

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

PAULO BRUNO ARAÚJO LOUREIRO

**Efeito citotóxico do composto de selênio *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-
etilenolactamida em linhagem de câncer do colo do útero**

**João Pessoa, PB
2025**

Paulo Bruno Araújo Loureiro

Efeito citotóxico do composto de selênio *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida em linhagem 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

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Carlos Ferreira

João Pessoa, PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L892e Loureiro, Paulo Bruno Araujo.

Efeito citotóxico do composto de selênio
N-(4-metilfenil)benzoselênio-etilenolactamida em
linhagem de câncer do colo do útero / Paulo Bruno
Araujo Loureiro. - João Pessoa, 2025.
109 f. : il.

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

1. Câncer do colo do útero. 2. Estresse oxidativo.
3. Apoptose. 4. Linhagem HeLa. 5. Papiloma vírus humano
- HPV. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Ferreira, Rafael
Carlos. III. Título.

UFPB/BC

CDU 618.14-006(043)



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



Ata da 521ª (quingentésima vigésima primeira) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Paulo Bruno Araujo Loureiro**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às nove horas (09h00) do dia vinte e sete de agosto do ano de dois mil e vinte e cinco (27/08/2025), 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 **Paulo Bruno Araujo Loureiro**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Giciane Carvalho Vieira, Ph.D em Farmacologia; Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Ph.D em Farmacologia, Rafael Carlos Ferreira, Ph.D em Farmacologia e Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia. Sendo o penúltimo, docente do Centro Universitário Maurício de Nassau 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) **Paulo Bruno Araujo Loureiro**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**Efeito citotóxico do composto de selênio N-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida em linhagem 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) **Paulo Bruno Araujo Loureiro** 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)

Documento assinado digitalmente
MARIANNA VIEIRA SOBRAL
Data: 04/09/2025 17:59:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Carlos Ferreira (Coorientador)

Documento assinado digitalmente
RAFAEL CARLOS FERREIRA
Data: 03/09/2025 13:41:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Giciane Carvalho Vieira (Examinadora)

Documento assinado digitalmente
GICIANE CARVALHO VIEIRA
Data: 03/09/2025 12:33:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra (Examinador)

Documento assinado digitalmente
FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA
Data: 02/09/2025 21:30:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Paulo Bruno Araujo Loureiro (Discente)

Documento assinado digitalmente
PAULO BRUNO ARAUJO LOUREIRO
Data: 13/10/2025 20:50:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

À Maria José Ferreira de Lima Peixe, *in memoriam*, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu Anjo da Guarda, meus portos seguros, que me fizeram ter forças nos momentos mais difíceis e me fizeram (e fazem) enxergar a luz em meio à escuridão.

À minha família, pelo apoio e incentivo diários, fazendo-me acreditar que sou capaz.

À minha avó, dona Liete, por nunca me deixar desistir da educação. Sempre foi um dos seus pilares de criação. Te amo demais, vó!

À minha tia Ana Tarcila, por viabilizar este sonho, me ajudando, aconselhando, puxando a orelha... sei que os seus conselhos sempre querem o melhor de mim. Te tenho como inspiração de força e resiliência.

À minha querida mãe, Elizangela Bezerra de Araújo, uma pessoa de coração enorme, humilde e solidária. Obrigado por me fazer acreditar nos meus sonhos e por me incentivar a segui-los. O seu colo sempre me reconfortou e me fez sentir, novamente, o Paulo Bruno criança.

À minha querida tia Magda Cinara, pelas palavras de apoio, confiança e incentivo.

Amo muito vocês!

À Maria José, carinhosamente chamada de Marisa, minha tia que lutou bravamente contra o câncer de colo do útero e que é a inspiração desta dedicatória, sempre permanecerá viva em nossas memórias como uma pessoa cheia de vida e amor.

Ao meu namorado, Luan Leal do Nascimento, por ser meu porto seguro, meu companheiro nas madrugadas em claro. Obrigado pelos abraços, pela comida quentinha levada ao meu quarto nas horas de estudo, por se dedicar 100% à nossa família. Obrigado por cuidar tão bem do Olavo, Otávio, Otto, Oliver e Mário Bruno; pela compreensão nos momentos de ausência, pela confiança depositada em mim e pelo amor incontestável. Te amo!

À minha orientadora, Marianna Vieira Sobral, um amor tão puro e singelo, de aluno para professora. Obrigado por pegar na minha mão e me ensinar o que é a pesquisa; por abrir as portas do laboratório ONCOFAR; por ter me permitido viver a ciência e por me dar a oportunidade de conhecer pessoas tão maravilhosas.

Obrigado por fazer parte da minha história - todos os ensinamentos ficarão guardados em minha memória. Obrigado pela confiança depositada para a realização deste trabalho e por me receber de braços abertos, sendo reconhecido como seu “filho científico”.

Ao meu coorientador, Rafael Carlos, pelos momentos de ensino, descontração e apoio. Sua participação foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Felipe Guerra e Profa. Dra. Adriana Golzio e os suplentes Prof. Ricardo e Profa. Giciane, que aceitaram o convite para avaliar, acrescentar e contribuir para que este trabalho se tornasse ainda melhor, e por concordarem em eternizar este momento de obtenção de título.

À equipe maravilhosa do ONCOFAR - Ana Paula, Sâmia Duarte, Prof. Juan Carlos, Rafael Carlos, Mariana Dantas, Ramon Marques, Moisés Wanderley, Karinne, Isione Oliveira, Isabela Cristina, Júnior Abreu, Heivila, Erika Raisla, Pablo, Patricianny, Geovana, Gabriela, Victor Hugo - pelos diversos momentos que viabilizaram e tornaram possível a realização deste trabalho.

À Ana Paula, pelas conversas matinais, momentos de descontração, desabafos, conselhos e solidariedade. Obrigado por ter segurado a minha mão e dito: “Vai dar certo!”. Meus sinceros agradecimentos, Ana.

Ao meu amigo querido, Igor Gabriel, por me fazer das tardes as horas mais divertidas e descontraídas.

Aos meus amigos Karinne Gadelha, Ramon Marques, Moisés Wanderley e Geovana Guedes - o que seria deste mestrado sem o grupo carinhosamente chamado “Casa Pio”? Foram momentos de pura tensão nesses anos, mas também de apoio emocional, paciência, conhecimento compartilhado e amizade verdadeira. Obrigado por dividirem o melhor de vocês.

Às minhas amigas Allessya Lara, Maria Beatriz, Rebeca Carneiro e Ana Luiza de Sá, por terem sido tão presentes e por me consolarem nos momentos de desespero. O apoio de vocês tornou essa jornada mais leve e me deu autoconfiança para não desistir. Vocês são as melhores pessoas!

Aos meus professores, técnicos e auxiliares da pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, que contribuíram para consolidar e edificar meu processo educacional.

Aos meus amigos Thullyo Miranda, Bárbara Maia, Caio Vitor e Moyses Araújo,

pelos encontros aos finais de semana que tornaram essa jornada mais leve. Foram diversas conversas que estreitaram nossos laços e nos fizeram amigos de vida.

À minha querida e grande amiga-irmã, Laura Margueritte, que esteve ao meu lado desde a graduação até esta fase como pós-graduando. Sempre me incentivando, animando, compartilhando risos nos momentos leves e oferecendo apoio nos momentos difíceis, todos superados sem jamais soltar sua mão.

Aos meus amigos Diego Amorim, Rafael Almeida e Thalys Vanuk, pelo suporte emocional, pela assistência e pelos momentos divertidos fora da universidade, tornando tudo mais leve.

Às minhas queridas irmãs de coração Luma Moura, Karolayne Larissa e Lorena Rafaella, por terem sido presentes, mesmo que distantes.

Agradeço ao povo brasileiro pelo apoio à ciência e à educação, que tornam possível a realização de pesquisas como esta, mesmo em tempos em que a ciência foi desacreditada e tratada como algo banal. Ainda assim, seguimos esperançosos por um país que valorize o conhecimento e invista, de forma contínua, em educação, pesquisa e transformação social.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por ter sido minha segunda casa ao longo da graduação e da pós-graduação, sendo espaço de aprendizado, crescimento e transformação.

À CAPES, pela importante contribuição por meio do apoio financeiro, essencial para a continuidade deste trabalho.

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

“Com certeza um dia irei morrer, seja de câncer ou de qualquer outra coisa. Não faço a menor ideia como e quando isso vai acontecer. Mas podem ter certeza que no dia em que a morte chegar perto de mim, eu vou olhar para ela e ela vai me encontrar muito, muito, muito viva: minha existência vai “provar que existe vida antes da morte”. E eu irei embora, a contragosto, mas tenham certeza que terei vivido uma vida plena. Isso é o que importa”

Valéria Dias

Paciente acometida por câncer de colo do útero

LOUREIRO, P. B. A. **Efeito citotóxico do composto de selênio N-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida em linhagem de câncer de colo de útero.** 2025. 110 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer de colo do útero é um dos principais tumores malignos que afetam mulheres, estando fortemente associado à infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV). Apesar dos avanços no rastreamento e no tratamento, as terapias disponíveis apresentam limitações relacionadas à toxicidade e à resistência tumoral, o que reforça a necessidade de novas alternativas terapêuticas. O composto N-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) tem se destacado por seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos leishmanicida e antimicrobiano, além de apresentar baixa toxicidade em modelos experimentais. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito citotóxico e o tipo de morte celular induzido pelo composto SeB2 em células da linhagem HeLa. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT nas linhagens tumorais SK-MEL-28, HeLa, HCT-116 e MCF-7, e na linhagem não tumoral HEK293. A CI_{50} foi de $5,03 \pm 0,32 \mu\text{M}$ para HeLa e de $30,22 \pm 2,70 \mu\text{M}$ para HEK293. Com base nesses valores, o índice de seletividade (IS) indicou que o SeB2 foi seis vezes mais seletivo para HeLa do que para as demais linhagens testadas. O tipo de morte celular foi determinado pelo ensaio de laranja de acridina e iodeto de propídeo por microscopia confocal, revelando aumento significativo na porcentagem de células em apoptose inicial ($2,5 \mu\text{M}$: $86,23 \pm 3,56\%$; $5,0 \mu\text{M}$: $78,34 \pm 8,77\%$; $10 \mu\text{M}$: $35,62 \pm 8,06\%$; $p < 0,05$ para todos) e em apoptose tardia/necrose ($10 \mu\text{M}$: $64,38 \pm 8,06\%$; $p < 0,05$), além de alterações morfológicas como *blebs* de membrana, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, características típicas de apoptose. O ensaio com Hoechst 34580 confirmou esses achados, com aumento significativo da fluorescência em $85 \pm 7,16\%$ e $153 \pm 6,01\%$ nas concentrações de 5 e 10 μM , respectivamente. Avaliou-se também se a apoptose estava associada à alteração do potencial de membrana mitocondrial, observando-se redução significativa na razão de fluorescência JC-1 agregado/monômero, que passou de 2,01 no controle para 0,27 e 0,22 nas concentrações de 5 e 10 μM , respectivamente ($p < 0,05$). Para investigar se essa alteração estava relacionada ao estresse oxidativo, foi realizado pré-tratamento com N-acetilcisteína (NAC, 5 mM), que preveniu significativamente o efeito citotóxico do SeB2 ($5 \mu\text{M}$: $100,60 \pm 2,9\%$; $10 \mu\text{M}$: $88,71 \pm 2,28\%$; $p < 0,05$ para ambos), sugerindo um efeito oxidante do composto em células HeLa. Por fim, avaliou-se o envolvimento das vias MAPK utilizando inibidores de MEK/ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) e p38 MAPK (PD169316) pelo ensaio de MTT, sendo observado que a combinação do inibidor de JNK e o SeB2 reduziu significativamente a viabilidade celular para $31,63 \pm 2,93\%$ ($p < 0,05$), indicando que o composto potencializou a citotoxicidade na presença do inibidor de JNK. Conclui-se que o SeB2 apresenta potencial como agente antitumoral contra o câncer de colo do útero, sendo promissor para estudos não clínicos.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Apoptose; Linhagem HeLa; MAPK.

LOUREIRO, P. B. A. **Cytotoxic effect of the selenium compound N-(4-methylphenyl)benzoseleno-ethylenolactamide on a cervical cancer cell line.** 2025. 110 p. **Dissertation** (Master's in Natural and Synthetic Bioactive Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the main malignant tumors affecting women and is strongly associated with persistent infection by the human papillomavirus (HPV). Despite advances in screening and treatment, available therapies still present limitations related to toxicity and tumor resistance, reinforcing the need for new therapeutic alternatives. The compound N-(4-methylphenyl)benzoseleno-ethylenolactamide (SeB2) has drawn attention due to its broad spectrum of biological activities, including leishmanicidal and antimicrobial effects, as well as its low toxicity in experimental models. In this context, the aim of this study was to investigate the cytotoxic effect and type of cell death induced by SeB2 in HeLa cells. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay in the tumor cell lines SK-MEL-28, HeLa, HCT-116, and MCF-7, and in the non-tumor cell line HEK293. The IC_{50} values were $5.03 \pm 0.32 \mu\text{M}$ for HeLa and $30.22 \pm 2.70 \mu\text{M}$ for HEK293. Based on these results, the selectivity index (SI) indicated that SeB2 was six times more selective for HeLa cells than for the other tested cell lines. The type of cell death was determined by acridine orange/propidium iodide staining under confocal microscopy, revealing a significant increase in the percentage of cells in early apoptosis (2.5 μM : $86.23 \pm 3.56\%$; 5.0 μM : $78.34 \pm 8.77\%$; 10 μM : $35.62 \pm 8.06\%$; $p < 0.05$ for all) and in late apoptosis/necrosis (10 μM : $64.38 \pm 8.06\%$; $p < 0.05$), along with morphological changes such as membrane blebbing, chromatin condensation, and nuclear fragmentation, typical features of apoptosis. The Hoechst 34580 assay confirmed these findings, showing a significant increase in fluorescence of $85 \pm 7.16\%$ and $153 \pm 6.01\%$ at 5 and 10 μM , respectively. The involvement of the mitochondrial membrane potential was also evaluated, revealing a significant decrease in the JC-1 aggregate/monomer fluorescence ratio, from 2.01 in the control to 0.27 and 0.22 at 5 and 10 μM , respectively ($p < 0.05$). To determine whether apoptosis was associated with oxidative stress, cells were pre-treated with N-acetylcysteine (NAC, 5 mM), which significantly prevented the cytotoxic effect of SeB2 (5 μM : $100.60 \pm 2.9\%$; 10 μM : $88.71 \pm 2.28\%$; $p < 0.05$ for both), suggesting an oxidative mechanism of SeB2 in HeLa cells. Finally, the involvement of the MAPK pathways was evaluated using inhibitors of MEK/ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125), and p38 MAPK (PD169316) through the MTT assay. The combination of the JNK inhibitor with SeB2 significantly reduced cell viability to $31.63 \pm 2.93\%$ ($p < 0.05$), indicating that SeB2 enhanced cytotoxicity in the presence of JNK inhibition. In conclusion, SeB2 exhibits potential as an antitumor agent against cervical cancer, representing a promising candidate for further preclinical studies.

Keywords: Oxidative stress; Apoptosis; HeLa cell line; MAPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do colo do útero.....	25
Figura 2. Estágios do desenvolvimento da infecção pelo HPV levando ao aparecimento de câncer cervical.....	27
Figura 3. Representação espacial das taxas estimadas de incidência por neoplasia maligna do colo do útero, ajustadas por idade pela população mundial, por 100 mil mulheres, para cada ano do triênio 2023-2025, segundo Unidade da Federação....	30
Figura 4. Mecanismo pelo qual o HPV interrompe processos celulares críticos para promover o desenvolvimento do câncer por meio de suas oncoproteínas virais E6 e E7.....	33
Figura 5. Marcas moleculares propostas para a carcinogênese cervical. Todos esses marcadores desempenhariam um papel importante no desenvolvimento do câncer de colo do útero.....	36
Figura 6. Visão geral da resistência ao tratamento com cisplatina.....	39
Figura 7. Esquema da via de sinalização da apoptose	42
Figura 8. Sinalização celular induzida por ROS no câncer.....	45
Figura 9. Esquema do sistema de fosforilação da família MAPK	47
Figura 10. Estrutura molecular do N-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2)	56
Figura 11. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) em células HeLa (câncer de colo do útero) incubadas com o N-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorrubicina.....	73
Figura 12. Imagens representativas de alterações celulares observadas na avaliação de apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) em células HeLa (câncer de colo do útero) incubadas com N-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorrubicina (DXR) após 24h de tratamento	74
Figura 13. Indução de apoptose pelo N-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou pela doxorrubicina (DXR), analisada por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células HeLa (câncer de colo do útero) após 24 h de tratamento	75

Figura 14. Imagens representativas de células HeLa (câncer de colo do útero) tratadas com N-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) por 24 h e marcadas com Hoechst 34580.....	76
Figura 15. Indução de apoptose pelo N-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) analisada por marcação com Hoechst 34580 em células HeLa (câncer de colo do útero) após 24 h de tratamento	77
Figura 16. Imagens representativas da fluorescência do JC-1 em células HeLa (câncer de colo do útero) incubadas com N-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) por 24 h.....	78
Figura 17. Razão de fluorescência agregado/monômero de N-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida SeB2 ou doxorubicina (DXR) após 24 h de tratamento pelo ensaio de JC-1 em células HeLa (câncer de colo do útero)	79
Figura 18. Viabilidade celular (%) após tratamento de 72 h em células HeLa (câncer de colo do útero) com N-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida SeB2 ou doxorubicina (DXR) na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) avaliado pelo ensaio do MTT	80
Figura 19. Efeito do N-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR), na presença ou ausência de inibidores de MEK/ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD 169316), sobre a viabilidade de células em células HeLa (câncer de colo do útero) após 72 h de tratamento	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estadiamento do câncer do colo do útero	28
Quadro 2. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade do *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento avaliado pelo ensaio do MTT71

Tabela 2. Citotoxicidade do *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) em células de colo uterino (HeLa) após 24, 48 e 72 h de tratamento avaliado pelo ensaio do MTT72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluororacil
ADC	Adenocarcinomas
AIF	Fator indutor de apoptose
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ANOVA	Análise de Variância
ARID1A	Proteína 1A contendo domínio interativo rico em AT
ATF	Fator de Transcrição ativador 2
CASP8	Caspase 8
CAT	Catalase
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CCU	Câncer do colo do útero
CEC	Carcinomas de células escamosas
Cl₅₀	Concentração que inibe 50% das células
D/CDK4/6	Ciclina do tipo D associadas às quinases dependentes de ciclina 4 e 6
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido dextribonucleico
DQ	Departamento de Química
DXR	Doxorrubicina
E2F	Fatores E2 de transcrição 1 a 8
E6AP	Proteína associada à E6 com atividade de ubiquitina ligase tipo E3
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
ERK	Cinase Regulada por sinal Extracelular
ERKp	ERK fosforilada
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GPx	Glutathione peroxidase

Grb2	Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento
GSH	Glutathione
HDACs	Histonas desacetilases
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana
IARC	International Agency for Research of Cancer
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do câncer
IP	Iodeto de Propídeo
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de Seletividade
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
JNK	c-Jun N-terminal Cinases
KRAS	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
LA	Laranja de Acridina
LPBS	Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica
LSIL	Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau
MAPK	Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos
mTOR	Proteína alvo de rapamicina em mamíferos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
	difeniltetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
NIC	Neoplasias intraepiteliais cervicais
NRAS	Homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma
OMS	Organização Mundial da Saúde
OncoFar	Laboratório de OncoFarmacologia
p16^{INK4A}	Proteína inibidora de quinases dependentes de ciclina 4 e 6, codificada pelo gene CDKN2A
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PKD	Proteína Cinase D
PPgPNSB	Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina
PUMA	Proteína moduladora da apoptose regulado positivamente por p53
RB1	Proteína do retinoblastoma
RE	Retículo endoplasmático
RFE	Radioterapia de Feixe Externo
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTKs	Receptores tirosina quinase
SAPK	Proteína Cinase ativada por estresse
SBCO	Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Se	Selênio
SeB2	<i>N</i> -(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida
SOD	Superóxido dismutase
SOS	<i>Son of sevenless</i>
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
Thr	Treonina
TILs	Terapias com linfócitos infiltrantes de tumor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TP53	Proteína tumoral p53
TrxR	Tiorredoxina redutase
Tyr	Tirosina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1 Câncer do colo do útero: conceito, características gerais e tratamento ...	25
2.2 Apoptose.....	39
2.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	43
2.4 Vias de sinalização intracelulares das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)	46
2.4.1 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer.....	48
2.4.2 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer	50
2.4.3 Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer	51
2.4 Compostos de selênio e o SeB2	53
3 OBJETIVOS	59
3.1 Objetivos gerais.....	59
3.2 Objetivos específicos	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1 Local da pesquisa	61
4.2 Material.....	61
4.2.1 Amostra teste	61
4.2.2 Substâncias e reagentes	62
4.2.3 Equipamentos.....	62
4.2.4 Linhagens celulares tumorais e não tumoral humanas	63
4.3 Métodos	64
4.3.1 Preparo da amostra.....	64
4.3.2 Avaliação da citotoxicidade do SeB2 em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)	64
4.3.3 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo SeB2	65

4.3.6 Análise estatística.....	68
5 RESULTADOS	70
5.1 Citotoxicidade do SeB2 em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas	70
5.2 SeB2 induz morte celular por apoptose pela via intrínseca	72
5.2.1 Marcação de células HeLa com laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	72
5.2.2 Marcação de células HeLa com Hoechst 34580	75
5.2.4 Citotoxicidade do SeB2 é dependente de estresse oxidativo	79
5.2.5 Efeito do SeB2 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs).....	80
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	93
8 REFERÊNCIAS	95

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo complexo de doenças caracterizado pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células anormais (Perez-Fidalgo, 2020). A aquisição dessas características malignas decorre de mutações genéticas desencadeadas por fatores ambientais, como a fumaça do tabaco, produtos químicos e radiação ultravioleta, modificações epigenéticas ou ainda por mutações hereditárias, alterações nos níveis hormonais e disfunções imunológicas (Davies *et al.*, 2023; Bhat *et al.* 2024). Esses eventos conferem às células transformadas vantagens relacionadas à sobrevivência, proliferação, evasão dos mecanismos de morte celular programada e metastase (Hanahan, 2022).

