem ser avaliadas experimentalmente por sondas fluorescentes, como o JC-1 (Sabirova *et al.*, 2025).

O ensaio com JC-1 permite avaliar a despolarização mitocondrial, permitindo a avaliação da integridade e funcionalidade das mitocôndrias em células submetidas a tratamentos citotóxicos (Sivandzade *et al.*, 2019). Esse corante catiônico se acumula exclusivamente em mitocôndrias de células vivas, formando agregados que emitem fluorescência vermelha, enquanto os monômeros emitem fluorescência verde. A perda do potencial de membrana mitocondrial reduz a formação de agregados, de modo que a razão entre fluorescência vermelha e verde é comumente utilizada para medir o $\Delta\Psi$ mitocondrial. Nesse ensaio, o CCCP (hidrazona *m*-clorofenil cianeto de carbonila) foi empregado como controle positivo, por se tratar de um inibidor da fosforilação oxidativa, que resulta em uma perda do potencial de membrana mitocondrial (Perelman *et al.*, 2012; Elefantova *et al.*, 2018; He *et al.*, 2024).

A diminuição da razão vermelha/verde após tratamento com SeNitro indicou a perda do potencial de membrana mitocondrial das células HeLa. Esses resultados reforçam que o composto induz apoptose e que esta pode estar sendo ativada pela via intrínseca.

Um estudo realizado por Yuan e colaboradores (2024), avaliou o potencial de membrana mitocondrial em células HeLa tratadas com o composto selenodiazol por meio do ensaio do JC-1. Como resultado, observaram que o composto aumentou significativamente os níveis intracelulares de ROS associados a alterações no $\Delta\Psi$ mitocondrial, com acúmulo de monômeros verdes de JC-1. Ainda, viram que essa alteração foi acompanhada da ativação de caspase-9, modulação da expressão de Bcl-2 e ativação da via JAK2/STAT3. Com tais achados, puderam concluir que o

selenodiazol exerceu seu efeito antitumoral em células de câncer do colo do útero por induzir aumento de ROS e apoptose mitocondrial.

De forma semelhante, um estudo feito por Lv e colaboradores (2024) utilizou o selenito de sódio (SS) para avaliar o tipo de morte em células HeLa por meio da análise mitocondrial com JC-1. Os resultados indicaram que o SS induziu a formação de ROS mitocondriais (mtROS), que levaram a perda do potencial de membrana mitocondrial provocada pela diminuição da fluorescência vermelha e aumento da verde, além da ativação das vias de apoptose. Ainda, verificaram que o pré-tratamento das células HeLa com Mito Q, um antioxidante direcionado à mitocôndria capaz de remover mtROS, atenuou esses efeitos, sugerindo que os mtROS desempenham um papel crucial na apoptose induzida pelo SS.

Com base nesses achados reportados na literatura, é possível sugerir que os compostos de selênio podem induzir a apoptose por meio da perda do potencial de membrana mitocondrial, frequentemente associada ao aumento dos níveis de ROS. Nesse contexto, a etapa subsequente de avaliação dos mecanismos de ação antitumorais do SeNitro buscou investigar o seu efeito sobre o estado redox das células HeLa.

Para tanto, a avaliação do estresse oxidativo induzido pelo composto em células HeLa foi realizada com o uso de N-acetilcisteína (NAC). No estudo com células tumorais e outros modelos não-clínicos, a NAC é utilizada como uma molécula antioxidante e sequestradora de ROS. Os resultados desse ensaio servem como evidência experimental da formação de ROS e da ativação de mecanismos redox intracelulares (Kalyanaraman, 2022). O SeNitro diminuiu a viabilidade das células HeLa quando na ausência da NAC, enquanto o pré-tratamento com NAC preveniu esse efeito. Esses resultados sugerem que a citotoxicidade do SeNitro está diretamente relacionada à indução de estresse oxidativo, mediada pelo aumento da produção de ROS.

De forma semelhante, Hsu e colaboradores (2022) investigaram o efeito do composto de selênio L-selenocistina (SeC) em células da linhagem de câncer colorretal humano (WiDr), demonstrando que o pré-tratamento com antioxidantes, como a NAC, reduziu a produção de ROS e atenuou parcialmente a citotoxicidade induzida pelo composto. De forma semelhante, Noè e colaboradores (2023) avaliaram derivados de selênio orgânico em células da linhagem de câncer pancreático e verificaram que o pré-tratamento com NAC também foi capaz de prevenir a

citotoxicidade induzida pelo composto, reforçando a evidência de que o mecanismo de ação desses compostos está associado a modulação do estado redox celular por provocar o aumento dos níveis de ROS.

Atualmente, sabe-se que ROS desempenham um papel dual, atuando tanto como mediadores de danos celulares quanto como moléculas sinalizadoras que regulam processos críticos como sobrevivência, proliferação e morte celular (Wang *et al.*, 2023; Rauf *et al.*, 2024). Entre os principais alvos dessas moléculas sinalizadoras estão as MAPK, incluindo ERK, JNK e p38 MAPK, que modulam respostas celulares distintas. Por exemplo, a ativação de ERK frequentemente está associada à sobrevivência e proliferação, enquanto p38 MAPK e JNK são mais ligados à indução de apoptose em resposta a estresse celular. Estudos recentes demonstram que compostos de selênio podem aumentar os níveis de ROS, ativando seletivamente essas vias, desencadeando a apoptose em diferentes linhagens tumorais (Wang *et al.*, 2023; Iqbal *et al.*, 2024).

Esse mecanismo evidencia a atuação do estresse oxidativo como um sinalizador envolvido em processos de regulação de sobrevivência e morte celular. Nesse contexto, o último conjunto de experimentos buscou avaliar o efeito do SeNitro na viabilidade das células HeLa, tanto na ausência quanto na presença de inibidores de MAPKs (iMAPK).