Dados epidemiológicos indicam que, em 2022, foram registrados cerca de 20 milhões de novos casos de câncer no mundo, incluindo os cânceres de pele não melanoma, e aproximadamente 9,7 milhões de mortes pela doença, consolidando o câncer como a segunda principal causa de morte global (Bray *et al.*, 2024). Entre as mulheres, o câncer do colo do útero (CCU) foi o quarto tipo mais comum, com cerca de 660 mil novos casos e 350 mil óbitos no mesmo ano (OMS, 2024).

No Brasil, a incidência de câncer segue em crescimento. A estimativa para o triênio 2023-2025 é de 704 mil novos casos anuais, sendo 483 mil excluindo os cânceres de pele não melanoma (INCA, 2023). O CCU é o terceiro câncer mais incidente entre as mulheres brasileiras, com previsão de 17.010 novos casos por ano no triênio, correspondendo a uma taxa bruta de incidência de 15,38 por 100 mil mulheres (INCA, 2025).

O CCU pode se desenvolver com ou sem a presença da infecção pelo papilomavírus humano (HPV), embora esta seja a principal causa associada ao seu surgimento (Yu; Majerciak; Zheng; 2022). A vacinação contra o HPV é uma medida eficaz na prevenção da infecção e, consequentemente, na redução da incidência do CCU. O tratamento primário com intenção curativa, independentemente da presença de infecção, geralmente envolve cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou a combinação dessas abordagens, a depender do tipo do tumor, do estágio da doença e das condições clínicas do paciente (Abu-Rustum *et al.*, 2023).

Entre os quimioterápicos de primeira linha utilizados no tratamento do câncer do colo do útero (CCU), destacam-se o paclitaxel, a cisplatina e o topotecano. Apesar de sua eficácia, esses agentes estão associados a efeitos adversos significativos,

como mielossupressão, neuropatia periférica, alopecia e distúrbios gastrointestinais (Ferro et al., 2023). Outro desafio relevante no tratamento é a resistência das células tumorais aos quimioterápicos, que pode ocorrer por diversos mecanismos, incluindo metilação do DNA, ativação de vias de reparo do DNA, transição epitelial-mesenquimal, ativação de células-tronco cancerígenas, inibição da via apoptótica e alterações no microambiente tumoral (George et al., 2022).

Diante dessas limitações terapêuticas, cresce o interesse na investigação de produtos naturais e sintéticos com atividade antitumoral, com o objetivo de ampliar o arsenal terapêutico e oferecer alternativas mais seguras e eficazes para o tratamento do câncer cervical. Entre os elementos químicos de destaque nesse contexto está o selênio, pertencente ao grupo dos calcogênios, cuja relevância decorre de suas propriedades biológicas amplamente descritas. Esse elemento é capaz de modular processos oxidativos, induzir apoptose e inibir a angiogênese, mecanismos fundamentais no controle da progressão tumoral, o que justifica seu potencial como candidato para o desenvolvimento de novas terapias oncológicas (Lenardão et al., 2018; Ali et al., 2021).

Nessa perspectiva, a *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida, uma lactamida contendo selênio sintetizada a partir de ácidos orgânicos inspirados em produtos naturais, tem se destacado por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas. Estudos anteriores demonstraram sua expressiva atividade leishmanicida, aliada a um bom perfil preditivo de absorção oral e baixa toxicidade em modelos computacionais (Sousa et al., 2023). Além disso, a molécula mostrou atividade relevante frente ao modelo de *Mycobacterium tuberculosis* sob restrição nutricional, sem apresentar efeito citotóxico sobre a linhagem celular HepG2, sugerindo um perfil de segurança favorável (Sousa et al., 2025).

Considerando os elevados índices de incidência e mortalidade do CCU, aliados à limitada eficácia terapêutica dos fármacos atualmente disponíveis na prática clínica, e ao fato de o câncer permanecer um desafio prioritário de saúde pública em escala global, o presente estudo propôs-se a investigar o efeito antitumoral e o perfil de toxicidade da *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) em células tumorais e não tumoral humanas. Trata-se de uma molécula inédita, ainda pouco explorada na literatura científica, cuja estrutura incorpora selênio, elemento bioativo associado a mecanismos celulares relevantes no estudo *in vitro*, conferindo-lhe potencial promissor no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

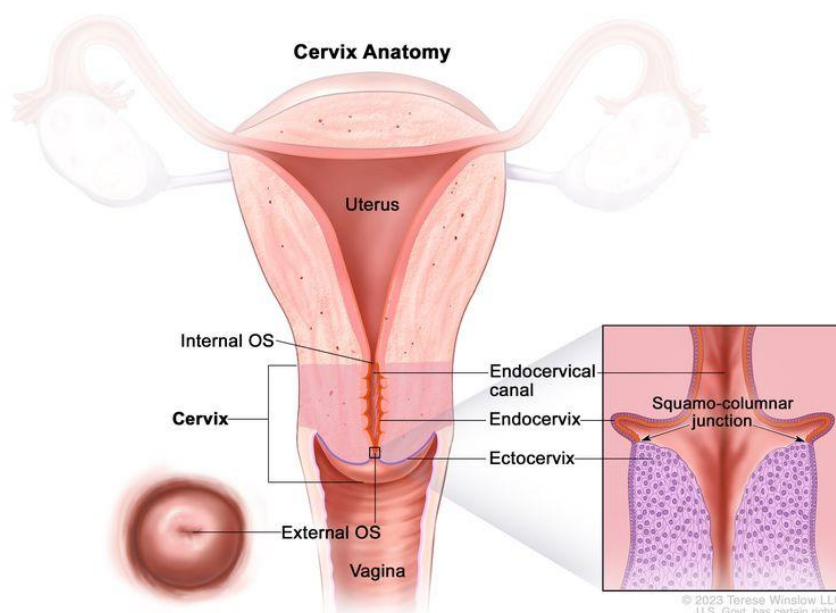
Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer do colo do útero: conceito, características gerais e tratamento

O câncer do colo do útero (CCU), também conhecido como câncer cervical, é caracterizado pela replicação desordenada de células epiteliais do órgão que se localiza na extremidade inferior e estreita que conecta o útero à vagina (canal de parto; figura 1). Este tipo de câncer pode se espalhar pela invasão direta no corpo do útero, vagina e paramétrio ou para locais distantes (Hakim; Amin; UI Islam, 2025).

Figura 1. Anatomia do colo do útero.



Legenda: O colo do útero é a parte inferior e estreita do útero que o conecta à vagina. Ele é composto pelo orifício interno (a abertura entre o colo do útero e a parte superior do útero), o endocérvis (a parte interna do colo que forma o canal endocervical), o ectocérvis (a parte externa do colo que se abre na vagina) e o orifício externo (a abertura entre o colo do útero e a vagina). A região onde o endocérvis e o ectocérvis se encontram é chamada de junção escamocolumnar, que contém tanto células glandulares (células em forma de coluna que produzem muco) provenientes do endocérvis, quanto células escamosas (células finas e achatadas) provenientes do ectocérvis. A junção escamocolumnar também é frequentemente chamada de zona de transformação.

Fonte: *National Cancer Institute* (2023).

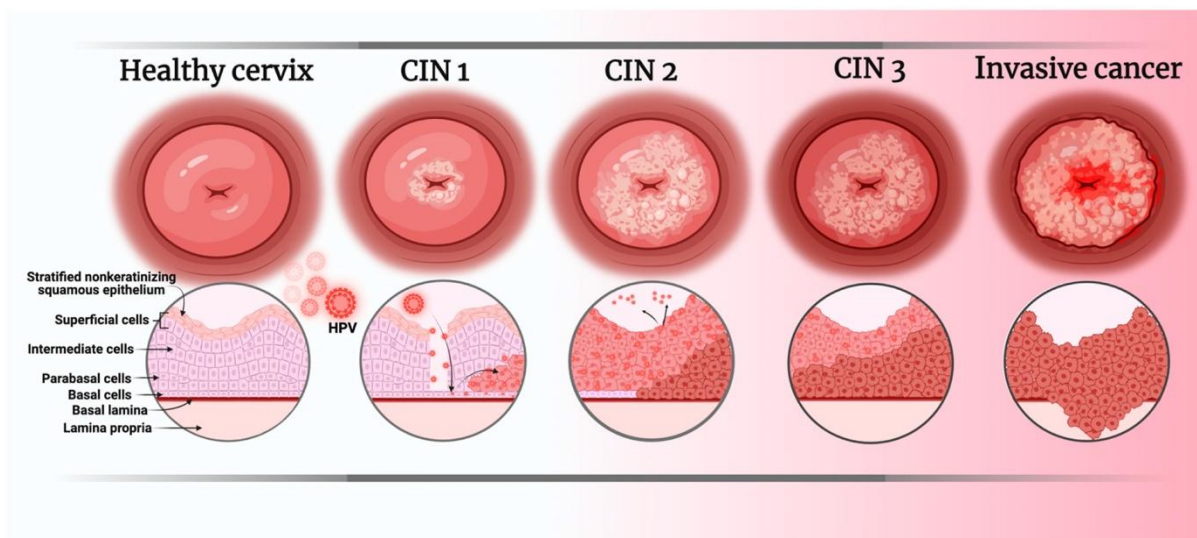
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020), o CCU pode ser classificado histologicamente em três principais grupos de tumores epiteliais: carcinomas de células escamosas (CEC), adenocarcinomas (ADC) e outros tumores epiteliais menos frequentes (IARC, 2020). Entre eles, o CEC é o subtipo mais prevalente, cerca de 80 a 85% dos casos, e está fortemente associado à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (MSD Manual, 2024). Já os ADCs, embora também

possam estar relacionados ao HPV, apresentam uma maior heterogeneidade morfológica e etiológica (Casey *et al.*, 2015; Höhn *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os ADCs passaram a ser subdivididos em dois grandes grupos: os ADCs associados ao HPV (HPV-associado ADCs - HA-ADCs), que incluem o tipo usual e variantes mucinosas, como os de células intestinais, células em anel de sinete e os de produção de mucina estratificada; e os ADCs independentes do HPV (HPV-independente ADCs - HI-ADCs), que englobam subtipos como o gástrico, de células claras, mesonéfrico e endometrióide (Park, 2020). Entre essas variantes, o adenocarcinoma *in situ* (AIS) também é considerado uma lesão glandular pré-invasiva, geralmente associada ao HPV. Então, enquanto os CECs são quase totalmente relacionados ao HPV, a proporção de ADCs com associação viral significativa é menor (Schaafsma *et al.*, 2025).

Esses tumores malignos surgem de um processo gradual de transformação neoplásica que pode durar anos. Essa progressão normalmente começa com a infecção persistente por tipos oncogênicos do HPV e evolui para lesões precursoras, que acometem o epitélio cervical sem invadir a membrana basal. Essas lesões são denominadas Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) e refletem distintos graus de displasia epitelial: **NIC I**: displasia leve, com alterações celulares restritas a um terço basal do epitélio; **NIC II**: displasia moderada, envolvendo até dois terços da espessura epitelial; **NIC III**: displasia grave ou carcinoma *in situ*, comprometendo toda a espessura epitelial, porém sem evidência de invasão estromal (Figura 2) (INCA, 2016).

Figura 2. Estágios do desenvolvimento da infecção pelo HPV levando ao aparecimento de câncer cervical



Evolução do câncer de colo do útero: da mucosa cervical saudável até o câncer invasivo. A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) pode levar a lesões intraepiteliais cervicais (CIN, do inglês *Cervical Intraepithelial Neoplasia*), classificadas em: CIN 1 (lesão de baixo grau), CIN 2 e CIN 3 (lesões de alto grau), culminando no câncer invasivo. A ilustração mostra as alterações histológicas nas diferentes camadas do epitélio estratificado não queratinizado do colo uterino durante a progressão da doença.

Fonte: Lizarazo-Taborda (2025).

Além da classificação histológica convencional, o Sistema Bethesda é amplamente utilizado para a interpretação citológica, especialmente em exames de Papanicolau, padronizando a terminologia e categorizando as alterações celulares de acordo com seu grau de anormalidade. Dentre as alterações escamosas, destacam-se as atipias de significado indeterminado (ASC-US e ASC-H), as lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL), além do carcinoma de células escamosas. Também são identificadas alterações em células glandulares, como as atipias de significado incerto (AGC), o adenocarcinoma *in situ* (AIS) e o adenocarcinoma invasivo. Essa classificação citológica é essencial para o rastreamento, diagnóstico precoce e definição da conduta clínica frente às lesões cervicais (MSD Manual, 2023).

Outro parâmetro de classificação do câncer do colo do útero também é quanto à sua extensão no organismo, utilizando-se o sistema de estadiamento proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, conforme apresentado no quadro 1 (FIGO, 2021).

Esse sistema divide a doença em quatro estágios principais (I a IV), de acordo com a extensão anatômica do tumor. O Estágio I abrange os tumores confinados ao colo do útero, sendo subdividido em IA (detectado apenas por microscopia) e IB

(identificável clinicamente), conforme a profundidade da invasão. O Estágio II indica que o tumor ultrapassou os limites do colo, mas sem alcançar a parede pélvica ou o terço inferior da vagina, podendo ou não envolver o paramétrio. O Estágio III corresponde ao comprometimento do terço inferior da vagina, parede pélvica, presença de hidronefrose ou envolvimento linfonodal (pélvico e/ou para-aórtico, classificado como IIIC). Já o Estágio IV representa a doença localmente avançada ou metastática, com invasão de órgãos adjacentes, como bexiga ou reto (IVA), ou disseminação para órgãos distantes (IVB). Essa classificação é fundamental para a identificação do prognóstico e para a escolha da conduta terapêutica mais adequada (Quadro 1) (Bhatla *et al.*, 2021).

Quadro 1. Estadiamento do câncer do colo do útero

Estágio		Descrição
I		Carcinoma estritamente confinado ao colo (a extensão para o corpo uterino não é considerada).
IA		Carcinoma invasor diagnosticado somente pela microscopia, com profundidade de invasão máxima ≤ 5 mm ^a
	IA1	Invasão do estroma $\leq 3,0$ mm de profundidade
	IA2	Invasão do estroma $> 3,0$ mm e $\leq 5,0$ mm de profundidade
IB		Carcinoma invasor com invasão de profundidade > 5 mm (maior que estágio IA), lesão limitada ao colo com o tamanho mensurado no maior diâmetro do tumor ^b
	IB1	Carcinoma invasor > 5 mm de invasão estromal e ≤ 2 cm na maior dimensão
	IB2	Carcinoma invasor > 2 cm e ≤ 4 cm na maior dimensão
	IB3	Carcinoma invasor > 4 cm na maior dimensão
II		O carcinoma se estende além do colo uterino, mas não até o terço inferior de vagina ou parede pélvica
IIA		Envolvimento até dois terços superiores de vagina, sem invasão parametrial
	IIA1	Carcinoma invasor ≤ 4 cm na maior dimensão
	IIA2	Carcinoma invasor > 4 cm na maior dimensão
IIB		Envolvimento parametrial que não atinge a parede óssea
III		O carcinoma envolve o terço inferior de vagina e/ou atinge a parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionante e/ou envolve linfonodos pélvicos e/ou paraórticos
IIIA		Envolvimento da parede inferior de vagina, sem extensão à parede óssea
IIIB		Envolvimento até parede óssea e/ou hidronefrose ou rim não funcionante (a menos que seja de outra causa)

IIIC		Metástases linfonodais pélvicas e/ou paraórticas (incluindo micrometástases ^{c)} independentemente do tamanho do tumor e da extensão (com anotações r e p) ^d
	IIIC1	Metástases linfonodais pélvicas apenas
	IIIC2	Metástases linfonodais paraórticas
IV		O carcinoma se estende além da pelve verdadeira ou envolve (com biópsia confirmando) a mucosa da bexiga ou do reto. Um edema bolhoso, por exemplo, não permite alocar o caso como estágio IV
IVA		Propagação para órgãos adjacentes
IVB		Metástases a distância

Legenda: Quadro ilustrativo dos diferentes estágios do câncer do colo do útero (CCU), conforme a classificação FIGO. Cada estágio representa a progressão da doença, desde lesões iniciais localizadas até formas avançadas com invasão de estruturas adjacentes ou metástases a distância, sendo fundamental para a definição do prognóstico e escolha da conduta terapêutica.

a) Imagem e avaliação patológica podem ser utilizadas quando disponíveis para suplementar achados clínicos em relação ao tamanho do tumor e sua extensão, em todos os estádios. A avaliação patológica supera as imagens e os achados clínicos.

b) O envolvimento do espaço vascular/linfático não muda o estágio. A extensão lateral do tumor não é mais considerada.

c) Células tumorais isoladas não mudam o estágio, mas devem ser referidas no laudo.

d) Adicionar anotações para r (imagem) e p (patologia), para indicar o método que foi utilizado para alocar o caso em estágio IIIC. Por exemplo, se for a imagem que detectou a metástase em linfonodo pélvico, o estágio será IIIC1r; se a metástase for confirmada pela patologia, será estágio IIIC1p. O tipo de imagem e a técnica patológica utilizadas deverão sempre ser documentadas. Quando houver dúvida, o menor estágio deverá ser atribuído.

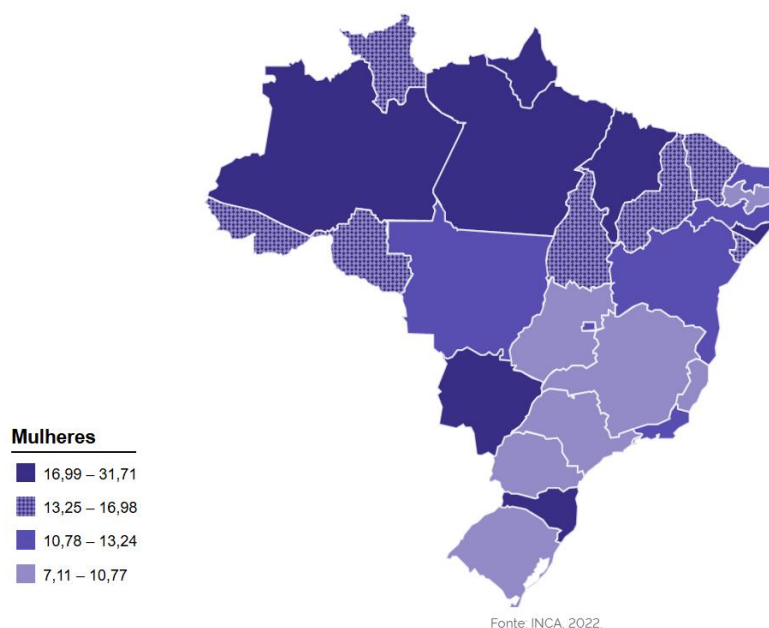
Fonte: Adaptado de FIGO (2021).

Segundo dados do GLOBOCAN (2022), foram registrados, no ano de 2022, aproximadamente 662.044 novos casos de câncer do colo do útero e 348.709 óbitos, tornando-se a quarta principal causa de morbidade e mortalidade por câncer entre mulheres em todo o mundo, especialmente naquelas com 40 anos ou mais. As maiores taxas de incidência foram observadas em países em desenvolvimento, com destaque para a África Subsaariana, América do Sul e Sudeste Asiático. Estima-se que o número de casos possa alcançar um milhão em 2050, com cerca de 630 mil mortes no mesmo ano, mantendo-se o padrão de maior incidência em países em desenvolvimento (Bray *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2025).

No cenário nacional, o câncer do colo do útero apresenta elevada incidência entre as mulheres. Para cada ano do triênio 2023-2025, foram estimados 17.010 novos casos, correspondendo a uma taxa bruta de incidência de 15,38 casos por 100 mil mulheres (INCA, 2022). Só em 2020, ocorreram 6.627 óbitos por esta neoplasia, representando uma taxa ajustada de mortalidade por este câncer de 4,60/100 mil mulheres (INCA 2021a). Na análise por região, o câncer do colo do útero ocupa a segunda posição em incidência nas Regiões Norte (20,48/100 mil) e Nordeste

(17,59/100 mil), a terceira na Região Centro-Oeste (16,66/100 mil), a quarta na Região Sul (14,55/100 mil) e a quinta posição na Região Sudeste (12,93/100 mil), conforme observado na figura 2 (INCA, 2022).

Figura 3 Representação espacial das taxas estimadas de incidência por neoplasia maligna do colo do útero, ajustadas por idade pela população mundial, por 100 mil mulheres, para cada ano do triênio 2023-2025, segundo Unidade da Federação



Legenda: Observa-se que a região Norte apresenta as maiores taxas de incidência do câncer do colo do útero, seguida pelas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Em contraste, as regiões Sudeste e Sul registram as menores incidências estimadas no período analisado.

Fonte: INCA, 2022

Essas diferenças regionais estão fortemente relacionadas às desigualdades no acesso à vacinação contra o HPV, aos serviços de triagem e tratamento, além de fatores como a prevalência do HIV e determinantes sociais e econômicos, incluindo desigualdade de gênero e pobreza (De Martel, 2020).

Embora diversos fatores de suscetibilidade geral estejam implicados na gênese do câncer do colo do útero, a infecção persistente por subtipos oncogênicos do HPV é considerada a principal causa da doença. Mais de 150 tipos diferentes de HPV já foram identificados, sendo classificados como de baixo ou alto risco, conforme seu potencial de transformação celular (Hakim; Amin; Islam, 2025).

Os tipos de baixo risco estão associados a lesões benignas, como verrugas genitais e papilomas laríngeos, enquanto os tipos de alto risco estão implicados na formação de lesões precursoras e no desenvolvimento de diversos tipos de câncer, principalmente o do colo do útero, mas também, com menor frequência, os cânceres

de ânus, vagina e pênis (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020). Entre os subtipos oncogênicos mais frequentemente associados ao câncer cervical, destacam-se o HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 73 (Pimple; Mishra, 2022).

A diferença entre os genótipos do HPV de alto risco está relacionada a fatores como carga viral e perfil de expressão gênica, os quais contribuem para o potencial oncogênico distinto de cada subtipo. Em cada caso, cada genótipo é capaz de produzir suas próprias oncoproteínas E6 e E7, que interferem nos mecanismos de controle do ciclo celular e favorecem a imortalização celular (Salcedo *et al.*, 2002; Hakim; Amin; Islam, 2025). Estudos demonstram que determinados genótipos apresentam distribuição geográfica característica: o HPV-31 é mais prevalente em partes da Europa, o HPV-58 no leste da Ásia e o HPV-45 é endêmico da África Subsaariana. Esses padrões geográficos podem refletir uma interação complexa entre fatores como a genética do hospedeiro, dinâmicas locais de transmissão sexual e os níveis de cobertura vacinal em cada região (Seyoum *et al.*, 2022).

Além disso, quando ocorrem co-infecções por múltiplos genótipos oncogênicos em um mesmo hospedeiro, os eventos moleculares envolvidos na carcinogênese cervical tendem a ser ainda mais intensificados, aumentando o risco de progressão para lesões malignas (Wu *et al.*, 2019).

A infecção persistente por subtipos de alto risco do HPV, especialmente o HPV-16 e o HPV-18, é reconhecida como a principal causa do desenvolvimento do câncer do colo do útero (Yu; Majerciak; Zheng, 2022). O vírus infecta preferencialmente células epiteliais da camada basal da mucosa na zona de transformação do colo uterino, geralmente por meio de microlesões provocadas durante a atividade sexual. Essa região é particularmente suscetível à infecção devido à sua elevada taxa de renovação celular (*turnover*) e à constante exposição das células basais (Ozbun; Campos, 2021).

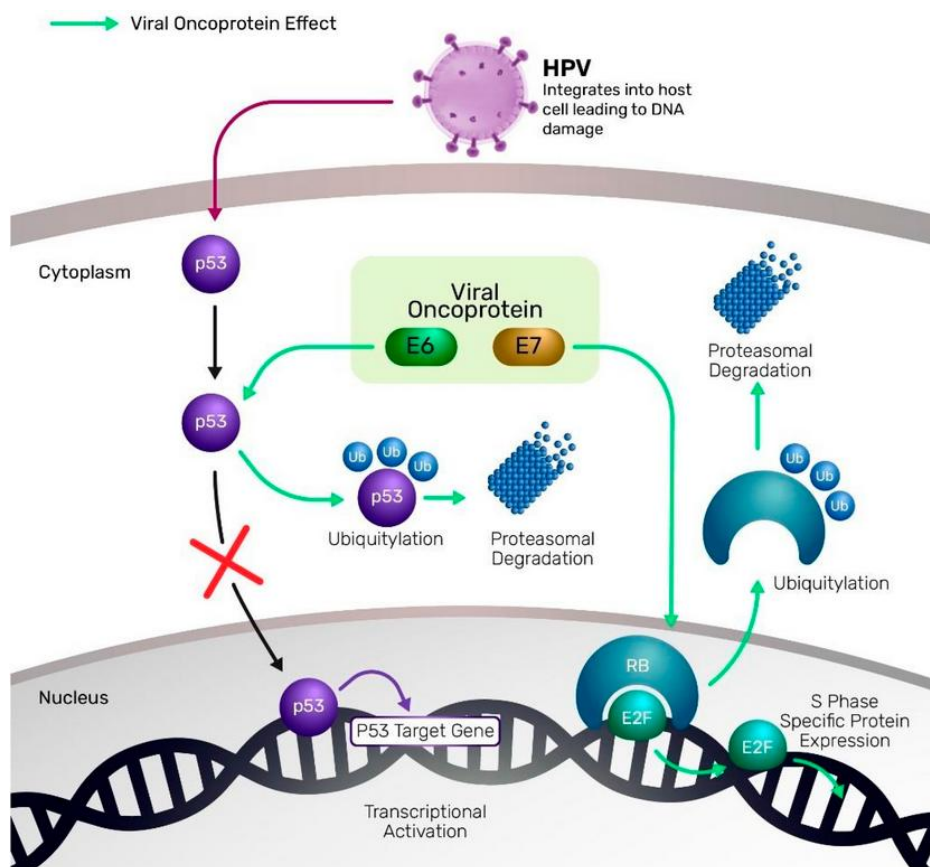
Após a entrada do HPV na célula hospedeira, a infecção ocorre nas células basais do epitélio escamoso estratificado. À medida que essas células se diferenciam em células parabasais, inicia-se a expressão dos genes virais E6 e E7, que promovem a progressão do ciclo celular nas células infectadas, permitindo a ativação da maquinaria celular necessária à replicação do DNA viral e à liberação eficiente dos vírions (Ozbun; Campos, 2021). Em seguida, os genes virais E1 e E2 são expressos nas células intermediárias, promovendo a replicação do genoma viral. Nas camadas superficiais do epitélio, as proteínas capsídicas L1 e L2 são produzidas e responsáveis

por empacotar o DNA viral, formando as partículas virais completas. Mesmo quando as células basais infectadas se dividem lateralmente, o HPV pode persistir nessa camada, pois o DNA viral permanece retido junto ao genoma do hospedeiro nas células-filhas (Kobayashi *et al.*, 2024).

As oncoproteínas E6 e E7 exercem papéis centrais na transformação celular associada ao papilomavírus humano (HPV) (Pal; Kundu, 2020). A E6 inativa a proteína p53 (proteína supressora tumoral p53), um regulador fundamental que normalmente induz a parada do ciclo celular ou a apoptose em resposta a danos no DNA. Essa inativação ocorre por meio da interação com a E6AP (proteína associada à E6 com atividade de ubiquitina ligase tipo E3), promovendo a degradação da p53 e induzindo a entrada das células na fase S do ciclo celular sem o bloqueio fisiológico em G1. Além disso, E6 ativa a hTERT (transcriptase reversa da telomerase humana), subunidade catalítica da telomerase, que normalmente é inativa em células somáticas. Sua reativação permite a manutenção dos telômeros, conferindo imortalidade celular (Olmedo-Nieva *et al.*, 2018; Vallejo-Ruiz *et al.*, 2024).

Por sua vez, a oncoproteína E7 inativa a proteína do retinoblastoma (pRB ou RB1), responsável por controlar a progressão do ciclo celular ao se ligar e inibir os fatores de transcrição E2F (fatores E2 de transcrição 1 a 8). A inativação da pRB libera os E2F, promovendo a entrada desregulada das células na fase S do ciclo. E7 também inibe as HDACs (histonas desacetilases), enzimas envolvidas na repressão da transcrição gênica por meio da modificação da estrutura da cromatina, favorecendo a expressão de genes que promovem a proliferação celular. Além disso, E7 interfere com o controle exercido pela p16^{INK4A} (proteína inibidora de quinases dependentes de ciclina 4 e 6, codificada pelo gene CDKN2A), que atua como inibidora dos complexos ciclina D/CDK4/6 (ciclina do tipo D associadas às quinases dependentes de ciclina 4 e 6). Esses complexos normalmente promovem a fosforilação da pRB, e sua inibição induz a senescência celular. Ao inativar a pRB, E7 permite a evasão dessa via de controle, mesmo diante da superexpressão compensatória da p16^{INK4A} (Figura 4) (Mirabello *et al.*, 2017; Vallejo-Ruiz *et al.*, 2024).

Figura 4. Mecanismo pelo qual o HPV interrompe processos celulares críticos para promover o desenvolvimento do câncer por meio de suas oncoproteínas virais E6 e E7



Legenda: Representação esquemática dos mecanismos moleculares pelos quais o papilomavírus humano (HPV) promove a carcinogênese cervical. As oncoproteínas virais E6 e E7 interferem em processos celulares essenciais, como a regulação do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA. A proteína E6 promove a degradação da p53, enquanto a E7 inativa a proteína do retinoblastoma (pRb), resultando em proliferação celular descontrolada e acúmulo de mutações genômicas. Esses eventos contribuem para a transformação maligna das células infectadas.

Fonte: Hakim; Amin; Ul Islam (2025).

Embora a maioria das infecções por HPV oncogênico seja temporária e controlada pelo sistema imunológico, cerca de 10% podem persistir. A infecção crônica, especialmente quando não acompanhada por mecanismos de vigilância imunológica eficazes, favorece a progressão de lesões intraepiteliais de alto grau, que, se não tratadas, podem evoluir para carcinoma invasivo (Ye *et al.*, 2023).

Além da infecção persistente por tipos oncogênicos do HPV, diversos agentes carcinogênicos atuam como co-fatores importantes na progressão para o câncer cervical invasivo (Figura 4). O tabagismo contribui para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), induzindo estresse oxidativo, danos ao DNA e alterações no muco cervical que favorecem a infecção viral. A imunossupressão crônica, como nos casos de infecção pelo HIV, compromete a vigilância imunológica e reduz a

capacidade do organismo de eliminar o HPV, favorecendo a persistência viral e a progressão de lesões (Magalon *et al.*, 2024).

O uso prolongado de contraceptivos orais também tem sido associado ao aumento do risco, devido à influência hormonal (estrogênio e progesterona) sobre o epitélio cervical, tornando-o mais vulnerável à ação do vírus (Bovo *et al.*, 2023). Além disso, o início precoce da atividade sexual e o elevado número de parceiros sexuais aumentam a exposição ao HPV em uma fase em que o colo do útero, especialmente na zona de transformação imatura, apresenta maior suscetibilidade à infecção e transformação neoplásica (Adjei Boakye *et al.*, 2022).

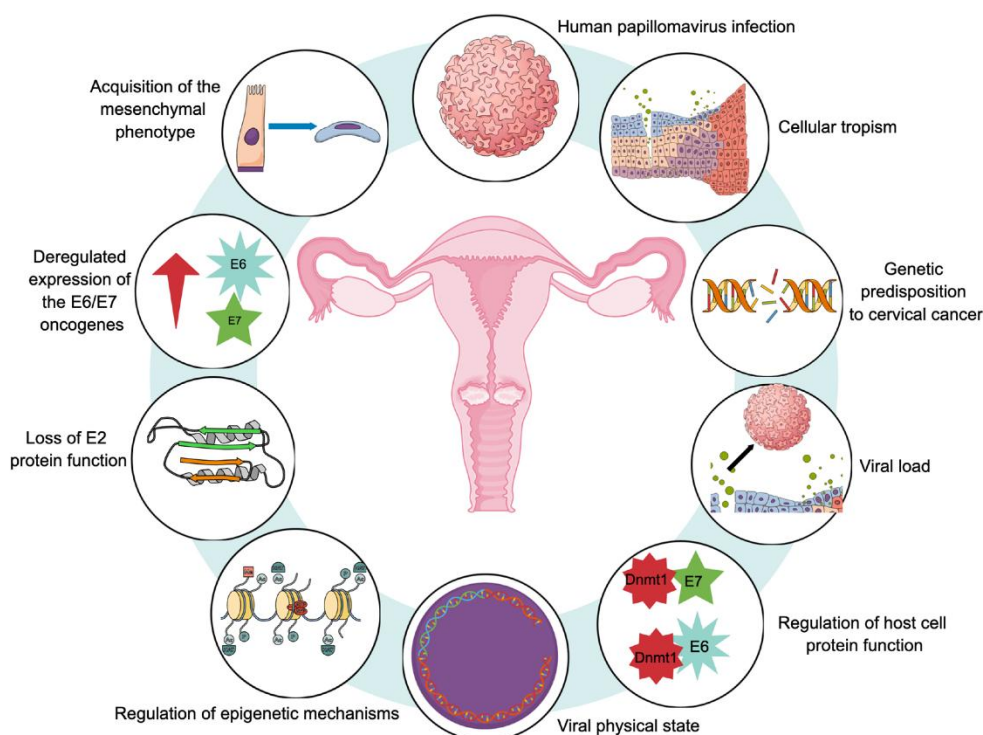
Nos casos de câncer do colo do útero que se desenvolvem de forma independente da infecção pelo HPV destacam-se alterações epigenéticas como a hipermetilação das regiões promotoras de genes supressores tumorais, o que leva ao seu silenciamento. Um exemplo notável é o gene CDKN2A, que codifica a proteína inibidora de quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (p16^{INK4A}). A metilação de seu promotor impede a expressão dessa inibidora do ciclo celular, favorecendo a proliferação descontrolada das células. Alterações semelhantes ocorrem em genes reguladores da apoptose e da resposta ao dano no DNA, como BBC3, que codifica a proteína moduladora da apoptose regulado positivamente por p53 (PUMA), contribuindo para a evasão dos mecanismos de morte celular programada (Zhou *et al.*, 2024).

Além das alterações epigenéticas, mutações somáticas também contribuem para a carcinogênese independente do HPV. Mutações no gene TP53 (proteína tumoral p53) comprometem a função da proteína p53 como reguladora da resposta ao dano no DNA, enquanto alterações em ARID1A (proteína 1A contendo domínio interativo rico em AT), integrante do complexo multiproteico remodelador de cromatina - SWI/SNF, afetam o controle transcricional e o reparo genômico (Lu *et al.*, 2021). Destacam-se ainda mutações no gene KRAS (homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten), ativando constitutivamente a via RAS/MAPK (via sarcoma de rato/quinoase de proteína ativada por mitógeno), presente em cerca de 18 a 36% dos adenocarcinomas cervicais mucinosos do tipo gástrico, com relatos semelhantes para NRAS (homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma). Essas mutações impulsionam sinais de proliferação celular e resistência à apoptose, contribuindo para o crescimento tumoral na ausência de HPV (Selenica *et al.*, 2021; Giannella *et al.*, 2025).

O acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas contribuem para o desenvolvimento dos “Hallmarks of cancer”, características biológicas fundamentais que conferem vantagens proliferativas às células tumorais (Hanahan, 2022). No câncer do colo do útero, essas marcas incluem a sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, replicação ilimitada, angiogênese, ativação de invasão e metástase, além de inflamação tumoral e escape do sistema imune. Tais alterações são impulsionadas principalmente pela infecção persistente por HPV de alto risco, especialmente por meio da ação das oncoproteínas virais E6 e E7, que desregulam vias chave envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose e resposta imune, favorecendo o ambiente necessário para a progressão tumoral (Figura 5) (Lizarazo-Taborda *et al.*, 2025).

No contexto do tratamento, a vacinação representa a principal medida de profilaxia primária, sendo altamente eficaz na prevenção dos subtipos oncogênicos do HPV (Amiri *et al.*, 2025). No entanto, outras modalidades terapêuticas podem ser empregadas de forma isolada ou combinada, incluindo cirurgia, terapia-alvo, imunoterapia, radioterapia e quimioterapia. A escolha do tratamento mais adequado depende de diversos fatores, como o estadiamento clínico do câncer cervical segundo a classificação FIGO (2018), o comprometimento linfonodal, o tipo histológico do tumor, a idade gestacional, os achados de imagem (como a ressonância magnética) e o desejo de preservação da fertilidade por parte da paciente e sua família (Schubert *et al.*, 2023).

Figura 5. Marcas moleculares propostas para a carcinogênese cervical. Todos esses marcadores desempenhariam um papel importante no desenvolvimento do câncer de colo do útero



Legenda: Fatores moleculares e celulares envolvidos na progressão do câncer do colo do útero induzido pelo HPV. A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco desencadeia uma série de eventos patológicos que incluem o tropismo celular, predisposição genética, carga viral, estado físico do vírus, disfunção de proteínas da célula hospedeira, alterações epigenéticas, perda da função da proteína E2 e superexpressão das oncoproteínas E6/E7. Esses eventos contribuem para a aquisição de um fenótipo mesenquimal, promovendo a transformação maligna e a progressão do câncer cervical.

Fonte: Hakim e colaboradores (2024).

A cirurgia para o CCU tem como principal objetivo não apenas a remoção completa do tumor, mas também a preservação da funcionalidade do órgão e de estruturas nervosas essenciais, sempre que possível. Em estágios iniciais, pode-se optar pela histerectomia simples, que consiste na retirada do útero, preservando nervos e tecidos adjacentes. Já em casos mais avançados, indica-se a histerectomia radical, que envolve a remoção do útero juntamente com seus ligamentos e a porção superior da vagina. Esse procedimento pode ser realizado por via minimamente invasiva ou por cirurgia aberta. Outras abordagens cirúrgicas incluem: a salpingooforectomia bilateral (remoção das trompas de Falópio e ovários), a exenteração pélvica (remoção de órgãos como bexiga, reto, vagina e parte do cólon), a criocirurgia (destruição de células anormais por congelamento) e a cirurgia a laser (utilização de feixe de luz para queimar células pré-cancerosas) (SBCO, 2023).