Na presença dos inibidores iERK1/2 (U0126) e iJNK (SP600125), o SeNitro foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular, indicando que a inibição dessas vias facilitou o efeito citotóxico do composto. Em contrapartida, o pré-tratamento com o i p38 MAPK não afetou significativamente a viabilidade.

Vias de sinalização envolvidas na proliferação e sobrevivência de vários tipos de câncer são amplamente estudadas. Por exemplo, um estudo realizado com derivados de selênio, como o 1,3-selenazolin-4-ona, mostrou que esses compostos foram capazes de induzir apoptose em células de câncer de próstata (PC-12) por meio da ativação da via ERK1/2 via MEK (Sanmartín *et al.*, 2012). Enquanto outra pesquisa mostrou que a selenometionina, um composto orgânico de selênio, pode induzir a fosforilação sustentada de ERK, sugerindo mais uma vez que a ativação dessa via pode estar envolvida nos efeitos antitumorais dos compostos de selênio (Goulet *et al.*, 2005).

Recentemente, um estudo se propôs a avaliar compostos de selênio na prevenção e terapia do câncer. Como exemplo, destacaram que o metilseleninato

(MSeA), pode ajudar no tratamento do câncer ao atuar nas vias de sinalização que controlam a morte celular. A inibição de JNK com SP600125 reduziu a ativação de caspases e bloqueou a apoptose causada pela combinação de MSeA com quimioterápicos como paclitaxel, SN38 e etoposídeo. Esses resultados indicam que o MSeA potencializa a apoptose por meio de alvos dependentes de JNK, mostrando seu potencial como adjuvante em terapias anticâncer, mesmo em células com deficiência de p53 (Lu *et al.*, 2025).

Tais achados corroboram os resultados observados no estudo do mecanismo antitumoral do SeNitro, reforçando o papel das vias MAPK na regulação da morte celular. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar de forma mais detalhada como essas proteínas participam do processo apoptótico.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, pode-se concluir que o composto de selênio SeNitro apresentou significativa citotoxicidade seletiva em linhagem de células de câncer do colo do útero (HeLa). Os achados sugerem que seu mecanismo de ação envolve a indução de apoptose, associada à perda do potencial de membrana mitocondrial e ao estresse oxidativo. Além disso, observou-se potencialização da ação citotóxica na presença de inibidores de vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ERK e JNK, indicando o envolvimento dessas vias no efeito citotóxico. Esses resultados reforçam o potencial do SeNitro como candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer do colo de útero. Contudo, investigações adicionais são necessárias para melhor caracterização dos efeitos observados.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, RUQAIA, SARIT LARISCH. Targeting XIAP for promoting cancer cell death-the story of ARTS and SMAC. **Cells**. v. 9, n. 3, p. 663, 2020.

ADAMOPOULOS, C.; CAVE, D. D.; PAPAVALASSILIOU, A. G. Inhibition of the RAF/MEK/ERK Signaling Cascade in Pancreatic Cancer: Recent Advances and Future Perspectives, **Int J Mol Sci**, v. 25, n. 3, p. 1631, 2024.

ALI, W.; CHEN, Y.; GANDAH, J.A.; et al. Cross-Talk Between Selenium Nanoparticles and Cancer Treatment Through Autophagy. **Biological Trace Element Research**, v. 202, p. 2931–2940, 2024.

ALMEIDA, A. J. P. O., DE OLIVEIRA, J. C. P. L., DA SILVA PONTES, L. V., DE SOUZA JÚNIOR, J. F., GONÇALVES, T. A. F., DANTAS, S. H., ... & DE MEDEIROS, I. A.. ROS: basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways. **Oxidative medicine and cellular longevity**. e1225578, 2022.

American Cancer Society. Radiation Therapy for Cervical Cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/cervical-cancer/treating/radiation.html>. Acesso em agosto de 2025.

ANJUM, S., AKHTAR, A., ALDAQAL, S. M., ABDUH, M. S., AHMAD, H., MUSTAFA, R., AHMAD, T. Enhanced targeted treatment of cervical cancer using nanoparticle-based doxycycline delivery system. **Scientific Reports**. v. 15, n. 1, p. 2318, 2025.

ANJUM, S., HASHIM, M., IMRAN, M., BABUR, S., ADNAN, S., HANO, C., & IBRAHIM, W. N. Selenium nanoparticles in cancer therapy: Unveiling cytotoxic mechanisms and therapeutic potential. **Cancer Reports**. v. 8, n. 6, e70210, 2025.

ARALDI, R. P., SANT'ANA, T. A., MODOLO, D. G., DE MELO, T. C., SPADACCI-MORENA, D. D., DE CASSIA STOCCO, R., DE SOUZA, E. B. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine & pharmacotherapy**. v. 106, 1537-1556, 2018.

ARFIN, S., JHA, N. K., JHA, S. K., KESARI, K. K., RUOKOLAINEN, J., ROYCHOUDHURY, S., ... & KUMAR, D. Oxidative stress in cancer cell metabolism. **Antioxidants**. v. 10, n. 5, p. 642, 2021.

AZMANOVA, MARIA, ANAÏS PITTO-BARRY. Oxidative stress in cancer therapy: friend or enemy?. **Chembiochem**. v. 23, n. 10, e202100641, 2022.

BABA, S. K., ALBLOOSHI, S. S. E., YAQOOB, R., BEHL, S., AL SALEEM, M., RAKHA, E. A., ... & MIRZA, S. Human papilloma virus (HPV) mediated cancers: an insightful update. **Journal of Translational Medicine**. v. 23, n. 1, p. 483, 2025.