A radioterapia utiliza radiações ionizantes para destruir ou inibir o crescimento

de células tumorais, sendo um dos pilares no tratamento do câncer do colo do útero. Os principais métodos empregados são a radioterapia de feixe externo (RFE) e a braquiterapia, que permitem uma abordagem combinada eficaz. A RFE é geralmente realizada ao longo de 5 a 6 semanas, muitas vezes associada à quimioterapia. Em seguida, a braquiterapia, que consiste na inserção de fontes radioativas diretamente no tumor, oferece altas doses localizadas com menor dano aos tecidos adjacentes. Em alguns casos, esse tratamento é seguido por cirurgia radical realizada de seis a oito semanas após a braquiterapia (Chargari *et al.*, 2022).

A terapia alvo no câncer do colo do útero tem como foco interferir em vias moleculares específicas envolvidas na progressão tumoral. Entre os principais alvos estão o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGFR), bloqueados por agentes como bevacizumabe, pazopanibe, sunitinibe e cediranibe (Watkins *et al.*, 2023). Outros alvos incluem o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, também relacionado ao gene BCAR4), com o uso do lapatinibe, e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), com medicamentos como cetuximabe, gefitinibe e erlotinibe. Além disso, inibidores da proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), como o temsirolimo, da acetilase de histonas (HDAC), como o ácido valproico, e da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), como olaparibe e veliparibe, também estão em avaliação ou já são utilizados como terapias direcionadas (Vora; Gupta, 2018; Xu *et al.*, 2025).

A imunoterapia é uma estratégia terapêutica que estimula ou modula o sistema imunológico para reconhecer e eliminar células tumorais (Grau-Bejar *et al.*, 2023). No câncer do colo do útero, essa abordagem tem ganhado destaque principalmente com o uso de inibidores de checkpoints imunológicos, como os anticorpos anti-PD-1/PD-L1 (ex.: pembrolizumabe e nivolumabe), que bloqueiam sinais de evasão imune das células tumorais. Outras estratégias em estudo incluem vacinas terapêuticas contra as oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV, terapias com linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e células dendríticas, que visam estimular respostas imunes específicas contra o tumor. Embora promissora, a imunoterapia ainda enfrenta desafios como resistência, efeitos adversos e a necessidade de biomarcadores preditivos de resposta (Mauricio *et al.*, 2021).

A quimioterapia é uma modalidade terapêutica que utiliza substâncias químicas com ação citotóxica para destruir células tumorais ou inibir sua multiplicação. Ela desempenha papel essencial no tratamento do CCU, principalmente em casos

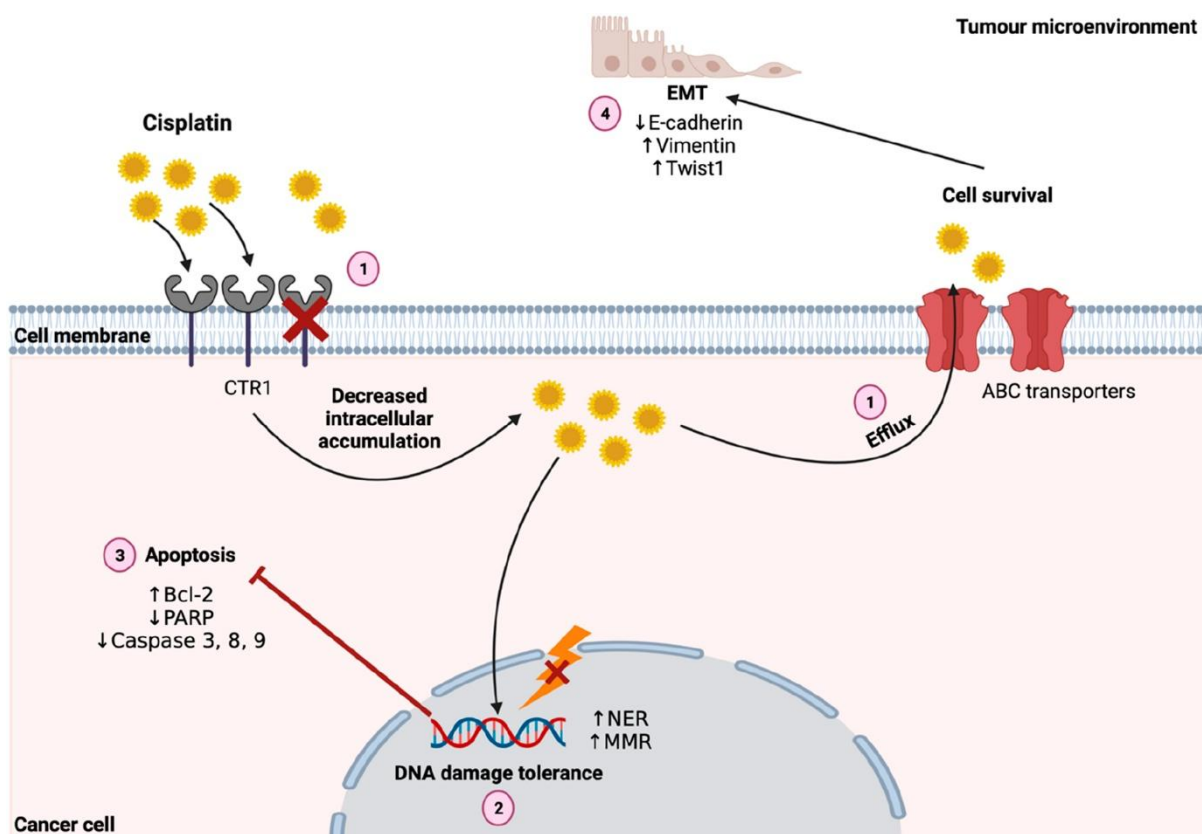
localmente avançados ou recorrentes, sendo utilizada de forma isolada ou em combinação com outros tratamentos. Os quimioterápicos empregados no tratamento do CCU pertencem a diferentes classes farmacológicas, cada uma atuando por mecanismos específicos na destruição ou inibição da proliferação celular tumoral (Valdivia *et al.*, 2022).

Entre as principais classes, destacam-se os análogos da platina, como a cisplatina e a carboplatina, que atuam formando ligações cruzadas com o DNA, promovendo danos irreversíveis e induzindo apoptose. Os taxanos, como paclitaxel e docetaxel, interferem na dinâmica dos microtúbulos, bloqueando a mitose celular. Já os inibidores da topoisomerase, como topotecano e irinotecano, impedem o religamento das fitas de DNA durante a replicação, levando à morte celular. Os antimetabólitos, como gemcitabina e pemetrexede, mimetizam bases nucleotídicas e interrompem a síntese de DNA e RNA. Também são utilizados agentes alquilantes, como a ifosfamida, que provocam quebras diretas nas cadeias de DNA (Thigpen *et al.*, 1981; Kitagawa *et al.*, 2015; Boussios *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018; Francoeur; Monk; Tewari, 2025).

No entanto, o uso dessas drogas está associado a diversos efeitos adversos, uma vez que tecidos com alta taxa de proliferação celular, como a medula óssea, a mucosa gastrointestinal, os folículos pilosos e as gônadas, são particularmente sensíveis à ação citotóxica da quimioterapia. Dessa forma, os efeitos colaterais imediatos mais comuns incluem mielossupressão, náuseas, vômitos, alopecia e comprometimento da fertilidade (Aboud *et al.*, 2023).

Além dos efeitos adversos provocados pela quimioterapia, as células tumorais podem desenvolver mecanismos de resistência que comprometem a eficácia do tratamento. Essa resistência está associada a alterações genômicas dinâmicas, como amplificações e deleções gênicas, modificações epigenéticas (incluindo metilação do DNA e alterações em histonas) e rearranjos estruturais de proteínas que surgem sob a pressão dos agentes quimioterápicos. Tais modificações favorecem a adaptação celular por meio da ativação de vias de sinalização e mecanismos de escape imune (Sun *et al.*, 2022). No caso da cisplatina, conforme mostrado na figura 6, destacam-se mecanismos como o aumento da capacidade de reparo do DNA, a inibição da apoptose, a ativação da transição epitelial-mesenquimal (EMT) e alterações epigenéticas que reforçam o fenótipo resistente, contribuindo significativamente para a persistência tumoral e para a falha terapêutica (Zhu *et al.*, 2016) (Figura X).

Figura 6. Visão geral da resistência ao tratamento com cisplatina



Legenda: Diminuição da acumulação intracelular de compostos de platina; (2) Aumento do retardamento de resíduo no DNA; (3) Inativação da apoptose; (4) Transição epitelial-mesênquimal. Abreviatura: CTR1: Transportador de cobre 1; EMT: Transição epitelial-mesênquimal; MMR: Reparo de incompatibilidade; NER: Reparo de excisão de nucleotídeos; PARP: Poli polimerase Poli (ADP-ribose).

Fonte: Eksteen e colaboradores (2024).

Nesse contexto, o aumento da heterogeneidade das células tumorais ao longo da carcinogênese decorre de altas taxas de mutações genéticas, o que inviabiliza a adoção de um tratamento único e universal para o câncer. Diante desse desafio, a busca por novos agentes antitumorais tem sido contínua, com o objetivo de identificar moléculas capazes de atuar seletivamente sobre as células neoplásicas, reduzindo ao máximo os efeitos tóxicos sobre tecidos saudáveis e aumentando a eficácia terapêutica (Stine et al., 2022).

2.2 Apoptose

A apoptose ou morte celular programada é um processo que regula a eliminação controlada de células, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento, na manutenção da homeostase e na defesa do organismo. O termo tem origem no grego e significa “queda” ou “desprendimento”, como ocorre com folhas

ou frutos que caem de uma árvore ao morrerem ou amadurecerem (Kerr; Wyllie; Currie, 1972; Lossi, 2022).

Esse mecanismo é altamente orquestrado e dirigido por genes envolvidos em eventos cruciais como a morfogênese, o equilíbrio dos tecidos e a eliminação de células potencialmente perigosas. A disfunção nos processos apoptóticos pode contribuir para o surgimento de diversas doenças, incluindo câncer (Singh; Lim, 2022).

A apoptose ocorre em diferentes contextos fisiológicos e patológicos, como durante o desenvolvimento embrionário e o envelhecimento, na eliminação de células tumorais, de células infectadas por vírus e de células em excesso. Além disso, atua como um mecanismo de defesa frente a danos celulares induzidos por agentes nocivos ou em respostas imunes. Diante de sua relevância, o aprofundamento na compreensão dos mecanismos moleculares da apoptose e de suas implicações clínicas é estratégico para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes em diversas áreas da medicina (Mustafa *et al.*, 2024).

Esse fenômeno é caracterizado por um conjunto de alterações bioquímicas e morfológicas bem definidas, que distinguem esse processo de outros tipos de morte celular, como a necrose. No nível bioquímico, destaca-se a ativação de uma cascata enzimática coordenada por caspases iniciadoras 2, 8, 9 e 10, e executoras, como as caspases 3, 6 e 7, que promove a clivagem de proteínas essenciais, fragmentação internucleossomal do DNA, a inativação de enzimas reparadoras como a PARP e a exposição da fosfatidilserina na membrana celular, sinalizando para fagocitose (Al *et al.*, 2024). Alterações mitocondriais, como a perda do potencial de membrana e liberação de citocromo c também são marcantes, principalmente na via intrínseca.

Já no aspecto morfológico, a célula sofre encolhimento, com condensação da cromatina (picnose), fragmentação nuclear (cariorrexe) e formação de protrusões na membrana plasmática chamadas de *blebs*. Ao final do processo, ocorre a formação de corpos apoptóticos, que são fagocitados por células vizinhas ou imunológicas, sem induzir resposta inflamatória. Esses eventos refletem a natureza regulada e silenciosa da apoptose, fundamental para a homeostase e eliminação seletiva de células danificadas (Hussar, 2022).

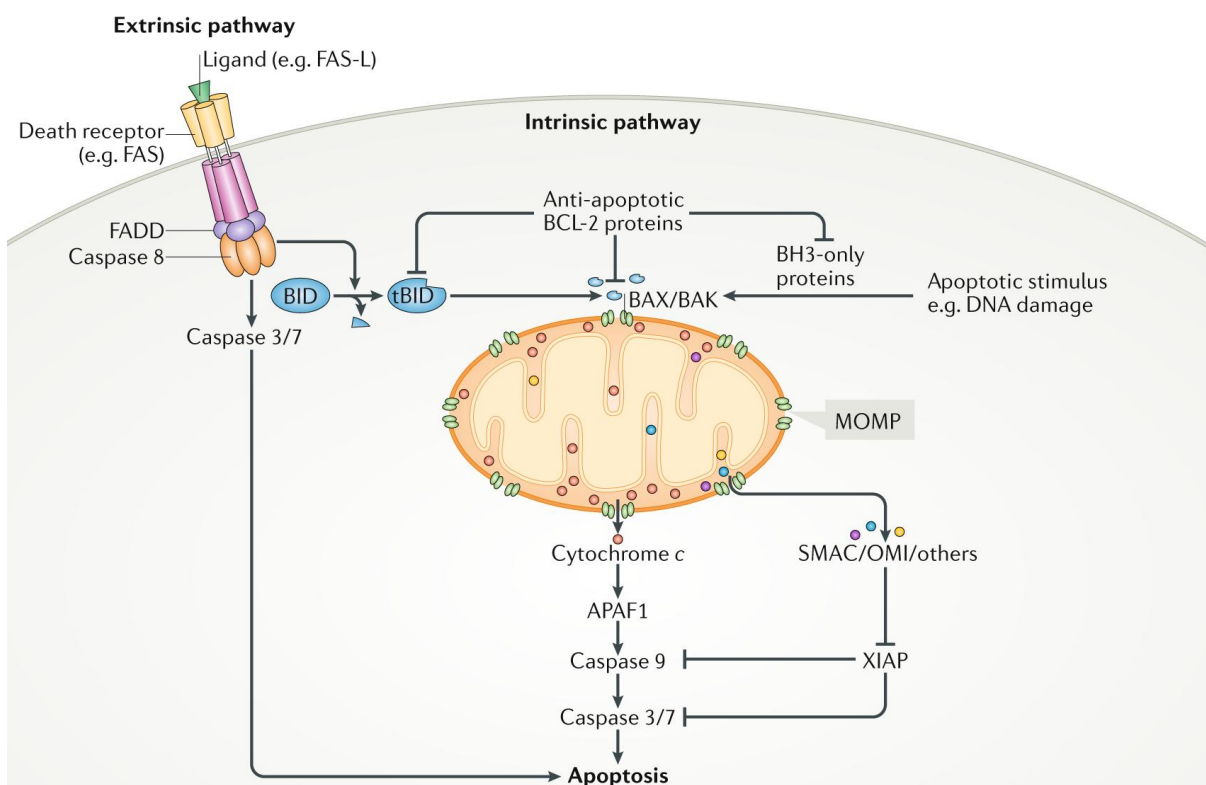
A via extrínseca da apoptose é ativada por meio da ligação de ligantes específicos, como FasL e TRAIL, aos receptores de morte da superfamília TNFRSF presentes na membrana celular, incluindo FasR, TNFR1, TRAILR1 e TRAILR2 (Green 2022). Essa interação leva à formação do complexo de sinalização da morte (DISC),

que inclui as proteínas adaptadoras FADD e TRADD, além da caspase 8 (CASP8) e, em alguns casos, a caspase 10 (CASP10). A montagem do DISC varia conforme o receptor ativado: FasR e TRAILRs recrutam diretamente a FADD, enquanto TNFR1 requer a ativação inicial da TRADD, que posteriormente recruta a FADD. A FADD promove a oligomerização e clivagem autoproteolítica da CASP8, ativando-a. Uma vez ativada, a CASP8 inicia a cascata de caspases efetoras responsáveis pela execução da morte celular programada (Rodríguez-González; Gutiérrez-Kobeh, *et al.*, 2024) (Figura X).

A via intrínseca da apoptose é iniciada por estímulos intracelulares, como danos ao DNA ou estresse oxidativo. Essa via é regulada pela família de proteínas BCL-2, que inclui três grupos: **i)** proteínas pró-apoptóticas ativadoras e sensibilizadoras que são conhecidas como BH3-only por possuírem apenas o domínio BH3 (como BAD, BID, BIM, PUMA, NOXA) e detectam o estresse celular; **ii)** efetoras pró-apoptóticas (BAX, BAK e BOK), responsáveis por permeabilizar a membrana externa mitocondrial; **iii)** proteínas antiapoptóticas (como BCL-2, BCL-XL, MCL-1), que inibem as anteriores (Li; Van Delft; Dewson, 2021).

Durante a apoptose, as proteínas BH3-only são ativadas por mecanismos transcricionais ou pós-traducionais e interagem com BAX e BAK, promovendo mudanças conformacionais que levam à formação de poros na membrana externa mitocondrial, um processo conhecido como permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP). Isso permite a liberação de citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol (Winter; Yadav; Rutter, 2022). O citocromo C liberado ativa a proteína APAF-1, que, em presença de ATP, forma o apoptossomo e ativa a caspase 9. Esta, por sua vez, inicia a cascata de caspases efetoras, como a caspase 3, culminando na morte celular programada (Li *et al.*, 2017). A dinâmica entre proteínas pró e antiapoptóticas da família BCL-2 é essencial para determinar o destino celular, atuando também em outros processos, como homeostase do cálcio, ciclo celular e migração celular (Figura 7) (Zhou *et al.*, 2024).

Figura 7. Esquema da via de sinalização da apoptose



Legenda: Representação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose. A ativação do receptor FAS leva à ativação da caspase-8, que pode acionar diretamente as caspases executoras (3/7) ou a via mitocondrial por meio da clivagem da proteína Bid. Na mitocôndria, ocorre liberação de citocromo c, formação do apoptossomo e ativação da caspase-9, culminando na apoptose. Proteínas como Bcl-2, BAX/BAK, SMAC e IAPs regulam essas vias.

Fonte: Bock; Tait, 2020.

A família de proteínas BCL-2 protege as células da morte celular programada por, pelo menos, dois mecanismos principais. Primeiramente, essas proteínas inibem a formação de poros na membrana mitocondrial externa, processo mediado por BAX e BAK. Esses poros atuam como canais para íons e proteínas, de maneira semelhante aos domínios de inserção de membrana presentes em toxinas como a diftérica e as colicinas. As proteínas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-XL, localizadas na face citoplasmática da membrana mitocondrial externa, interferem na formação desses poros, impedindo a liberação do citocromo c, o que bloqueia a montagem do apoptossomo e, consequentemente, a ativação da via intrínseca da apoptose (Lopez *et al.*, 2022). No câncer do colo do útero, a superexpressão de BCL-2 tem sido associada à resistência a tratamentos como a cisplatina, conforme relatado por Leisching *et al.* (2015), representando um importante mecanismo de evasão tumoral.

Diante desse cenário, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas

voltadas para a indução da apoptose representa uma abordagem promissora no tratamento do câncer.

2.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos normais de diversos processos celulares, especialmente do metabolismo do oxigênio. Elas consistem em derivados instáveis, reativos e parcialmente reduzidos do oxigênio, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), ácido hipocloroso (HOCl) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). Devido à presença de elétrons desemparelhados, essas moléculas são altamente reativas e capazes de interagir com diferentes alvos celulares (Jomova *et al.*, 2023).

EROs são geradas por via endógena, principalmente pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, bem como por reações associadas ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), e ambas as vias podem levar à produção aumentada de ânion superóxido (O_2^-). Além das mitocôndrias, outras organelas também contribuem para a geração de EROs, como os peroxissomos e o retículo endoplasmático (RE). Diversas enzimas estão envolvidas na produção endógena de EROs, incluindo a NADPH oxidase (NOX), xantina oxidase, óxido nítrico sintase, ciclooxygenases, enzimas do citocromo P450 e lipoxigenases (Huang *et al.*, 2021). Adicionalmente, fatores exógenos como radiação ionizante, agentes quimioterápicos e poluentes ambientais também são importantes fontes de estresse oxidativo e promovem significativamente a geração de EROs (Bayo *et al.*, 2022).

Para evitar o aumento exacerbado de EROs, o organismo conta com mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo. As concentrações de EROs são rigorosamente controladas e mantidas dentro de níveis fisiológicos por um sistema homeostático composto por mecanismos de desintoxicação celular, envolvendo antioxidantes enzimáticos, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como as vitaminas C e E, β -caroteno, ácido úrico e a glutathione reduzida (GSH) (Policar *et al.*, 2022; Saxena *et al.*, 2022; De Almeida *et al.*, 2022).

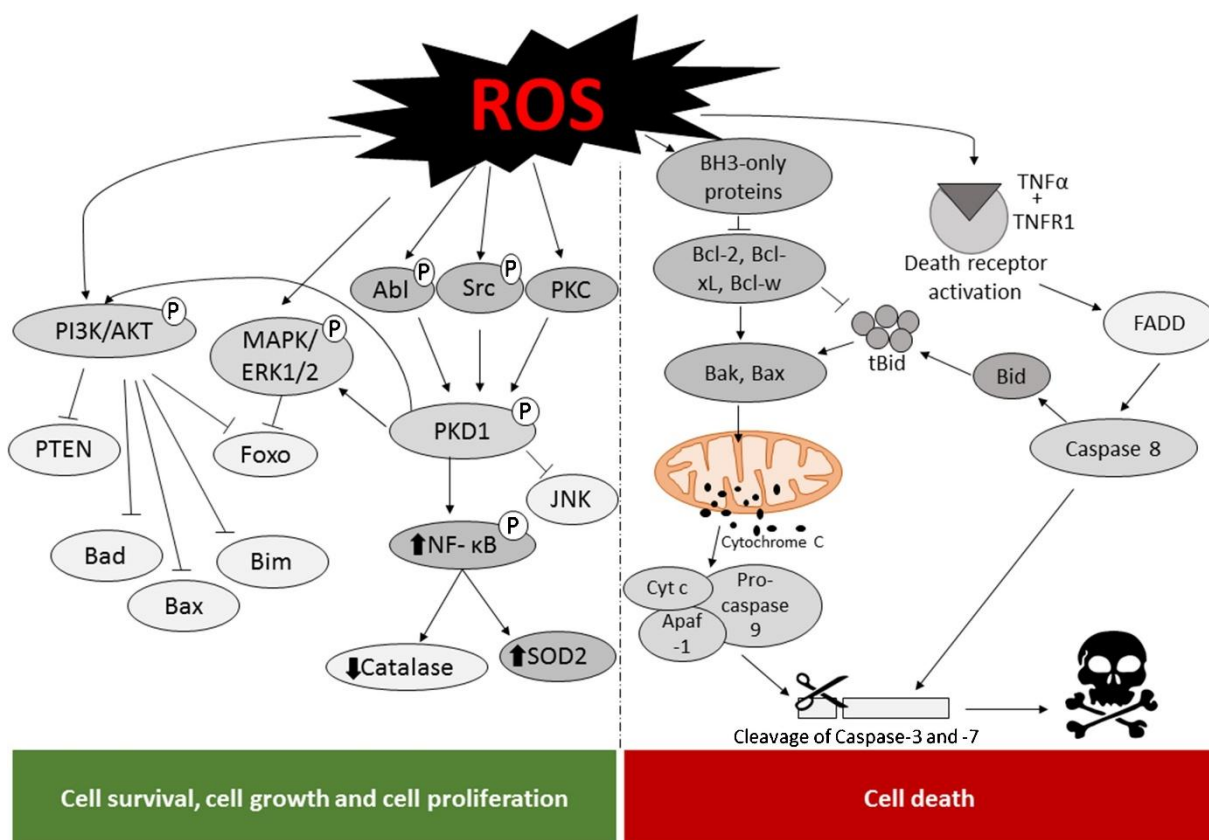
No contexto da homeostase celular, o equilíbrio entre os sistemas antioxidantes permite que as EROs atuem como segundos mensageiros em vias de sinalização intracelulares, sendo essenciais para a regulação de diversos processos fisiológicos em células normais (Zhang *et al.*, 2022). Esse balanço entre a produção e a

neutralização de EROs é sustentado pelos sistemas de defesa antioxidantes intrínsecos presentes em todas as células. No entanto, a perda desse equilíbrio resulta em estresse oxidativo, condição associada a tumores (Nakamura; Takada, 2021).

Evidências crescentes indicam que EROs desempenham um papel dual em células cancerosas. O aumento da produção de EROs em células tumorais pode inativar supressores tumorais importantes, como p53 e PTEN (homólogo da fosfatase e tensina), além de ativar vias de sinalização como MAPK/ERK1/2, PI3K/Akt e proteína quinase D (PKD). Esses eventos favorecem a proliferação celular, migração, invasão, angiogênese e resistência a fármacos (Moloney; Cotter, 2018; Huang et al., 2021).

Por outro lado, níveis elevados de EROs acima da capacidade antioxidante celular podem induzir a ativação de mecanismos de morte, como a apoptose. O estresse oxidativo promove alterações na permeabilidade mitocondrial, em parte pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} na mitocôndria, pela redução da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e pela indução da expressão da proteína pró-apoptótica BAX. Esses eventos culminam na liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF) e o fator ativador de protease apoptótica-1 (APAF-1) (Zhao et al., 2023). Além disso, altos níveis de EROs podem estimular a expressão de receptores de morte celular na membrana plasmática, incluindo Fas (CD95/APO-1), TNF-receptor 1 (TNF-R1/p55/CD120a) e os receptores da TRAIL, como TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5/APO-2/KILLER (Figura 8) (Redza-Dutordoir; Averill-Bates, 2016; De Almeida et al., 2022).

Figura 8. Sinalização celular induzida por EROs no câncer



Legenda: A produção aumentada de EROs no câncer pode atuar tanto na sinalização pró-tumoral quanto antitumoral. Níveis moderados de EROs presentes em células tumorais ativam vias como PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 e PKD, promovendo a sobrevivência e proliferação celular, enquanto inibem proteínas pró-apoptóticas como Bad, Bax, Bim, Foxo e PTEN. Por outro lado, níveis tóxicos de EROs induzem apoptose por via mitocondrial (intrínseca), com liberação de citocromo c e ativação de caspases, ou por via extrínseca, via receptores de morte como o TNFR1, com ativação das caspases 8 e 3 e clivagem da proteína Bid.

Fonte: Moloney; Cotter, 2018.

No câncer cervical, a produção de EROs está intimamente relacionada à infecção pelo HPV, à inflamação crônica e a infecções bacterianas persistentes. Esses fatores contribuem para a ativação contínua do sistema monócito/macrófago, resultando em uma produção excessiva de EROs. Esse ambiente oxidativo favorece danos ao DNA no epitélio cervical e promove um microambiente pró-inflamatório, por meio da liberação de citocinas como IL-1 β e IL-6 e do recrutamento de células imunes, facilitando a transformação maligna e o desenvolvimento do câncer cervical (Preci *et al.* 2021).

Portanto, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas capazes de modular os níveis de EROs em células tumorais afim de induzir morte celular tem se mostrado uma estratégia promissora no tratamento do câncer.

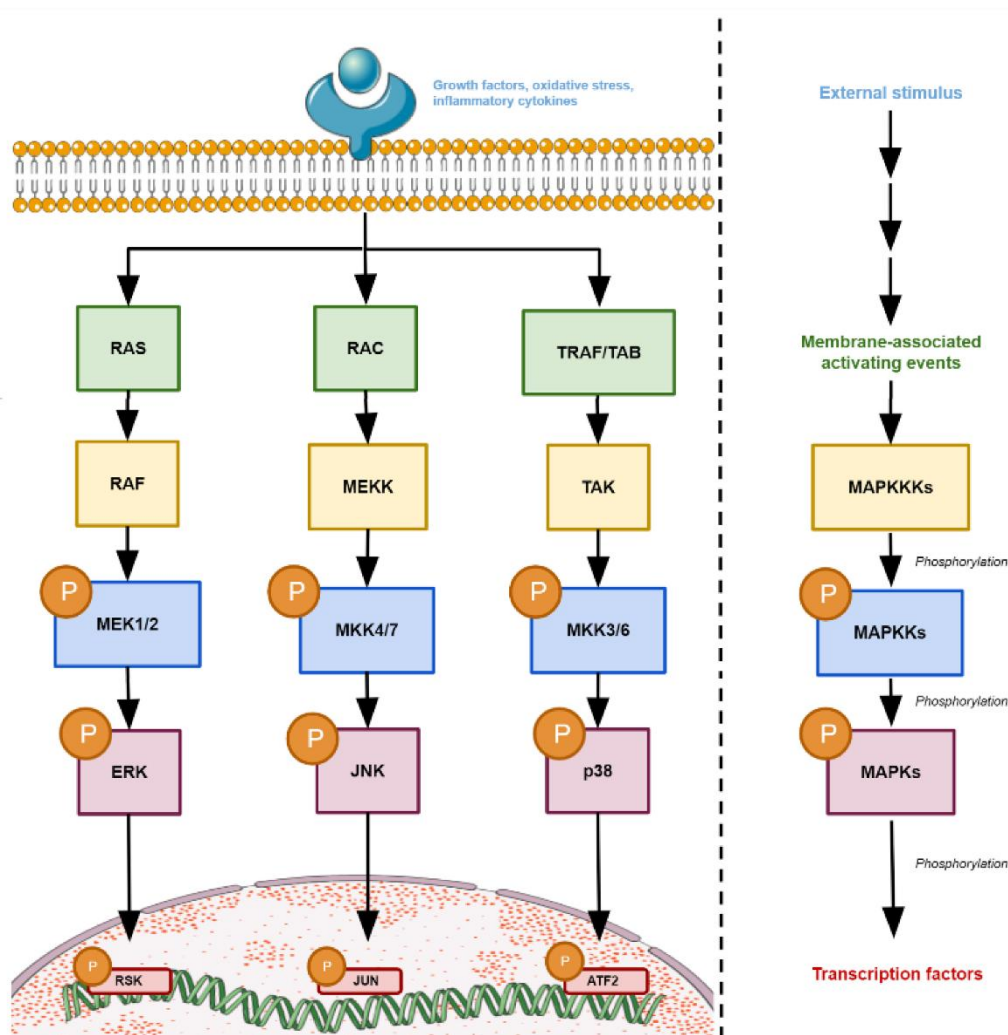
2.4 Vias de sinalização intracelulares das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)

As MAPKs (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinases*) constituem uma família de serina/treonina quinases altamente conservadas, que exercem papel fundamental na transdução de sinais extracelulares para o núcleo, regulando processos celulares essenciais como proliferação, diferenciação, sobrevivência, resposta ao estresse e apoptose (Hepworth; Hinton, 2021).

A ativação das vias de MAPKs ocorre por meio de uma cascata de fosforilação sequencial iniciada geralmente na membrana plasmática, após o reconhecimento de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, citocinas ou estresse oxidativo. Esses estímulos ativam receptores tirosina quinase (RTKs), que por sua vez promovem a ativação de pequenas proteínas de ligação ao GTP, como Ras e Rac. A partir desse ponto, desencadeia-se uma cascata composta por três níveis principais de quinases: as MAPKKKs (*MAP kinase kinase kinases*) fosforilam e ativam as MAPKKs (*MAP kinase kinases*), que então fosforilam as MAPKs (Ronkina; Gaestel, 2022) (Figura 9).

Em mamíferos, três subfamílias principais de MAPKs são bem caracterizadas: ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNK (c-Jun N-terminal Kinases) e p38 MAPK. As proteínas ERK1 (MAPK3) e ERK2 (MAPK1) são classicamente ativadas por fatores de crescimento e estão associadas à proliferação e diferenciação celular (Moore *et al.*, 2020). As proteínas JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) e JNK3 (MAPK10) são ativadas por diferentes tipos de estresse celular, como radiação UV e citocinas inflamatórias, e estão envolvidas na regulação da apoptose e na resposta inflamatória (Garg *et al.*, 2021). Já as isoformas p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) e p38 δ (MAPK13) são ativadas por estresse osmótico, radiação, inflamação e choques térmicos, sendo fundamentais para a modulação da resposta imune, inflamação e morte celular programada (Sanz-Ezquerro; Cuenda, 2021).

Figura 9. Esquema do sistema de fosforilação da família MAPK



Legenda: Representação esquemática das vias de fosforilação MAPK e suas conexões com receptores de membrana e proteínas adaptadoras. Estímulos extracelulares ativam proteínas da família Ras/Rho GTPase (como RAS ou RAC) ou adaptadoras como TRAF, que desencadeiam a cascata de sinalização MAPK, envolvendo os módulos sequenciais MAPKKK, MAPKK e MAPK, regulando respostas celulares diversas.

Fonte: García-Hernández e colaboradores (2022).

Uma vez ativadas, as MAPKs podem se translocar para o núcleo ou atuar no citoplasma, promovendo a fosforilação de diversos alvos intracelulares, incluindo proteínas reguladoras e fatores de transcrição. Entre os principais alvos estão a proteína quinase ativada por ERK (RSK), o fator de transcrição c-JUN e o fator ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*), os quais modulam a expressão gênica e coordenam as respostas celulares aos estímulos recebidos. Dessa forma, as vias de sinalização das MAPKs desempenham um papel central na manutenção da homeostase celular e sua desregulação está associada a diversas doenças, incluindo

o câncer (Cheng *et al.*, 2022).

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

A via de sinalização ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), pertence ao eixo Ras/Raf/MEK/ERK, e pode ser ativada por diversos estímulos extracelulares, incluindo fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de necrose tumoral (TNF), além de citocinas e infecções virais (Guo *et al.*, 2020). A ativação tem início quando esses sinais ligam-se a receptores de membrana, geralmente RTKs. A fosforilação do receptor gera sítios de ligação que permitem a associação da proteína adaptadora Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) ao receptor ativado. Em seguida, Grb2 recruta a proteína SOS (*Son of sevenless*), que promove a troca de GDP por GTP na proteína Ras, ativando-a (Moore *et al.*, 2020).

Uma vez ativada, Ras transloca Raf (também conhecido como Raf-1) para a membrana plasmática, onde este é ativado por mecanismos como dimerização e fosforilação em sítios regulatórios. Raf ativado fosforila e ativa as quinases MEK1 e MEK2, também chamadas de MAPKKs (*MAP kinase kinases*), que possuem atividade catalítica de dupla especificidade. MEK, por sua vez, fosforila resíduos específicos de treonina (Thr) e tirosina (Tyr) em ERK1 e ERK2, levando à sua ativação (Ullah *et al.*, 2022).

ERK1/2 ativado pode atuar tanto no citoplasma quanto no núcleo. No citoplasma, participa da fosforilação de componentes do citoesqueleto, como as proteínas associadas a microtúbulos MAP1, MAP2 e MAP4, contribuindo para a regulação da morfologia celular (Roskoski, 2012). ERK1/2 também fosforila diversas proteínas quinases a montante da própria via, incluindo SOS, Raf-1 e MEK, em um mecanismo de retroalimentação negativa que controla a intensidade e a duração do sinal (Bandaru; Kondo; Kuriyan, 2019; Timofeev *et al.*, 2024)

Uma vez translocado para o núcleo, ERK1/2 fosforila fatores de transcrição como c-Fos, c-Jun, Elk-1, c-Myc e ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*), modulando a expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose (Guo *et al.*, 2020).

Aproximadamente 40% dos cânceres humanos estão associados à regulação positiva da ERK fosforilada (ERKp) (Lee; Rauch; Kolch, 2020). No câncer cervical, a

atividade de diversos efetores das vias MAPK é aumentada pela expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV. Esses oncogenes ativam e superexpressam diferentes genes celulares por meio da via ERK/MAPK, contribuindo para a progressão tumoral. Além disso, a proliferação de cânceres relacionados ao HPV está intimamente ligada à ativação de duas vias-chave de sinalização mitogênica, a EGFR e a VEGF, processo mediado também pela oncoproteína viral E5. Esta proteína, além de induzir a expressão de VEGF por meio da ativação da ERK, estabiliza a própria molécula de VEGF, potencializando a angiogênese tumoral (Bonab *et al.*, 2021).

Sob condições fisiológicas, a via MAPK ERK1/2 participa da regulação da proliferação celular ao modular os níveis de proteínas da família Bcl-2, como a proteína pró-apoptótica BIM e a proteína antiapoptótica MCL-1, além de inibir a apoptose mediada pelo receptor de morte Fas ou pelos receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021).

No entanto, a literatura descreve um papel dual para essa via dependendo do tipo celular e do estímulo. A hiperativação da ERK pode induzir apoptose tanto por via extrínseca mediada pela caspase 8 quanto intrínseca mediada pela liberação do citocromo c e ativação da caspase 9 (Yue; Lopez, 2020). A atividade de ERK influencia diretamente a morte celular ao modular diversos processos celulares, incluindo a disfunção mitocondrial (Yuan *et al.*, 2021), a resposta ao dano no DNA (Rezatabar *et al.*, 2019), o estresse do retículo endoplasmático (Luo *et al.*, 2022), a modulação da autofagia (Zhang *et al.*, 2016), além de provocar desequilíbrios metabólicos, como o aumento da glicólise com produção concomitante de lactato (Papa; Choy, 2019) e o acúmulo de EROs (Rezatabar *et al.*, 2019).

Nesse sentido, estudos demonstram o efeito antitumoral associado à ativação da via ERK1/2. Li e colaboradores (2021) observaram que nanopartículas de prata carregadas com doxorrubicina ativaram a via de sinalização ERK1/2, desempenhando um papel crucial no efeito sinérgico entre DOX-AgNTs e a terapia fototérmica (PTT) na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. A ativação da ERK1/2 promoveu a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c, desencadeando a cascata de eventos a jusante e, consequentemente, induzindo a apoptose celular.

Nesse contexto, a busca por novas terapias capazes de modular a via de sinalização ERK1/2 mostra-se uma estratégia promissora para o tratamento do câncer.

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

A via de sinalização JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), também conhecida como proteína quinase ativada por estresse (*Stress-Activated Protein Kinase*, SAPK), é composta por três genes principais em humanos: *JNK1*, *JNK2* e *JNK3*. As isoformas JNK1 e JNK2 são expressas de forma ubíqua em diferentes tecidos, enquanto a expressão de JNK3 é mais restrita, ocorrendo predominantemente no cérebro, coração, testículos e células pancreáticas (Nakano et al., 2020; Garg et al., 2021).

Essa via é ativada predominantemente em resposta a estímulos de estresse, como radiação UV, estresse oxidativo, hipóxia, além de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-1 (IL-1) (Abdelrahman et al., 2021). A cascata de ativação da JNK segue o modelo clássico das MAPKs e envolve múltiplos níveis de quinases. Inicialmente, as proteínas MAP3K e MAP4K ativam as quinases MAP2K específicas de JNK, MKK4 e MKK7, que então fosforilam resíduos conservados de treonina e tirosina na própria JNK, resultando em sua ativação. Este processo é finalmente regulado por proteínas de andaime, como as proteínas que interagem com JNK (JIP1, JIP2 e JIP3), proteínas contendo domínio SH3, como POSH (*Plenty of SH3s*), e a proteína associada ao complexo I-B quinase (IKAP), que organizam espacialmente o complexo de sinalização e conferem maior especificidade ao processo (Hammouda et al., 2020).

Uma vez ativada, a JNK transloca-se para o núcleo e fosforila diversos fatores de transcrição, incluindo c-Jun, c-Fos, ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*) e p53, modulando a expressão de genes relacionados à sobrevivência e à morte celular. Além dos fatores de transcrição, JNK também regula proteínas da família Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-xL, Bim e BAD, influenciando diretamente a integridade mitocondrial e a ativação da via intrínseca da apoptose (Tam; Law, 2021).

A via JNK desempenha um papel central na regulação de processos fisiológicos, como a progressão do ciclo celular, adesão, sobrevivência celular e apoptose (Behboudi et al., 2024). Além disso, está envolvida em diversos processos patológicos, incluindo disfunções metabólicas como a obesidade, inflamações crônicas (Garg et al., 2021), doenças neurodegenerativas como Huntington e Parkinson (Corrales; Losada-Pérez; Casas-Tintó, 2021), bem como psoríase e câncer

(Hammouda *et al.*, 2020).