BAE, T., HALLIS, S. P., & KWAK, M. K. Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer. **Experimental & molecular medicine**. v. 56, n. 3, p. 501-514, 2024.

BAHAR, M. E., KIM, H. J., & KIM, D. R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy, **Signal Transduct Target Ther**. v. 8, n. 105, 2023.

BANERJEE, D., MITTAL, S., MANDAL, R., & BASU, P. Screening technologies for cervical cancer: Overview. **Cytojournal**. v. 19, p. 23, 2022.

BARBOSA, R., ACEVEDO, L. A., & MARMORSTEIN, R. The MEK/ERK network as a therapeutic target in human cancer. **Mol Cancer Res**. v. 19, n. 3, p. 361–374, 2021.

BASU, P., MALVI, S. G., JOSHI, S., BHATLA, N., MUWONGE, R., LUCAS, E., ... & SANKARANARAYANAN, R. Vaccine efficacy against persistent human papillomavirus (HPV) 16/18 infection at 10 years after one, two, and three doses of quadrivalent HPV vaccine in girls in India: a multicentre, prospective, cohort study. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 11, p. 1518-1529, 2021.

BONAB, F. R., BAGHBANZADEH, A., GHASEMINIA, M., BOLANDI, N., MOKHTARZADEH, A., AMINI, M., ... & BAGHI, H. B. Molecular pathways in the development of HPV-induced cervical cancer. **EXCLI journal**. v. 20, n. 320, 2021.

BOSTANCI, E. İ., & ÖNEN, H. İ. Efficacy of Apoptotic Agents in Cervical Cancer Treatment. **Gazi Medical Journal**, 2025.

BRIANNA, & LEE, S. H. Chemotherapy: how to reduce its adverse effects while maintaining the potency?. **Medical Oncology**. v. 40, n. 3, p. 88, 2023.

BURMEISTER, C. A., KHAN, S. F., & PRINCE, S. Drugs and drug targets for the treatment of HPV-positive cervical cancer. **Tumour Virus Research**. v.19 e200309, 2025.

CARUSO, G., WAGAR, M. K., HSU, H. C., HOEGL, J., VALZACCHI, G. M. R., FERNANDES, A, & RAMIREZ, P. T. Cervical cancer: a new era. **International Journal of Gynecological Cancer**. v. 34, n. 12, p. 1946-1970, 2024.

CHEN, B., ZHAO, L., YANG, R., & XU, T. Advances in molecular mechanism of HPV16 E5 oncoprotein carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 745, e109716, 2023.

CHEN, Y., LI, X., YANG, M., & LIU, S. B. Research progress on morphology and mechanism of programmed cell death. **Cell death & disease**. v. 15, n. 5, p. 327, 2024.

CHOUILLI, F.; TAFENZI, H.A.; EL HATTIMY, F.; CHOUILLI, M.K.; BELBARAKA, R. Chemotherapy-related adverse effects with anthracycline and taxane-containing regimens in patients with localized breast cancer: a descriptive study. **BMC Cancer**, v. 24, n. 1, p. 17, 2024.

CHUN Yang, Fan Chun; Huang, Wei; Yang, Weihong; Liu, Jie; Ai, Guihai; Luo, Ning; Guo, Jing; Chua, Peng Teng; Cheng, Zhongping. Cervical Cancer Surgery: Current State of Affairs. **Gynecology and Minimally Invasive Therapy**. v. 10, n. 2, p. 75-83, 2021.

CUI, Mingyu; ZHANG, Yujie; LI, Xiaoyan; et al. Advances in the interrelated nature of vaginal microecology, HPV infection, and cervical lesions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, p. 1608195, 2025.

D'ORIA, O., CORRADO, G., LAGANÀ, A. S., CHIANTERA, V., VIZZA, E., & GIANNINI, A. New advances in cervical cancer: from bench to bedside. **International journal of environmental research and public health**. v. 19, n. 12, 7094, 2022.

DE SOUSA, N. F., DA SILVA SOUZA, H. D., DE MENEZES, R. P. B., DA SILVA ALVES, F., ACEVEDO, C. A. H., DE LIMA NUNES, T. A., ... & SCOTTI, M. T. Selene-Ethylenelacticamides and N-aryl-propanamides as broad-spectrum leishmanicidal agents. **Pathogens**. v. 12, n. 1, p. 136 (2023).

DE SOUSA, N. F., DE FREITAS, M. E. G., SIDRÔNIO, M. G. S., SOUZA, H. D., CZECHOT, A., PERELLÓ, M., ... & RODRIGUES-JUNIOR, V. S. Preclinical Evaluation of Selene-Ethylenelacticamides in Tuberculosis: Effects Against Active, Dormant, and Resistant Mycobacterium Tuberculosis and In Vitro Toxicity Investigation. **Microorganisms**. v. 13, n. 2, p. 396, 2025.

DEL CASTILLO BUSTO, M.E.; WARD-DEITRICH, C.; EVANS, S.O.; RAYMAN, M.P.; JAMESON, M.B.; GOENAGA-INFANTE, H. Selenium speciation studies in cancer patients to evaluate the responses of biomarkers of selenium status to different selenium compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 416, n. 11, p. 2835–2848, 2024.

DOBIASOVÁ, S.; SALARDÓN-JIMÉNEZ, N.; KINCSES, A.; NOVÉ, M.; HABIBULLAH, G.; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E. Cyano- and ketone-containing selenoesters as multi-target compounds against resistant cancers. **Cancers**, v. 13, n. 18, p. 4563, 2021.

DOS SANTOS, D. C., RAFIQUE, J., SABA, S., GRINEVICIUS, V. M., FILHO, D. W., ZAMONER, A., ... & OURIQUE, F. IP-Se-06, a Selenylated Imidazo [1, 2-a] pyridine, Modulates Intracellular Redox State and Causes Akt/mTOR/HIF-1 α and MAPK Signaling Inhibition, Promoting Antiproliferative Effect and Apoptosis in Glioblastoma Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. e3710449, 2022.