Estudos indicam que a JNK1 contribui para a sobrevivência de células cancerígenas, como observado em pacientes com câncer colorretal, nos quais há uma associação positiva com a proteína JNK (Du *et al.*, 2023). Além disso, foi demonstrado que a ativação da via de sinalização JNK pode promover a oncogênese do câncer nasofaríngeo por meio de diferentes mecanismos e interações com o microambiente tumoral (Pua *et al.*, 2022). Outro estudo identificou que a via de sinalização da JNK mediada pela sinalização EGFR encontra-se ativada no câncer do colo do útero, favorecendo a proliferação e a sobrevivência das células tumorais (Morgan *et al.*, 2021).

Contudo, a superativação dessa via pode induzir apoptose como mostrou o estudo de Stulpinas e colaboradores (2024) em que a cisplatina em 7,5 µg/mL torna-se letal em combinação com o inibidor de JNK SP600125 na viabilidade celular de câncer de pulmão (A549). Outro estudo de Tanimura e colaboradores (2021), mostraram redução significativa da viabilidade de células de câncer de pulmão de células não pequenas quando tratadas com os inibidores da linfoma quinase-tirosina quinase (ALK-TKIs) na presença do inibidor de JNK (SP600125), melhorando significativamente o efeito terapêutico dos ALK-TKIs.

Diante do exposto, a busca por compostos que atuem modulando a via JNK torna um alvo terapêutico para o câncer.

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

Em células sadias, a p38 atua como um sensor de estresse fisiológico, regulando processos fundamentais como controle do ciclo celular, diferenciação, resposta inflamatória e apoptose. São descritas quatro isoformas da p38: p38α, p38β, p38γ e p38δ, cujos níveis de expressão variam de acordo com o tipo celular e tecido (Sanz-Ezquerro; Cuenda, 2021).

A isoforma p38α, amplamente expressa, é crítica para o desenvolvimento embrionário normal, principalmente por sua atuação na vasculogênese e morfogênese placentária. A p38β, por sua vez, apresenta expressão predominante em cérebro, coração e pulmões, sugerindo funções regulatórias específicas nesses órgãos. As demais isoformas apresentam expressão tecidual específica e funções

especializadas, como a p38 γ no músculo esquelético e a p38 δ nos rins e pulmões (Martínez-Limón *et al.*, 2020).

A ativação da p38 ocorre principalmente por meio das quinases MKK3 e MKK6, que fosforilam e ativam as diferentes isoformas de maneira distinta. A MKK6 é capaz de ativar todas as isoformas, enquanto a MKK3 apresenta seletividade, ativando principalmente p38 β , p38 γ e p38 δ em resposta a estímulos como TNF- α , radiação UV e anisomicina. Além disso, a p38 δ também pode ser ativada por MKK4, e há evidências de que p38 γ pode ser ativada tanto por MKK3 quanto por MKK6. (Kudaravalli; Den Hollander; Mani, 2022).

A ativação de MKK3 e MKK6 ocorre por meio da fosforilação de resíduos conservados por diversas MAP3Ks, incluindo ASK1, TAK1, DLK1, TAO1/2, TPL2, MLK3, MEKK3/4 e ZAK1, diferentes resíduos fosforilados podem ter correlação com a sobrevivência. A regulação desta via é realizada por fosfatases como DUSP1, DUSP10 e DUSP16 (Burton *et al.*, 2021).

A via p38 tem sido associada a diversas doenças, incluindo o câncer. Estudos demonstram que a isoforma p38 α é essencial para a progressão tumoral em um modelo murino de câncer de mama, onde sua deleção comprometeu a resposta ao dano no DNA, aumentou o estresse replicativo, os danos ao DNA e a instabilidade cromossômica (CIN). Ainda nesse modelo, a deleção da isoforma p38 δ foi capaz de reduzir significativamente o volume tumoral (Wada *et al.*, 2017).

Corroborando esses achados, uma análise imunohistoquímica realizada por Leelahavanichkul e colaboradores (2014) revelou que a proteína p38 estava hiperativada em 79% das mais de 400 amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço humano avaliadas.

Além disso, Tomas-Loba e colaboradores (2019) demonstraram que a via p38 é fundamental na tumorigênese hepática. Em hepatócitos de camundongos, a ativação da p38 promove a proliferação celular após hepatectomia parcial, por meio da fosforilação da proteína supressora tumoral do retinoblastoma (RB) em resíduos-alvo de CDK. A ausência da p38, ou a inibição farmacológica dessa via, foi capaz de proteger os animais contra a formação de tumores hepáticos induzidos quimicamente.

A especificidade funcional entre as isoformas da p38 também tem sido observada em outros contextos. Por exemplo, em células de câncer de mama MCF-7, a isoforma p38 β estimula a transcrição dependente de AP-1 e a proliferação celular, enquanto p38 δ e p38 γ exercem efeitos inibitórios sobre esses processos (Pramanik

et al., 2003).

Em adição, a via de sinalização da p38 também apresenta atividade pleiotrópica, sendo fundamental para a ação de diversos quimioterápicos, como cisplatina, irinotecano, 5-fluorouracil (5-FU) e sorafenibe, os quais dependem da ativação dessa via para induzir efeitos pró-apoptóticos (Igea; Nebreda, 2015; Martínez-Limón *et al.*, 2020).

Diante disso, compostos capazes de modular a via da p38 despontam como estratégias promissoras no desenvolvimento de terapias antitumorais mais eficazes.

2.4 Compostos de selênio e o SeB2

O selênio (Se) é um elemento químico pertencente ao grupo 16 da tabela periódica, juntamente com oxigênio, enxofre, telúrio e polônio dos calcogênios, classificado como um mineral não metálico (Sicius, 2024). Embora em sua forma inorgânica isolada não apresente atividade biológica significativa, quando ligado a compostos orgânicos, especialmente aminoácidos como a selenometionina e a selenocisteína, passa a desempenhar funções biológicas e nutricionais fundamentais, sendo considerado essencial para a manutenção da homeostase metabólica (Rua *et al.*, 2023).

Trata-se de um oligoelemento vital para a saúde humana, embora não seja essencial para as plantas. Dentre as selenoproteínas mais relevantes, destacam-se a glutathione peroxidase (GPx), a selenoproteína P e a tioredoxina redutase, todas envolvidas na eliminação de EROs e na manutenção do equilíbrio redox celular (Zakeri *et al.*, 2021).

A deficiência (< 100 µg/dia) de selênio está associada a diversas condições clínicas, como leuconiquia, leucodermia, retardo na cicatrização de feridas e distúrbios gestacionais (Hogan; Perkins, 2022). Por outro lado, níveis excessivos (> 350 µg/dia) desse elemento podem ser tóxicos, evidenciando a importância da manutenção de uma janela terapêutica estreita (Dávila-Vega *et al.*, 2023).

Além de sua atuação antioxidante, o selênio integra o sistema de defesa natural do organismo contra infecções (Hogan; Perkins, 2022). Em adição, dados da literatura sugerem efeitos benéficos dos compostos com selênio em sua constituição na prevenção e controle de diversas doenças, como hipertensão, doença arterial coronariana, doenças inflamatórias e certos tipos de câncer. Esses efeitos têm

motivado o crescente interesse no estudo de compostos contendo selênio como potenciais agentes terapêuticos, sobretudo no contexto oncológico (Radomska *et al.*, 2021).

A incorporação do Se em pequenos compostos orgânicos tem se mostrado uma abordagem promissora e segura para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer (Vinceti *et al.*, 2017). Estudos demonstram que células tumorais tendem a ser mais sensíveis a compostos contendo selênio do que àqueles sem esse elemento, tornando-se mais suscetíveis à indução de apoptose e à inibição da angiogênese após o tratamento (Ali *et al.*, 2021).

Em células saudáveis, esses compostos atuam predominantemente como agentes antioxidantes, contribuindo para a manutenção do estado redox. Isso se deve, em parte, à substituição do aminoácido cisteína por selenocisteína, o que confere maior proteção contra os efeitos tóxicos de EROs (Bjørklund *et al.*, 2022).

Notavelmente, a atividade biológica do selênio é dependente da concentração: em baixas doses, pode estimular o crescimento celular, enquanto em concentrações elevadas exerce efeito citotóxico. Dessa forma, compostos contendo selênio representam uma estratégia terapêutica promissora no combate ao câncer (Debnath *et al.*, 2022).

Diversos estudos demonstram que compostos de Se exercem efeitos antitumorais ao modularem a expressão gênica, vias de sinalização celular, mecanismos de reparo e dano ao DNA, além de influenciarem processos de angiogênese e metástase, principalmente por meio da indução de EROs e oxidação de grupos tiol de proteínas (Radomska *et al.*, 2021).

Segundo Huang e colaboradores (2021), os níveis de EROs foram significativamente mais elevados em células de câncer de ovário humano (A2780) tratadas com o composto de selênio N-heterocíclico de carbeno (2b) em comparação ao grupo controle, confirmando que o 2b induz a produção de ROS de forma dose-dependente. Esses resultados sugerem que a atividade antitumoral do 2b está relacionada à sua capacidade de desequilibrar a homeostase redox, promovendo o acúmulo de ROS nas células cancerígenas e levando à morte celular por estresse oxidativo.

Dai e colaboradores (2016) investigaram o efeito *in vitro* do selenito de sódio (Se) e da selenometionina (SeMet) sobre o colangiocarcinoma (CCA). Ambos os compostos inibiram o crescimento celular, induziram apoptose (via aumento da razão

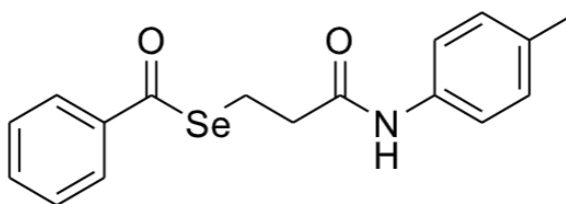
BAX/BCL-2) e suprimiram a migração celular, reduzindo a razão N-caderina/E-caderina, marcador de transição epitélio-mesênquima (EMT). Além disso, ambos aumentaram a expressão da selenoproteína M, cuja baixa expressão em tecidos tumorais foi associada a pior prognóstico em pacientes com CCA. Esses achados sugerem que o selênio pode atuar como um agente anticâncer promissor.

Outro composto, o Etaselen, demonstrou potencial em reverter a resistência a cisplatina em células de leucemia K562 resistentes (K562/CDDP), por meio da inibição da atividade da tiorredoxina redutase (TrxR) e da geração elevada de EROs. O tratamento com Etaselen aumentou a razão Bax/Bcl-2 nessas células, promovendo a liberação do citocromo c e ativação da via de caspases, o que favorece a apoptose. Esses efeitos, ausentes nas células resistentes tratadas apenas com cisplatina, indicam que o Etaselen pode restaurar a sensibilidade ao fármaco ao modular o estresse oxidativo e as vias mitocondriais de morte celular (Ye et al., 2017).

Segundo Cruz e colaboradores (2016), compostos contendo selênio e estruturas de quinona apresentaram potente efeito antitumoral contra diversas linhagens celulares humanas, incluindo HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-116 (carcinoma de cólon), PC3 (próstata), SF295 (glioblastoma), MDA-MB-435 (adenocarcinoma mamário triplo negativo) e OVCAR-8 (carcinoma de ovário). O efeito citotóxico foi associado à bioativação pelos altos níveis da enzima NAD(P)H:Quinona Oxidorredutase 1 (NQO1) presentes nas células tumorais, promovendo o acúmulo de EROs, estresse oxidativo e indução de morte celular seletiva. Esses resultados reforçam o potencial dos compostos à base de selênio como agentes antitumorais promissores.

Partindo desse pressuposto, foi sintetizado o *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) (Figura 10), um composto organosselado obtido com rendimento de 59% e ponto de fusão entre 128–130 °C. As análises espectroscópicas confirmaram a presença de carbonos de grupos carbonila, aromáticos e alifáticos, incluindo o grupo metila e as posições esperadas dos carbonos de anéis aromáticos e do sistema etilenolactâmico (De Sousa et al., 2023).

Figura 10. Estrutura molecular do *N*-(4-metilfenil)benzoseleno etilenolactamida (SeB2)



Estudos demonstraram atividade antimicobacteriana promissora desse composto. Em testes *in vitro*, SeB2 foi capaz de inibir o crescimento de cepas laboratoriais de *Mycobacterium tuberculosis*, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 10 μ M. Além disso, mostrou-se eficaz contra isolados clínicos multirresistentes, com potência comparável à observada em cepas sensíveis. Notavelmente, SeB2 apresentou melhor desempenho do que a isoniazida em culturas de *M. tuberculosis* em estado de latência induzido por privação nutricional. Esses achados indicam que SeB2 possui potencial terapêutico, especialmente frente a formas resistentes ou dormentes da tuberculose (De Sousa *et al.*, 2025).

Além disso, o SeB2 se destacou por sua significativa atividade antiparasitária contra múltiplas espécies de *Leishmania*. O composto apresentou valores de CI_{50} inferiores a 20 μ M para todas as cepas testadas, com 5,23 μ M para *L. braziliensis*, 7,36 μ M para *L. infantum*, 5,7 μ M para *L. major* e 15,3 μ M para *L. amazonensis*. Esses resultados são consistentes com as probabilidades de atividade anti-leishmania previstas, que variaram de 44% a 68%, o que reforça a precisão do modelo computacional. A atividade de amplo espectro e os baixos valores de CI_{50} sugerem que o SeB2 exerce um efeito biológico significativo (De Sousa *et al.*, 2023).

Diante dos resultados promissores apresentados pelo composto SeB2, o presente estudo reforça a importância da investigação de organocomplexos de selênio como candidatos terapêuticos no combate ao câncer. A significativa atividade citotóxica demonstrada frente a diferentes linhagens de *Leishmania* e *Mycobacterium tuberculosis* sugere que o SeB2 é capaz de interferir em processos celulares vitais, possivelmente por meio da indução de estresse oxidativo e de mecanismos de morte celular, eventos também centrais na fisiopatologia tumoral.

Com base nesses achados, sustenta-se a hipótese de que o SeB2 apresenta potencial efeito antitumoral, atuando na modulação de vias bioquímicas associadas à proliferação e sobrevivência de células cancerígenas. Assim, este trabalho se propôs a explorar alternativas terapêuticas mais eficazes e seletivas, contribuindo para o

avanço científico no desenvolvimento de compostos bioativos à base de selênio e no enfrentamento de doenças complexas como o câncer.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do SeB2 em linhagem de câncer do colo do útero

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do SeB2 em diferentes linhagens de células tumorais humanas (SK-MEL-28, HeLa, HCT-116, MCF-7) e em linhagem de células sadias de rim embrinário humana HEK293;
- Determinar o índice de seletividade (IS) do SeB2;
- Avaliar o tipo de morte induzido pelo SeB2 (apoptose ou necrose) em células HeLa;
- Avaliar o efeito do SeB2 sobre o estado redox em células HeLa;
- Investigar o envolvimento das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos na citotoxicidade induzida pelo SeB2.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

Os ensaios farmacológicos *in vitro* do *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) foram realizados no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar) - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPB), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB), bem como no Laboratório de Biofotônica do Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Amostra teste

O composto (SeB2) foi sintetizado no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) do Departamento de Química (DQ) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – pela Me. Natália Ferreira de Sousa, conforme descreve De Sousa e colaboradores (2023), e cedido pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e Dr. Helivaldo Diogenes da Silva Souza.

Em resumo, foi realizada a síntese orgânica tradicional sob aquecimento e agitação magnética, seguido de purificação por recristalização. A caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia no IV (ATR), RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os dados espectroscópicos confirmaram a formação do composto, com destaque para as bandas em 3296 cm^{-1} (N–H), 1674 cm^{-1} (Se–CO) e 1658 cm^{-1} (N–CO), assim como para os deslocamentos químicos característicos observados nas análises de RMN.

O SeB2 apresentou rendimento de 59% e ponto de fusão entre $128\text{--}130\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Substâncias e reagentes

O azul de tripan, solução fosfato tamponada (PBS), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM), ácido 4-(2-hidroxietil)-1 piperazinoetanossulfônico (HEPES), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL), doxorubicina e laranja de acridina foram adquiridos na Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA. O soro fetal bovino (SBF), N-acetilcisteína (NAC), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), sulfato de magnésio (MgSO₄), sulfato de sódio (Na₂SO₄) e tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram adquiridos na GIBCO®, Grand Island, New York, EUA. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido na Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil. A L-glutamina foi adquirida na Nutricell®, Campinas, São Paulo, Brasil. O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foi adquirido na Êxodo Científica®, Sumaré, São Paulo, Brasil. Os marcadores JC-1, Hoechst 34580 e iodeto de propídeo foram adquiridos na Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA. Os inibidores de MAPKs SP600125, U-0126 e PD169316 foram adquiridos na Cayman Chemical®, Ann Arbor, Michigan, EUA.

As drogas e as soluções reagentes foram preparadas imediatamente antes do uso.

4.2.3 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha), microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), cabina de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil), incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®, Vermont, EUA), autoclave vertical linha CS-A (Prismatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha), banho 70 maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Electrolux®, Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-

Württemberg, Alemanha).

4.2.4 Linhagens celulares tumorais e não tumoral humanas

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as seguintes linhagens celulares humanas: SK-MEL-28 (melanoma), HeLa (câncer cervical), HCT-116 (carcinoma de cólon), MCF-7 (câncer de mama) e HEK-293 (células epiteliais de rim embrionário), conforme apresentado no quadro 2.

Quadro 2. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas

Linhagens ^a	Tipo histológico	Origem	Meios de cultura ^b
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
HeLa	Carcinoma cervical	Humana	DMEM
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	RPMI
MCF-7	Carcinoma de mama	Humana	DMEM
HEK 293	Rim embrionário	Humana	DMEM

^aSK-MEL-28: linhagem celular de melanoma humano; HeLa: linhagem celular de câncer cervical humano; HCT-116: linhagem celular de carcinoma de cólon humano; MCF-7: linhagem celular de câncer de mama humano; HEK: linhagem celular sadia de rim embrionário humano. ^bDMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute 1640*.

Fonte: Elaborado pelo autor

As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil) e cultivadas nos seguintes meios de cultura: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) para as linhagens SK-MEL-28, HeLa, MCF-7 e HEK-293, e RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) para a linhagem HCT-116. Os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina-estreptomicina, e as culturas mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A manipulação das células foi realizada em fluxo laminar e o crescimento monitorado a cada 24 h. Quando as culturas atingiam aproximadamente 80% de confluência, procedia-se ao repique celular por adição de 2 mL de solução de tripsina e incubação por 5 min para desprendimento da monocamada aderida ao frasco de cultura. Em seguida, adicionava-se volume equivalente de meio suplementado com SBF para inativar a tripsina. As células foram centrifugadas a 500 × g por 5 min e ressuspensas em meio completo para contagem em câmara de Neubauer. A

viabilidade celular foi avaliada por exclusão do corante azul de tripan e a concentração ajustada para 5×10^4 células/mL entre os repiques.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparo da amostra

Para a realização dos ensaios farmacológicos, o SeB2 (1 mg) foi solubilizado em 72 μ L de DMSO (100%), obtendo-se uma solução-estoque com concentração final de 40 mM. A partir dessa solução-estoque foram preparadas diluições sucessivas para alcançar as diferentes concentrações de SeB2 utilizadas no tratamento das células. Em todas as condições experimentais, garantiu-se que a concentração final de DMSO por poço não ultrapassasse 1%.

4.3.2 Avaliação da citotoxicidade do SeB2 em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)

A citotoxicidade do SeB2 foi avaliada em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas por meio do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio difeniltetrazólio (MTT). O MTT é um sal amarelo permeável à membrana plasmática que, nas células viáveis, é reduzido, por desidrogenases mitocondriais, a cristais insolúveis de formazan de coloração roxa. A intensidade dessa coloração pode ser quantificada por espectrofotometria, sendo proporcional ao número de células metabolicamente ativas presentes no poço (Mosmann, 1983).

As células foram semeadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações: 1×10^5 células/mL para SK-MEL-28 e MCF-7, 2×10^5 células/mL para HeLa e HEK 293 e 3×10^5 células/mL para HCT-116, adicionando-se 100 μ L por poço. Após 24 h de aderência, foram adicionados 100 μ L das soluções de SeB2 (2,34–200 μ M) ou doxorrubicina (DXR) (0,16–20 μ M), todas solubilizadas em DMSO a uma concentração final de 1%. Após os tratamentos, em um primeiro conjunto de experimentos, as células foram incubadas por 72 h a 37 °C e 5% de CO₂. Na sequência, foi realizado um novo conjunto de experimentos em que células da linhagem HeLa foram incubadas também por 24 e 48 h. Decorrido o tempo de incubação, retiraram-se 110 μ L do sobrenadante e adicionou-se 10 μ L da solução de MTT (5 mg/mL), seguindo-se de incubação por mais 4 h nas mesmas condições. Os

cristais de formazan formados foram dissolvidos com SDS (100 µL), e a densidade óptica foi quantificada a 570 nm em leitor de microplacas (Duarte *et al.*, 2022). Os dados obtidos foram usados para determinar a CI_{50} (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular). Foram realizados três experimentos independentes com cinco replicatas para cada linhagem celular. O Índice de Seletividade (IS) foi calculado de acordo com a fórmula descrita a seguir:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem celular não tumoral (HEK 293)}}{CI_{50} \text{ da linhagem celular tumoral}}$$

4.3.3 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo SeB2

4.3.3.1 Análise morfológica de células HeLa por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo

Foi realizada a análise morfológica de células HeLa por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP), após tratamento com o composto SeB2. A LA é um corante fotossensibilizador, metacromático, permeável às membranas celulares e com alta afinidade por ácidos nucleicos (Gao *et al.*, 2020). Em células viáveis, liga-se RNA e DNA citoplasmático e nuclear (Bankó *et al.*, 2021). Por sua vez, o IP é um corante que depende da perda da integridade da membrana plasmática; quando isso ocorre, intercala-se ao DNA, permitindo a detecção de células necróticas ou em estágio avançado de apoptose (Baskić *et al.*, 2006).

Nesse ensaio, as células HeLa foram semeadas em placas de 24 poços, na concentração de 2×10^5 células/mL, e tratadas com o composto SeB2 nas concentrações de 2,5; 5 ou 10 µM, correspondentes, respectivamente, à metade da concentração que inibe 50% do crescimento das células (CI_{50}), à CI_{50} e ao dobro da CI_{50} . Como droga padrão, foi utilizada a doxorrubicina (DXR) na concentração de 4 µM, equivalente à sua CI_{50} . Os compostos foram previamente dissolvidos em DMSO, garantindo que a concentração final de solvente não ultrapassasse 1%. Após 24 horas de incubação, as células foram coletadas, centrifugadas ($500 \times g$, 5 minutos, 20 °C), ressuspensas em PBS e coradas com LA (1 mg/mL) e IP (10 µg/mL). As células recém-coradas foram observadas em microscópio confocal de varredura a laser, com ampliação de 4000x, utilizando os 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. Foram capturadas imagens de quatro campos aleatórios para cada amostra, em um total de três experimentos independentes em duplicata. A contagem das células por campo foi realizada por meio do *software Image J*. (Sousa *et al.*, 2023).

Os critérios estabelecidos para contagem foram: a) células viáveis apresentavam núcleo verde claro e estrutura celular preservada; b) células em apoptose inicial exibiam núcleo verde intenso com cromatina condensada ou fragmentada; c) células em apoptose tardia mostravam áreas de condensação e fragmentação da cromatina evidenciadas por fluorescência alaranjada, resultante da sobreposição das colorações verde e vermelha, além da formação de *blebs* de membrana; e d) células necróticas ou mortas eram coradas exclusivamente em vermelho (Renvoisé *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2018).

4.3.3.2 Análise de alterações nucleares em células HeLa após marcação com Hoechst 34580

O corante Hoechst 34580 é amplamente utilizado para marcação da cromatina, sendo permeável à membrana celular e emitindo fluorescência azul intensa. Trata-se de um agente não intercalante que se liga preferencialmente ao sulco menor do DNA, com afinidade aumentada por regiões ricas em pares de bases adenina-timina (A–T). Essa propriedade torna o Hoechst 34580 uma ferramenta eficaz para a avaliação de alterações nucleares associadas à apoptose, tais como condensação e/ou fragmentação da cromatina e encolhimento nuclear (picnose). (Bucevičius; Lukinavičius; Gerasimaitė, 2018).

Para este ensaio, as células HeLa foram semeadas em placas de 24 poços, na concentração de 5×10^4 células/mL, e incubadas a 37° C com 5% de CO₂. Após 24 h, foram expostas ao SeB2 (5 ou 10 µM) ou DXR (4 µM) e mantidas em incubação por mais 24 h. Posteriormente, foram ressuspensas em PBS e coradas por 20 minutos com 20 µL de Hoechst a 10 µg/mL, à temperatura ambiente e protegidas da luz. A análise foi realizada em microscópio confocal de varredura a laser, com 4000x de amplificação, utilizando laser de excitação a 405 nm e coleta de emissão na faixa de 410-600 nm. Foram capturadas quatro imagens de campos aleatórios por amostra, totalizando três experimentos independentes em duplicata. A fluorescência foi quantificada por meio do *software Image J*.

4.3.3.3 Marcação de células HeLa com JC-1 e análise por microscopia confocal de varredura a laser

O cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é um corante lipofílico, permeável à membrana, que se acumula seletivamente nas mitocôndrias e exibe fluorescência verde (monômeros) em baixos potenciais de membrana e fluorescência vermelha (agregados J) em potenciais elevados. Assim, a despolarização mitocondrial é indicada por uma redução na razão fluorescência vermelha/verde (Smiley et al., 1991).

Para este ensaio, as células HeLa foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^4 células/mL) e incubadas a 37° C com 5% de CO₂. Após 24 h, foram tratadas com SeB2 (5 ou 10 µM) ou cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP a 4 µM) utilizado como controle positivo, por cinco minutos. Em seguida foi adicionado 10 µL de JC-1 a 2,5 µM por 15 minutos nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas em microscópio confocal de varredura a laser, com 4000x de amplificação, utilizando laser de excitação a 488 nm e coleta de emissão na faixa de 520-542 e 580-614 nm. Foram capturadas quatro imagens de campos aleatórios por amostra, em um total de três experimentos independentes em duplicata. A fluorescência foi quantificada por meio do *software Image J*.

4.3.3.4 Avaliação da citotoxicidade do SeB2 na presença ou ausência de N acetilcisteína (NAC)

A *N*-acetilcisteína (NAC) é uma molécula antioxidante que atua reduzindo ligações dissulfetos, eliminando radicais livres e servindo de precursor para a biossíntese de glutathiona (Kwon, 2021). Nesse contexto, foi avaliada a influência das EROs no efeito citotóxico do SeB2 em células pré-tratadas com NAC.

Para isto, as células HeLa foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 2×10^5 células/mL. Após 24 h, as células foram incubadas na presença ou ausência da NAC (5 mM) por mais 4 h. Decorrido este período, as células foram tratadas com 5 ou 10 µM do SeB2 ou 4 µM de DXR. Após incubação por 72 h, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h. O formazan depositado foi dissolvido com SDS *overnight*

(Yedjou; Tchounwou, 2007) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm e usadas para determinar a viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata.

4.3.3.5 Avaliação da citotoxicidade do SeB2 na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

Para avaliar o envolvimento das vias de MAPKs na citotoxicidade do SeB2, células HeLa foram pré-tratadas com inibidores específicos das proteínas MEK/ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD169316). Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 2×10^5 células/mL. Após 24 horas de incubação, foram tratadas por uma hora na presença ou ausência dos inibidores: U0126 (5 μ M), SP600125 (20 μ M) ou PD169316 (20 μ M). Em seguida, as células foram expostas ao SeB2 na concentração de 5 μ M ou à DXR a 4 μ M. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionada solução de MTT (5 mg/mL), com nova incubação por 4 horas. O formazan formado foi solubilizado com SDS e incubado *overnight*, conforme descrito por Sousa (2025). As densidades ópticas foram medidas em leitor de microplacas a 570 nm e utilizadas para o cálculo da viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes, cada um em quadruplicata.

4.3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

A análise estatística 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. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da razão entre a CI_{50} da célula não tumoral pela CI_{50} da célula tumoral (Ferreira *et al.*, 2023).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade do SeB2 em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas

O SeB2 mostrou perfis de citotoxicidade diferentes dependendo da linhagem celular em que foi testado. Observa-se que as linhagens que apresentaram menor sensibilidade ao composto foram SK-MEL-28 e HCT-116 com CI_{50} maior que 100 μM , seguidas pela linhagem MCF-7, que apresentou CI_{50} de $84,14 \pm 7,84 \mu M$. Por outro lado, células da linhagem de câncer cervical HeLa demonstraram maior sensibilidade ao SeB2, com CI_{50} de $5,03 \pm 0,32 \mu M$. Em relação a linhagem sadia de rim embrionário humano (HEK 293), o valor de CI_{50} de $30,20 \pm 2,70 \mu M$ foi obtido para o SeB2, enquanto a DXR apresentou uma CI_{50} de $0,51 \pm 0,03 \mu M$ para a mesma linhagem.

A partir dos valores de CI_{50} foi então calculado o Índice de Seletividade (IS) utilizando a linhagem HEK 293 como modelo de célula não tumoral. O SeB2 apresentou valor de IS de 6,00 para a linhagem HeLa, enquanto a DXR apresentou valor de IS de 0,13 para a mesma linhagem (Tabela 1).

Diante dos resultados de citotoxicidade e IS obtidos, a linhagem HeLa foi escolhida para os próximos ensaios experimentais. Então, na sequência, foi realizado um novo conjunto de experimentos para avaliar a citotoxicidade do SeB2 após 24, 48 e 72 h de tratamento.

Tabela 1. Citotoxicidade do *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas após 72 h de tratamento avaliado pelo ensaio do MTT

Linhagens celulares ^a	^b CI ₅₀ (μM)		^c IS	
	SeB2	^d DXR	SeB2	DXR
HeLa	5,03 ± 0,32	3,80 ± 1,10	6,00	0,13
MCF-7	84,14 ± 7,84	1,53 ± 0,20	0,36	0,33
SK-MEL-28	> 100	3,55 ± 1,67	-	0,14
HCT-116	> 100	2,57 ± 0,00	-	0,19
HEK293	30,22 ± 2,70	0,51 ± 0,03	-	-

^aHeLa: linhagem celular de câncer cervical humano; MCF-7: linhagem celular de câncer de mama humano; SK-MEL-28: linhagem celular de melanoma humano; HCT-116: linhagem celular de carcinoma de cólon humano; HEK: linhagem celular de rim embrionário humano. ^bConcentração que inibe 50% do crescimento das células; ^cIS: Índice de seletividade (CI₅₀ linhagem não tumoral HEK293/CI₅₀ linhagem tumoral); ^dDXR: Doxorubicina. 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%.

Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme apresentado na Tabela 2, o SeB2 mostrou perfil de citotoxicidade semelhante em células HeLa após 24 e 48 h de tratamento (CI₅₀ de 11,64 ± 1,17 μM e 9,81 ± 0,81 μM, respectivamente), ao passo que a maior citotoxicidade foi observada após 72 h de tratamento (CI₅₀ de 5,03 ± 0,32 μM). Em células HEK293, o valor de CI₅₀ foi superior a 100 μM em 24 horas, enquanto em 48 e 72 h de tratamento os valores foram de 31,9 ± 5,81 μM e 30,22 ± 2,70 μM, respectivamente.

Tabela 2. Citotoxicidade do *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) em células de colo uterino (HeLa) após 24, 48 e 72 h de tratamento avaliado pelo ensaio do MTT

Linhagem celular ^a	^b Cl ₅₀ (μM)			
	SeB2			DXR
	24 h	48 h	72 h	72 h
HeLa	11,64 ± 1,17	9,81 ± 0,81	5,03 ± 0,32	3,80 ± 1,10
HEK293	>100	31,9 ± 5,81	30,22 ± 2,70	0,51 ± 0,03

^aHeLa: linhagem celular de câncer cervical humano; HEK293: linhagem celular de rim embrionário humano ^bConcentração que inibe 50% do crescimento das células. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de Cl₅₀ obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaborado pelo autor

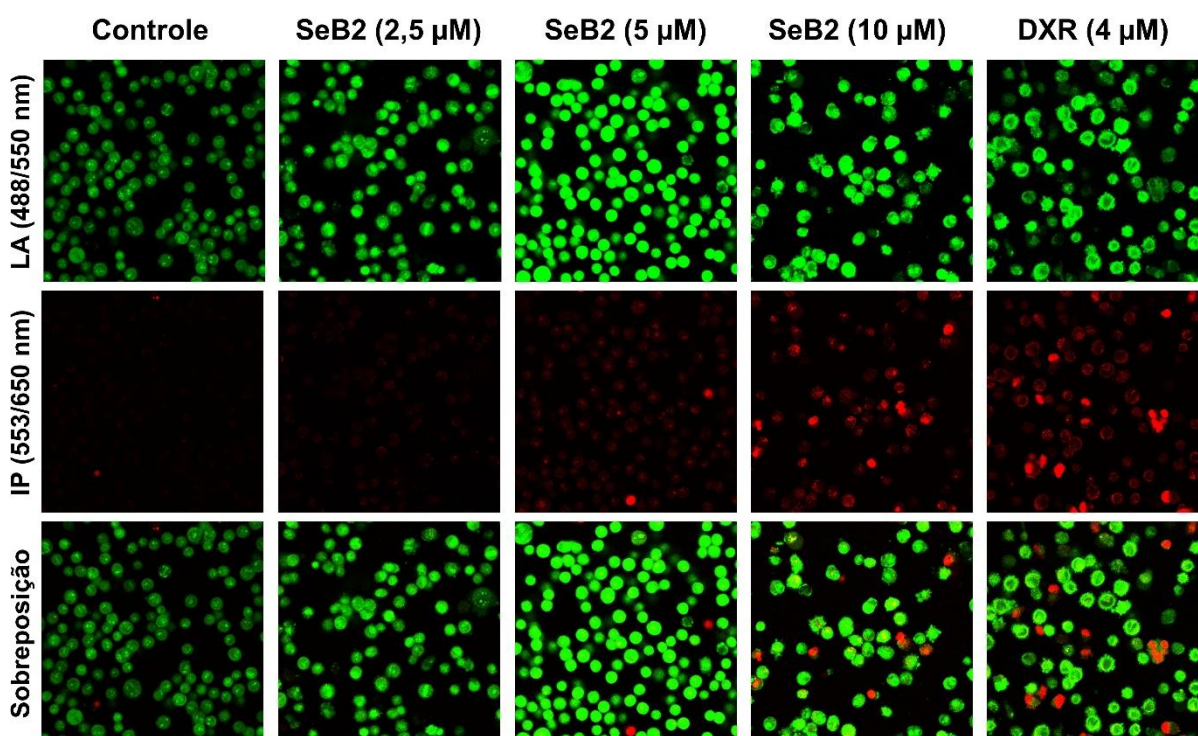
5.2 SeB2 induz morte celular por apoptose pela via intrínseca

5.2.1 Marcação de células HeLa com laranja de acridina e iodeto de propídeo

As figuras 11 e 12 exibem imagens representativas das alterações morfológicas características de apoptose induzidas pelos tratamentos com SeB2 e doxorubicina.

A figura 13 apresenta o percentual de células HeLa marcadas com LA e/ou IP após 24 horas de tratamento com SeB2 (2,5; 5; ou 10 μM) ou doxorubicina (4 μM). O SeB2 promoveu aumento significativo no percentual de células com características de apoptose inicial (2,5 μM: 86,23 ± 3,56%; 5,0 μM: 78,34 ± 8,77%; e 10 μM: 35,62 ± 8,06%, $p < 0,05$ para todos) e tardia/necrose (10 μM: 64,38 ± 8,06%, $p < 0,05$). Em relação à doxorubicina, 26,49 ± 8,67% das células apresentaram características de apoptose inicial, sendo também o percentual de células em apoptose tardia significativamente aumentado, atingindo 43,60 ± 3,75% quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

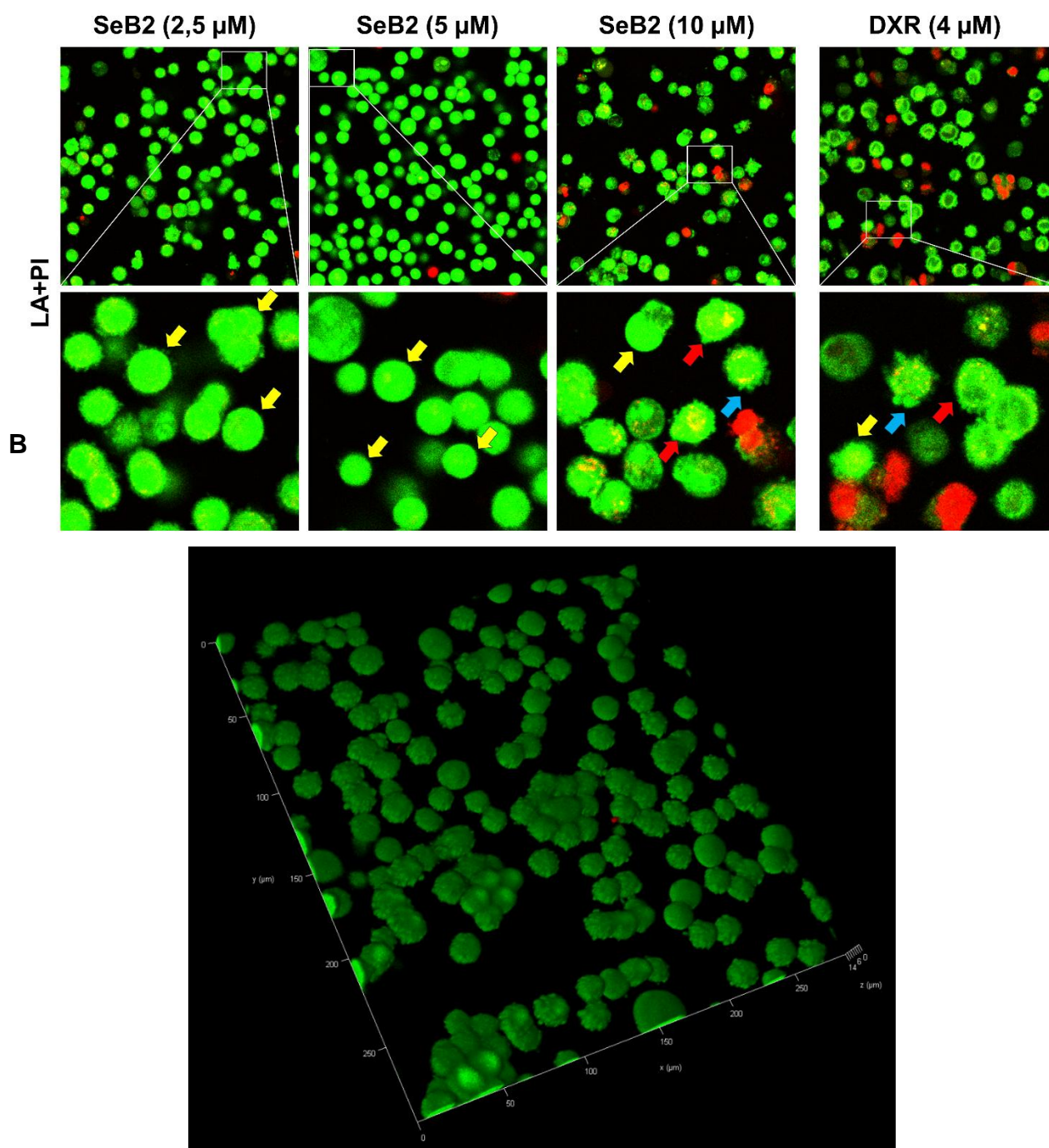
Figura 11. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) em células HeLa (câncer de colo do útero) incubadas com o *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina



Células HeLa foram tratadas por 24 horas com SeB2 (2,5; 5; ou 10 μ M) ou doxorubicina (DXR, 4 μ M), coradas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (PI), e analisadas por microscopia confocal a laser utilizando lasers de excitação em 488 e 552 nm, com detecção de emissão nas faixas de 510–541 nm e 639–701 nm, respectivamente. As células viáveis exibem núcleo verde-claro e morfologia preservada. As células em apoptose inicial apresentam núcleo verde-brilhante com condensação de cromatina. As células em apoptose tardia mostram áreas densas alaranjadas (sobreposição verde/vermelho), com condensação de cromatina e formação de *blebs* de membrana. Já as células necróticas apresentam coloração vermelha intensa no núcleo.