DOWNHAM, L., JAAFAR, I., ROL, M. L., NYAWIRA NYAGA, V., VALLS, J., BAENA, A., ... & ALMONTE, M. Accuracy of HPV E6/E7 oncoprotein tests to detect high-grade cervical lesions: a systematic literature review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**. v. 130, n. 4, p. 517-525, 2024.

ELEFANTOVA, K.; LAKATOS, B.; KUBICKOVA, J.; SULOVA, Z.; BREIER, A. Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in L1210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1985, 2018.

FEI J, GUO Y. MAPK/ERK Signaling in Tumorigenesis: mechanisms of growth, invasion, and angiogenesis. **EXCLI Journal**. v. 24, p. 854-879, 2025.

FERRALL, L., LIN, K. Y., RODEN, R. B., HUNG, C. F., & WU, T. C. Cervical cancer immunotherapy: facts and hopes. **Clinical Cancer Research**. v. 27, n. 18, p. 4953-4973, 2021.

FU, L., LIU, Q., SHEN, L., & WANG, Y. Proteomic study on sodium selenite-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 25(3), p.130-137, 2011.

GARBO, S., DI GIACOMO, S., ŁAŻEWSKA, D., HONKISZ-ORZECZOWSKA, E., DI SOTTO, A., FIORAVANTI, R., ... & BATTISTELLI, C. Selenium-containing agents acting on cancer-a new hope? **Pharmaceutics**. v. 15, n. 1, p.104, 2022.

GARCÍA-HERNÁNDEZ L, et al. The p38 MAPK Components and Modulators as Therapeutic Targets in Cancer. **Int J Mol Sci**. v. 23, n. 1, p. 370, 2022.

GOLDSTEIN, A.; GERSH, M.; SKOVRONSKY, G.; MOSS, C. The future of cervical cancer screening. **International Journal of Women's Health**, v. 16, p. 1715–1731, 2024.

GOULET, A.C.; CHIGBROW, M.; FRISK, P.; NELSON, M.A. Selenomethionine induces sustained ERK phosphorylation leading to cell-cycle arrest in human colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 1, p. 109–117, 2005.

GU, Y., YANG, R., ZHANG, Y., GUO, M., TAKEHIRO, K., ZHAN, M., ... & WANG, H. Molecular mechanisms and therapeutic strategies in overcoming chemotherapy resistance in cancer. **Molecular Biomedicine**. v. 6, n. 1, 2025.

GUTMANN, D. H., BOEHM, J. S., KARLSSON, E. K., PADRON, E., SESHADRI, M., WALLIS, D., & SNYDER, J. C. Precision preclinical modeling to advance cancer treatment. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 117, n. 4, p. 586-594, 2025.

HAKIM, R. U., AMIN, T., & UL ISLAM, S. B. Advances and challenges in cervical cancer: From molecular mechanisms and global epidemiology to innovative therapies and prevention strategies. **Cancer Control**. v. 32, e10732748251336415, 2025.

HANAHAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**. v.12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HARPER, D. M., PACZOS, T., RIDDER, R., & HUH, W. K. "p16/ki-67 dual stain triage of individuals positive for HPV to detect cervical precancerous lesions. **International Journal of Cancer**. v.12, p. 2257-2264, 2025.

HAZAZI, A., KHAN, F. R., ALBLOUI, F., ARIF, S., ABDULAZIZ, O., ALHOMRANI, M., ... & BINSHAYA, A. S. Signaling pathways in HPV-induced cervical cancer: Exploring the therapeutic promise of RNA modulation. **Pathology-Research and Practice**. v. 263, e155612, 2024.

HE, L., ZHANG, L., PENG, Y., & HE, Z. Selenium in cancer management: exploring the therapeutic potential. **Frontiers in Oncology**. v. 14, e1490740, 2025.

HE, L.; ZHANG, L.; PENG, Y.; HE, Z. Selenium in cancer management: exploring the therapeutic potential. **Frontiers in Oncology**, v. 14, p. 1490740, 2025.

HE, S., TIAN, B., CAO, H., WANG, M., CAI, D., WU, Y., ... & CHENG, A. CCCP inhibits DPV infection in DEF cells by attenuating DPV manipulated ROS, apoptosis, and mitochondrial stability. **Poultry Science**. v. 103, n. 4, e103446, 2024.

HENDRIKSE, C. S. E., THEELEN, P. M. M., VAN DER PLOEG, P., WESTGEEST, H. M., BOERE, I. A., THIJS, A. M. J., ... & PIEK, J. M. J. The potential of RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) signaling in ovarian carcinogenesis, 2023.

HERNÁNDEZ-SILVA, C. D., RAMÍREZ DE ARELLANO, A., PEREIRA-SUÁREZ, A. L., & RAMÍREZ-LÓPEZ, I. G. HPV and cervical cancer: molecular and immunological aspects, epidemiology and effect of vaccination in latin american women. **Viruses**. v. 16, n. 3, p. 327, 2024.

HSU, W. L., WANG, C. M., YAO, C. L., CHEN, S. C., NIEN, C. Y., SUN, Y. H., ... & LUO, Y. H. Blockage of Nrf2 and autophagy by L-selenocystine induces selective death in Nrf2-addicted colorectal cancer cells through p62-Keap-1-Nrf2 axis. **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 12, p. 1060, 2022.

HUANG, J., DENG, Y., BOAKYE, D., TIN, M. S., LOK, V., ZHANG, L., ... & NCD GLOBAL HEALTH RESEARCH GROUP. Synthesis and in vitro anticancer activities of selenium N-heterocyclic carbene compounds. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 98, n. 3, p. 435–444, 2021.

Huang, Junjie, et al. Global distribution, risk factors, and recent trends for cervical cancer: a worldwide country-level analysis. **Gynecologic oncology**. v. 164, n. 1, p. 85-92, 2022.

HUANG, S., SHENG, X., BIAN, M., YANG, Z., LU, Y., & LIU, W. Synthesis and in vitro anticancer activities of selenium N-heterocyclic carbene compounds. **Chem Biol Drug Des**. v. 98, n. 3, p. 435–444, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer de colo do útero. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/colo-do-uterio>. Acesso em: outubro de 2025.

IQBAL, M. J.; KABEER, A.; ABBAS, Z.; SIDDIQUI, H. A.; CALINA, D.; SHARIFI-RAD, J.; CHO, W. C. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 7, 2024.

JABBARI, H.; KHOSRAVI, S.; AZIMI, S. Synthesis and Evaluation of New Derivatives of Busulfan as an Anti-carcinogenic Drug against K562 Cancer Cells Using the AO/PI Method. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 16, p. e2209140, 2022.

JABBARI, Hadi; KHOSRAVI, Setareh; AZIMI, Saeid. Synthesis and Evaluation of New Derivatives of Busulfan as an Anti-carcinogenic Drug against k562 Cancer Cells Using the AO/PI Method. **The Open Medicinal Chemistry Journal**. v. 16.1, 2022.

JANISZEWSKA, J., KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M., WIERZBICKA, M., BRENNER, J. C., & GIEFING, M. HPV-driven oncogenesis-much more than the E6 and E7 oncoproteins. **Journal of Applied Genetics**. v. 66, n. 1, p. 63-71, 2025.

JÁRAY, Bálint; SCHAFF, Zoltán. The pathology of cervical cancer - molecular tests. **Magyar Onkologia**, v. 66, n. 4, p. 271–278, 2022.

JELIC, M. D., MANDIC, A. D., MARICIC, S. M., & SRDJENOVIC, B. U. Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**. v. 17, n. 1, p. 22-28, 2021.

KALYANARAMAN, B. NAC, NAC, Knockin'on Heaven's Door: interpreting the mechanism of action of N-acetylcysteine in tumor and immune cells. **Redox Biology**, v. 57, p. 102497, 2022.

KAMOLRATANAKUL, SUPITCHA, PUNNEE PITISUTTITHUM. Human papillomavirus vaccine efficacy and effectiveness against cancer. **Vaccines**. v. 12, p 1413, 2021.

KARAKAŞ, G., SERIN, S., MUMCU, A., ULU, Ö. D., ULU, A., KURUÇAY, A., ... & ERDOĞAN, A. Silver and selenium compounds of benzimidazolium salts containing fluorine substituents: synthesis, characterization, and evaluation of anticancer potentials. **Inorg Chim Acta**. p. 122833, 2025.

KATOPODIS, P., KERSLAKE, R., ZIKOPOULOS, A., BERI, N., & ANIKIN, V. "p38 β -MAPK11 and its role in female cancers." **Journal of Ovarian Research**. v. 14, n. 1, p. 84, 2021.

KAUR, RASANPREET, ALOK BHARDWAJ, SAURABH GUPTA. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. **Molecular biology reports**. v. 50, n. 11, p. 9663-9676, 2023.

KOMISSAROVA, E.V.; SAHA, S.K.; ROSSMAN, T.G. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, n. 1, p. 99–107, 2005.

KOZLOV, ANDREY V., SABZALI JAVADOV, AND NATASCHA SOMMER. Cellular ROS and antioxidants: physiological and pathological role. **Antioxidants**. v. 13, n. 5, p. 602, 2024.

LEON-GOMEZ, PAUL; ROMERO, VANESSA I. Human papillomavirus, vaginal microbiota and metagenomics: the interplay between development and progression of cervical cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1515258, 2025.

LI, Y., LIU, J., SUN, Y., HU, Y., CONG, C., CHEN, Y., & FANG, Y. Targeting p38 MAPK signaling pathway and neutrophil extracellular traps: An important anti-inflammatory mechanism of Huangqin Qingre Chubi Capsule in rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**. v. 148, e114112, 2025.

LIU, L., WANG, M., LI, X., YIN, S., & WANG, B. An overview of novel agents for cervical cancer treatment by inducing apoptosis: Emerging drugs ongoing clinical trials and preclinical studies. **Frontiers in medicine**. v. 8, e682366, 2021.

LOSSI, Laura. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. **Biochemical Journal**. v. 479, n. 3, p. 357-384, 2022.

LÜ, J.; JIANG, C.; HU, H. Selenium compounds for cancer prevention and therapy—human clinical trial considerations. **Medical Review**, 2025.

LV, C.; ZENG, Q.; QI, L.; WANG, Y.; LI, J.; SUN, H.; LI, Q.; et al. Sodium selenite induces autophagy and apoptosis in cervical cancer cells via mitochondrial ROS-activated AMPK/mTOR/FOXO3a pathway. **Antioxidants**, v. 13, n. 8, p. 1004, 2024.

MACDONALD A, FORMAN B. HeLa cells: key discoveries and the science of their immortality. **Trends Sci.** v. 21, n. 12, p. 8566–8566, 2024.

MACDONALD, A.; FORMAN, B. HeLa Cells: Key Discoveries and the Science of Their Immortality. 2024.

MACHUIK, EMMA. The Development of Therapeutic Vaccines to Treat HPV-mediated Cervical Cancers. **SFU Health Sciences Undergraduate Journal**. v. 3, 2024.

MAJTNEROVA, P., CAPEK, J., PETIRA, F., HANDL, J., & ROUSAR, T. Quantitative spectrofluorometric assay detecting nuclear condensation and fragmentation in intact cells. **Scientific reports**. v. 11, n. 1, e11921, 2021.

MATOTOKA M, MASOKO P. In vitro cytotoxicity determination: avoiding pitfalls. In: Sukumaran A, Mansour MA, editors. Cytotoxicity: Understanding **Cellular Damage and Response**. p. 31–45, 2025.

MBODI, L., MARINGA, V. D., MOROENG, M. W., BASSA, S., KAUFMANN, A. M., & DLAMINI, Z. An overview of cervical cancer, chemotherapy as treatment and chemotherapy resistance. **Strategies for Overcoming Chemotherapy Resistance in Cervical Cancer**. p. 1-16, 2024.

MISHRA, E., CHAUDHARY, E., MISHRA, S., RAWAT, V., TRIPATHI, S., RATHORIA, R., ... & RATHORIA, E. Cervical Cancer Screening Using Papanicolaou Smear and Visual Inspection With Acetic Acid and Their Correlation With Colposcopy. **Cureus**. v. 17, n. 7, 2025.

MONK, B. J., ENOMOTO, T., KAST, W. M., MCCORMACK, M., TAN, D. S., WU, X., & GONZALEZ-MARTIN, A. Integration of immunotherapy into treatment of cervical cancer: Recent data and ongoing trials. **Cancer treatment reviews**. v. 106, p. 102385, 2022.

MOON H, RO SW. MAPK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Cancers (Basel)**. v. 13, n. 13, p. 3026, 2021.

MORANA, ORNELLA, WILL WOOD, AND CHRISTOPHER D. GREGORY. The apoptosis paradox in cancer. **International journal of molecular sciences**. v. 23, n. 3, p. 1328, 2022.

MORGAN, E. L., SCARTH, J. A., PATTERSON, M. R., WASSON, C. W., HEMINGWAY, G. C., BARBA-MORENO, D., & MACDONALD, A. E6-mediated activation of JNK drives EGFR signalling to promote proliferation and viral oncoprotein expression in cervical cancer. **Cell Death & Differentiation**. v. 28, n. 5, p. 1669-1687, 2021.

MORGOS, D. T., STEFANI, C., MIRICESCU, D., GREABU, M., STANCIU, S., NICA, S., ... & NICA, R. I. Targeting PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways in gastric cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 25, n. 3, p. 1848, 2024.

MOSES, R. J., EDO, G. I., RAZOOQI, N. F., ABIOLA O, T., GAAZ, T. S., MAFE, A. N., ... & UMAR, H. The role of selenium in cancer. **Current Pharmacology Reports**. v. 11, n. 1, p. 4, 2024.

MOYER, ALLISON, KOSUKE TANAKA, EMILY H. Cheng. Apoptosis in cancer biology and therapy. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v. 20, n. 1, p. 303-328, 2025.

MUSTAFA, M., AHMAD, R., TANTRY, I. Q., AHMAD, W., SIDDIQUI, S., ALAM, M., ... & ISLAM, S. Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. **Cells**. v. 13, n. 22, p. 1838, 2024.

NGUYEN, V. T., WINTERMAN, S., PLAYE, M., BENBARA, A., ZELEK, L., PAMOUKDJIAN, F., & BOUSQUET, G. Dose-intense cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy increases survival in advanced cervical cancer: an up-to-date meta-analysis. **Cancers**. v. 14, n. 3, p. 842, 2022.

NICOLADELLI, Isabela Borghezani; SILVA, Ana Carolina; et al. Câncer de colo. In: SAÚDE DA MULHER - **Epidemiologia, Intervenções, Casos Clínicos e Políticas de Saúde** - Edição XIII. p. 102–109, 2023.

NOË, R.; INGLESE, N.; ROMANI, P.; SERAFINI, T.; PAOLI, C.; CALCIOLARI, B.; CARRER, A. Organic Selenium induces ferroptosis in pancreatic cancer cells. **Redox Biology**, v. 68, p. 102962, 2023.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Câncer cervical. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>. Acesso em agosto de 2025.

PERELMAN, A., WACHTEL, C., COHEN, M., HAUPT, S., SHAPIRO, H., & TZUR, A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death & Disease**, v. 3, n. 11, p. e430, 2012.

PLÓCINICZAK, ALICJA, EWELINA BUKOWSKA-OLECH, AND EWA WYSOCKA. The Complexity of Oxidative Stress in Human Age-Related Diseases - A Review. **Metabolites**. v. 15, n. 7, p. 479, 2025.

PUA, L. J. W., MAI, C. W., CHUNG, F. F. L., KHOO, A. S. B., LEONG, C. O., LIM, W. M., & HII, L. W. Functional roles of JNK and p38 MAPK signaling in nasopharyngeal carcinoma. **International journal of molecular sciences**. v. 23, n. 3, p. 1108, 2022.

PUMMARIN, S., MADARED, N., KAYEM, S., ORZECOWSKI, S., TEESALU, T., MOYA, S., & BOONLA, C. Different doxorubicin sensitivity across various human cancer cell lines. **Trends Sci**. v. 21, n. 12, p. 8566–8566, 2024.

QIAN, S. E., LONG, Y., TAN, G., LI, X., XIANG, B., TAO, Y., ... & ZHANG, X. Programmed cell death: molecular mechanisms, biological functions, diseases, and therapeutic targets. **MedComm**. v. 5, n. 12, e70024, 2024.

RAMOS, ALISHA, SAMIRA SADEGHI, HOSSEIN TABATABAEIAN. Battling chemoresistance in cancer: root causes and strategies to uproot them. **International journal of molecular sciences**. v. 22, n. 17, p. 9451, 2021.

RAUF, A.; KHALIL, A. A.; AWADALLAH, S.; KHAN, S.; ABU-IZNEID, T.; KAMRAN, M.; HEMEG, H. A.; MUBARAK, M. S.; KHALID, A.; WILAIRATANA, P. Reactive oxygen species in biological systems: pathways, associated diseases, and potential inhibitors-a review. **Food Science & Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 1234–1245, 2024.

ROSENDO-CHALMA, P., ANTONIO-VÉJAR, V., ORTIZ TEJEDOR, J. G., ORTIZ SEGARRA, J., VEGA CRESPO, B., & BIGONI-ORDÓÑEZ, G. D. The hallmarks of cervical cancer: molecular mechanisms induced by human papillomavirus. **Biology**. v. 13, n. 2, p. 77, 2024.

SABALE, U., REUSCHENBACH, M., TAKYAR, J., DHAWAN, A., HALL, A., VITTAL, D., ... & VALENTE, S. Epidemiological, economic and humanistic burden of cervical intraepithelial neoplasia in Europe: A systematic literature review. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**: v. 25, p. 100360, 2025.

SAINT JOHN'S CANCER INSTITUTE. Cervical Cancer: Causes, Signs & Symptoms, and Diagnosis. 2025.

SANMARTÍN, C., PLANO, D., SHARMA, A. K., & PALOP, J. A. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9649–9672, 2012.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528–537, 2000.

SARASTE, ANTTI; KARI PULKKI. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovascular research. v. 45.3, p. 528-537, 2000.

SCARTH, James A.; PATTERSON, Molly R.; MORGAN, Ethan L.; MACDONALD, Andrew. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 3, p. 001540, 2021.

SCHOFIELD, JAMES H., AND ZACHARY T. SCHAFER. Regulators mount up: the metabolic roles of apoptotic proteins. **Frontiers in cell death**. v. 2, e1223926, 2023.

SCHUBERT, M., BAUERSCHLAG, D. O., MUALLEM, M. Z., MAASS, N., & ALKATOUT, I. Challenges in the diagnosis and individualized treatment of cervical cancer. **Medicina**. v. 59, n. 5, p. 925, 2023.

SCHWARTZ, S.M. Epidemiology of cancer. **Clinical Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 140–149, 2024.

SHAABAN, S., ALTHIKRALLAH, H. A., NEGM, A., ELMAATY, A. A., & AL-KARMALAWY, A. A. Repurposed organoselenium tethered amidic acids as apoptosis inducers in melanoma cancer via P53, BAX, caspases-3, 6, 8, 9, BCL-2, MMP2, and MMP9 modulations. **RSC Advances**, v. 14, n. 26, p. 18576–18587, 2024.

SHACKEBAEI, D., HESARI, M., GORGANI, S., VAFAEIPOUR, Z., SALARAMOLI, S., & YARMOHAMMADI, F. The Role of mTOR in the Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Systematic Review. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 83, n. 1, p. 43–52, 2025.

SHARIFIAN, Kimia; SHOJA, Zabihollah; JALILVAND, Somayeh. The interplay between human papillomavirus and vaginal microbiota in cervical cancer development. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 73, 2023.

SHI, A., LIU, L., LI, S., & QI, B. "Natural products targeting the MAPK-signaling pathway in cancer: overview." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. v. 150, n. 1, p. 6, 2024.

SIKDER, M. M., LI, X., AKUMWAMI, S., & LABONY, S. A. Reactive Oxygen Species: Role in Pathophysiology, and Mechanism of Endogenous and Dietary Antioxidants during Oxidative Stress. **Chonnam Medical Journal**. v. 61, n. 1, p. 32, 2025.

SIVANDZADE, Farzane; BHALERAO, Aditya; CUCULLO, Luca. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. **Bio-protocol**, v. 9.1, e3128-e3128, 2019.

STUOPELYTĖ, R., ŽUKIENĖ, G., BREIVIENĖ, R., RUDAITIS, V., & BARTKEVIČIENĖ, D. Quality of life in cervical cancer survivors treated with concurrent chemoradiotherapy. **Medicina**. v. 59, n. 4, p. 777, 2023.

SULLIVAN, LUCAS B., NAVDEEP S. CHANDEL. "Mitochondrial reactive oxygen species and cancer." **Cancer & metabolismo**. v. 2, n. 1, p. 17, 2014.

SWAIN, MEENAKSHI. Update in pathological classification of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. **Journal of Colposcopy and Lower Genital Tract Pathology**. v. 1, n. 2, p. 56-63, 2023.

SZEMERÉDI, N., DOBIASOVÁ, S., SALARDÓN-JIMÉNEZ, N., KINCSES, A., NOVÉ, M., HABIBULLAH, G., ... & DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E. Cyano- and ketone-containing selenoesters as multi-target compounds against resistant cancers. **Cancers**. v. 13, n. 18, p. 4563, 2021.

SZNURKOWSKI, J. J., BODNAR, L., SZYLBERG, Ł., ZOŁCIAK-SIWINSKA, A., DAŃSKA-BIDZIŃSKA, A., KLASA-MAZURKIEWICZ, D., ... & SAWICKI, W. The Polish Society of Gynecological Oncology Guidelines for the diagnosis and treatment of cervical cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 15, p. 4351, 2024.

THRALL, M. J., MCCARTHY, E., MITO, J. K., RAO, J., OF THE AMERICAN, C. P. C., & OF CYTOPATHOLOGY, S. Triage options for positive high-risk HPV results from HPV-based cervical cancer screening: a review of the potential alternatives to Papanicolaou test cytology. **Journal of the American Society of Cytopathology**. v. 14, n. 1, p. 11-22, 2025.

TOMAZIU-TODOSIA ANTON, E., ANTON, G. I., SCRIPCARIU, I. S., DUMITRAȘCU, I., SCRIPCARIU, D. V., BALMUS, I. M., ... & SOCOLOV, D. G. Oxidative Stress, Inflammation, and Antioxidant Strategies in Cervical Cancer - A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 26, n. 10, p. 4961, 2025.

TOSSETTA, G.; FANTONE, S.; MARZIONI, D.; MAZZUCCHELLI, R. Role of natural and synthetic compounds in modulating NRF2/KEAP1 signaling pathway in prostate cancer. **Cancers**, v. 15, n. 11, p. 3037, 2023.

UDE A, AFI-LESLIE K, OKEKE K, OGBODO E. Trypan blue exclusion assay, neutral red, acridine orange and propidium iodide. In: Sukumaran A, Mansour MA, editors. Cytotoxicity: Understanding Cellular Damage and Response. **IntechOpen**; p. 1–15, 2022.

UDE, A., AFI-LESLIE, K., OKEKE, K., OGBODO, E. Trypan blue exclusion assay, neutral red, acridine orange and propidium iodide. **Cytotoxicity Understanding Cellular Damage and Response**. **IntechOpen**, 2022.

VITALE, I., PIETROCOLA, F., GUILBAUD, E., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., ... & PASPARAKIS, M. Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023. **Cell Death & Differentiation**. v. 30, n. 5, p. 1097-1154, 2023.

VOLKOVA, LARISA V., ALEXANDER I. PASHOV, NADEZHDA N. Omelchuk. Cervical carcinoma: oncobiology and biomarkers. **International journal of molecular sciences**, v. 22, p. 12571, 2021.

WAGHE, TEJAL, NEEMA ACHARYA, AND TEJAL WAGHE JR. Advancements in the management of cervical intraepithelial neoplasia: A comprehensive review. **Cureus**. v. 16, n. 4, 2024.

WANG, C., CHENG, T., LU, Q., LI, W., LIU, B., YUE, L., ... & PAN, X. Oxygen therapy accelerates apoptosis induced by selenium compounds via regulating Nrf2/MAPK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. **Pharmacological Research**, v. 187, p. 106624, 2023.

WANG, Minmin; HUANG, Kepei; ZHENG, Zhi-Jie; WONG, M. C. S.; JIN, Y.; ZHENG, Zhi-Jie. Global cervical cancer incidence by histological subtype and implications for screening methods. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 14, n. 1, p. 94–101, 2024.

WANG, S., GUO, S., GUO, J., DU, Q., WU, C., WU, Y., & ZHANG, Y. Cell death pathways: molecular mechanisms and therapeutic targets for cancer. **MedComm**. v. 5, n. 9, e693, 2024.

WANG, Y., LIU, C., FANG, C., PENG, Q., QIN, W., YAN, X., & ZHANG, K. Engineered Cancer Nanovaccines: A New Frontier in Cancer Therapy. **Nano-Micro Letters**, v. 17, n. 1, p. 30, 2025.

WŁOSZEK, E., KRUPA, K., SKROK, E., BUDZIK, M. P., DEPTAŁA, A., & BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, A. HPV and Cervical Cancer—Biology, Prevention, and Treatment Updates. **Current Oncology**. v. 32, n. 3, p. 122, 2025.

XIA, Y., SUN, M., HUANG, H., & JIN, W. L. Drug repurposing for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, p. 92, 2024.

YAN, Y., DAI, T., GUO, M., ZHAO, X., CHEN, C., ZHOU, Y., ... & ZHAO, J. A review of non-classical MAPK family member, MAPK4: A pivotal player in cancer development and therapeutic intervention. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 271, e132686, 2024.

YOSHIDA, H.; SHIRAISHI, K.; KATO, T. Molecular pathology of human papilloma virus-negative cervical cancers. **Cancers**, v. 13, p. 6351, 2021.

YU, Y. H., TANG, Z. M., XIONG, C., WU, F. F., ZHAO, J. R., & ZHAO, X. H. Enhanced growth inhibition and apoptosis induction in human colon carcinoma HT-29 cells of soluble longan polysaccharides with a covalent chemical selenylation. *Nutrients*. v. 14, n. 9, p1710, 2022.

YUAN, Y.; LI, Y.; DENG, Q.; YANG, J.; ZHANG, J. Selenadiazole-induced HeLa cell apoptosis through the redox oxygen species-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. **ACS Omega**, v. 9, n. 19, p. 20919–20926, 2024.

ZHANG, et al. *Synthesis and antitumor activity of a novel selenadiazole analog of combretastatin A-4 inducing apoptosis in HeLa and HT-1080 cells*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 22(17), p. 5001–5012, 2015.

ZHANG, S., WANG, H., LIU, Y., TAO, T., ZENG, Z., ZHOU, Y., & WANG, M. Nocardia rubra cell-wall skeleton influences the development of cervical carcinoma by promoting the antitumor effect of macrophages and dendritic cells. **Cancer Medicine**. v. 11, n. 5, p. 1249-1268, 2022.

ZHANG, Y., QIU, K., REN, J., ZHAO, Y., & CHENG, P. Roles of human papillomavirus in cancers: oncogenic mechanisms and clinical use. *Signal transduction and targeted therapy*. v. 10, n. 1, p. 44, 2025.

ZHENG, L. L., CHEN, S. F., YANG, F., WANG, W. H., XU, C., & ZHENG, L. Y. High-risk HPV prevalence and genotype distribution among women in Liaocheng, Shandong Province, China from 2016 to 2022. *Frontiers in Public Health*, v. 11, p. 1145396, 2023.

ZHENG, Q., LI, S., WANG, A., ZHE, M., YANG, P., WU, Y., ... & OUYANG, L. p38 mitogen-activated protein kinase: Functions and targeted therapy in diseases. **MedComm–Oncology**. v. 2, n. 3, e53, 2023.