Fonte: Elaborado pelo autor

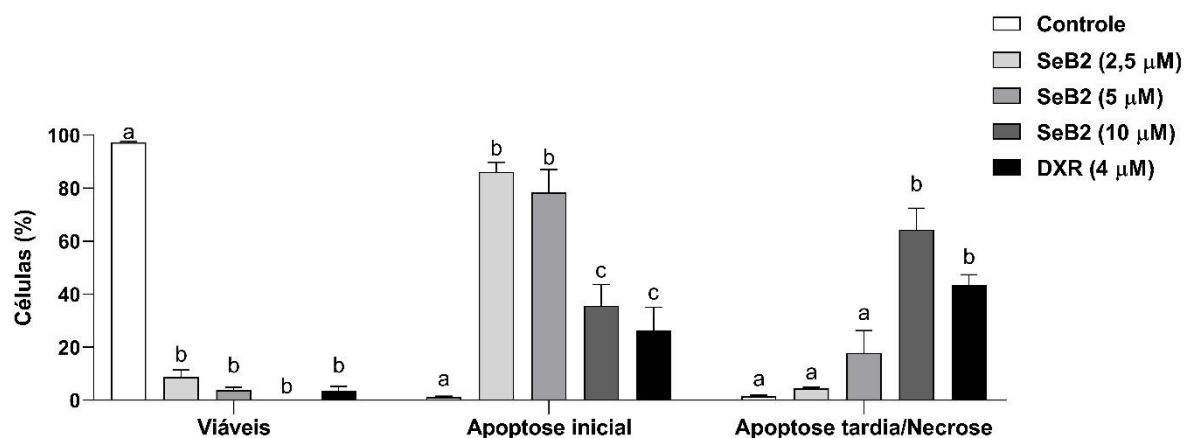
Figura 12. Imagens representativas de alterações celulares observadas na avaliação de apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células HeLa (câncer de colo do útero) incubadas com *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-tienolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) após 24h de tratamento



Células HeLa foram tratadas por 24 horas com SeB2 (2,5; 5; ou 10 μM) ou doxorubicina (DXR, 4 μM), coradas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (PI), e analisadas por microscopia confocal a laser. Em (A) a seta amarela indica condensação da cromatina; seta azul indica blebs de membrana e a seta vermelha indica fragmentação do DNA. Em (B), imagem representativa tridimensional das células tratadas com 5 μM de SeB2 por 24 h e duplamente marcadas com LA/IP, mostrando a formação de blebs de membrana.; barra de escala: 50 μm.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 13. Indução de apoptose pelo *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou pela doxorubicina (DXR), analisada por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) em células HeLa (câncer de colo do útero) após 24 h de tratamento



Porcentagem de células marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo após 24 h de tratamento com SeB2 e DXR. 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 para cada condição ($p < 0,05$).

DXR: Doxorubicina.

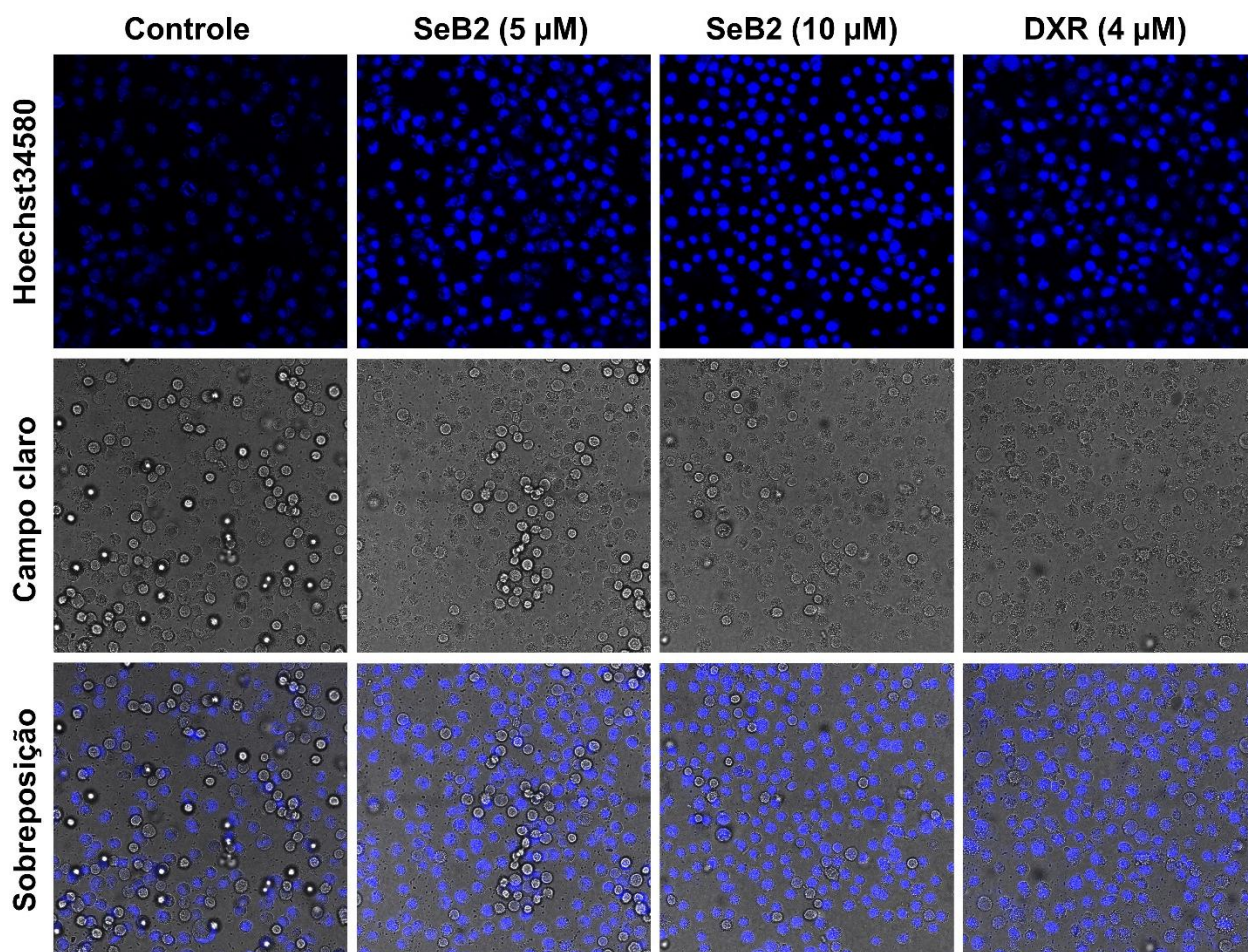
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Marcação de células HeLa com Hoechst 34580

A figura 14 exibe imagens representativas das mudanças morfológicas nucleares características de apoptose, induzidas pelos tratamentos com SeB2 ou DXR. A intensificação da fluorescência indica alterações nucleares compatíveis com o processo apoptótico, como condensação e fragmentação de cromatina.

A figura 15 apresenta o percentual de células fluorescentes marcadas com Hoeschst 34580 nas células HeLa após 24 h de tratamento com SeB2 (5 ou 10 µM) ou DXR (4 µM). Foram observados aumentos significativos da fluorescência em $85 \pm 7,16\%$ e $153 \pm 6,01\%$ nas células tratadas com 5 e 10 µM de SeB2, respectivamente, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). De forma semelhante, a droga padrão, DXR (4 µM), aumentou significativamente o percentual de fluorescência em $96 \pm 6,53\%$ em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 14. Imagens representativas de células HeLa (câncer de colo do útero) tratadas com *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) por 24 h e marcadas com Hoechst 34580

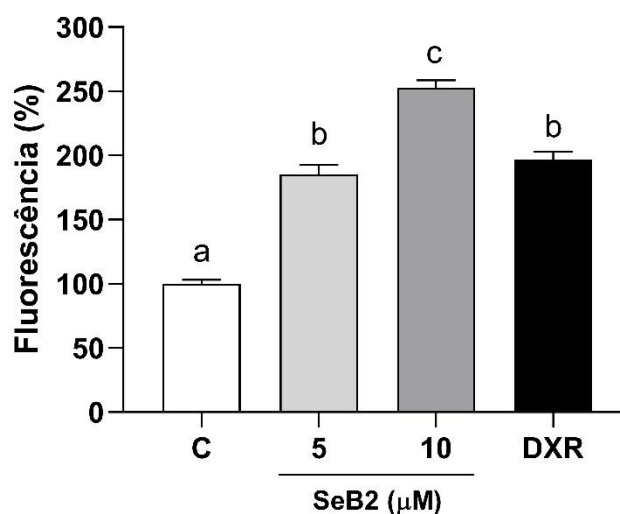


Células HeLa após 24 h de tratamento com SeB2 (5 e 10 μ M) e DXR (4 μ M), marcadas Hoechst 34580 e observadas por microscopia confocal a laser, utilizando-se o laser 405 nm e emissão na faixa de 410-600 nm.

DXR: doxorubicina;

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15. Indução de apoptose pelo *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) analisada por marcação com Hoechst 34580 em células HeLa (câncer de colo do útero) após 24 h de tratamento



Percentual de células fluorescentes marcadas com Hoeschst 34580 em células HeLa após 24 h de tratamento com SeB2 (5 e 10 μ M) ou DXR (4 μ M), analisadas por microscopia confocal a laser. A excitação foi realizada a 405 nm, com emissão coletada na faixa de 410–600 nm. Dados obtidos a partir de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguidos de *Tukey*. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

C: Controle;

SeB2: *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida

DXR: Doxorubicina;

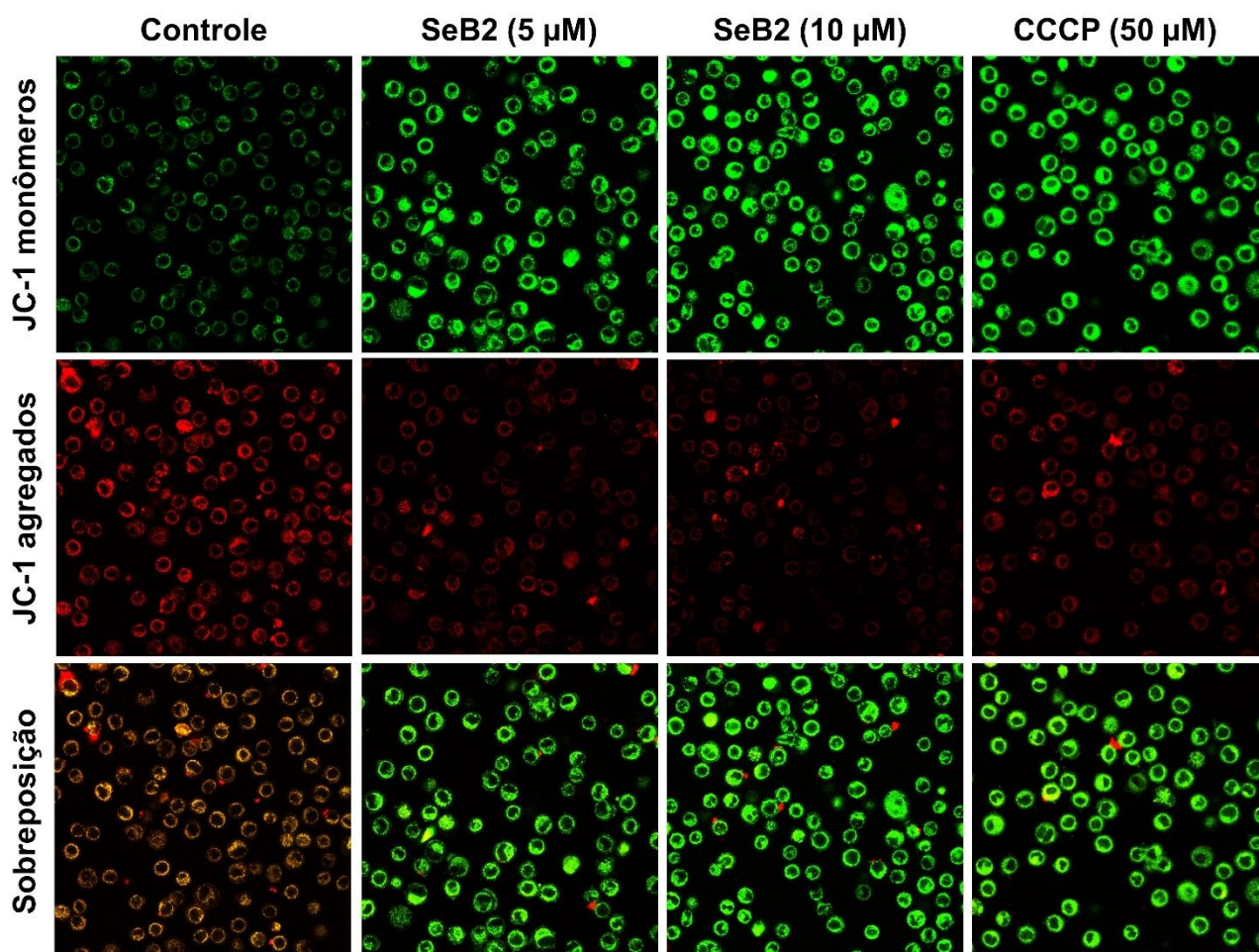
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3 Marcação de células HeLa com JC-1

A figura 16 apresenta imagens representativas da fluorescência de JC-1 na sua forma monomérica (verde), significando células com perda de potencial de membrana mitocondrial; e agregados (vermelho), indicando células com mitocôndrias íntegras, dos grupos tratados por 24 h com SeB2 (5 ou 10 μ M) ou CCCP (50 μ M) como controle positivo.

Os dados quantitativos são apresentados na figura 17 que mostra a razão de fluorescência entre os agregados de JC-1 e sua forma monomérica em células HeLa tratadas com SeB2 ou CCCP. Observou-se que o tratamento com SeB2 resultou em uma redução significativa da razão de fluorescência, que passou de 2,01 no grupo controle para 0,27 e 0,22 nas concentrações de 5 e 10 μ M, respectivamente ($p < 0,05$). Da mesma maneira, o controle positivo CCCP diminuiu significativamente a razão para 0,18, em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

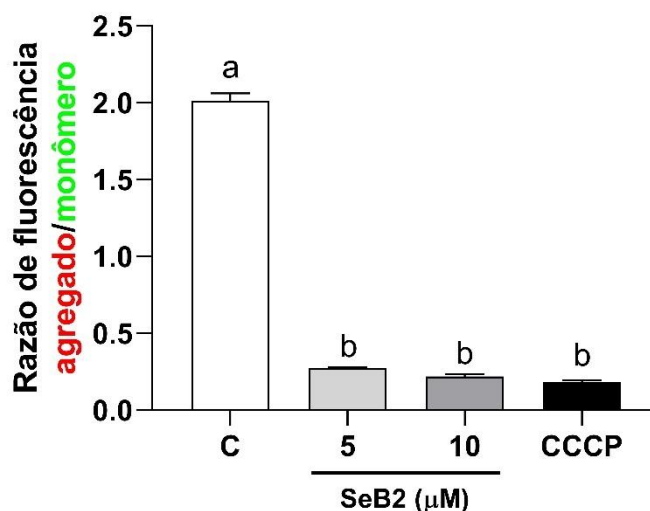
Figura 16. Imagens representativas da fluorescência do JC-1 em células HeLa (câncer de colo do útero) incubadas com *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR) por 24 h



Células HeLa após 24 h de tratamento com SeB2 (5 ou 10 μ M) ou CCCP (50 μ M) marcadas JC-1 e observadas por microscopia confocal a laser, utilizando o laser 488 nm, e emissão nas faixas de 520-542 e 580-614 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17. Razão de fluorescência agregado/monômero de *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida SeB2 ou doxorubicina (DXR) após 24 h de tratamento pelo ensaio de JC-1 em células HeLa (câncer de colo do útero)



Fluorescência dos agregados vermelhos em razão dos monômeros verdes do corante JC-1 em células HeLa após 24 h de tratamento com SeB2 (5 e 10 µM) ou CCCP (50 µM), analisadas por microscopia confocal a laser. A excitação foi realizada a 405 nm, com emissão coletada na faixa de 410–600 nm. Dados obtidos a partir de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de *Tukey*. Letras diferentes (a e b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

C: Controle;

DXR: Doxorubicina;

CCCP: Cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona;

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Citotoxicidade do SeB2 é dependente de estresse oxidativo

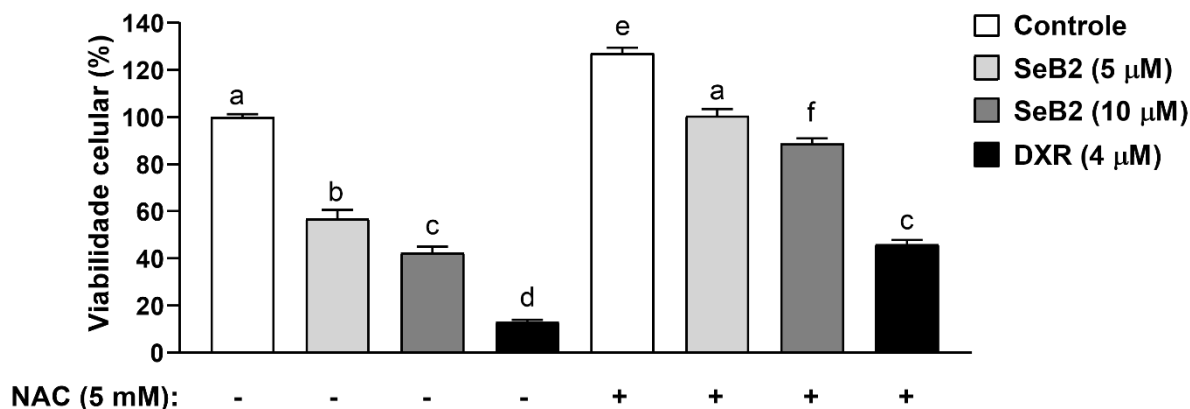
Conforme apresentado na figura 18, após 72 h de tratamento com o SeB2 (5 ou 10 µM) na ausência de N-acetilcisteína (NAC), pode-se observar redução significativa da viabilidade celular (5 µM: $56,94 \pm 3,69\%$; 10 µM: $42,37 \pm 2,60\%$), respectivamente, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($100,0 \pm 1,26\%$).

O pré-tratamento com NAC (5mM) preveniu significativamente o efeito citotóxico do SeB2, quando comparado aos grupos tratados com o SeB2 na ausência de NAC, nas respectivas concentrações testadas (5 µM na presença de NAC: $100,60 \pm 2,9\%$; 10 µM na presença de NAC: $88,71 \pm 2,28\%$, $p < 0,05$ para ambos).

Ainda na figura 6, no grupo tratado com a DXR (4 µM) na ausência de NAC, foi observada redução significativa da viabilidade celular ($13,01 \pm 0,89\%$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Como esperado, o efeito citotóxico da DXR foi

significativamente prevenido na presença do NAC ($45,93 \pm 1,92\%$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com DXR na ausência deste antioxidante.

Figura 18. Viabilidade celular (%) após tratamento de 72 h em células HeLa (câncer de colo do útero) com *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida SeB2 ou doxorubicina (DXR) na presença ou ausência *N*-acetilcisteína (NAC) avaliado pelo ensaio do MTT



Viabilidade de células HeLa (%) após 72h de tratamento com SeB2 ou DXR na presença ou ausência de NAC. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido de *Tukey*. Letras diferentes (a, b, c, d, e, f) indicam diferenças significativas entre as condições ($p < 0,05$).

DXR: doxorubicina;

NAC: N-acetilcisteína

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.5 Efeito do SeB2 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)

Observa-se na figura 19, o efeito do SeB2 na presença ou ausência de inibidores das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs).

Os gráficos A, B e C da figura 9 mostram a viabilidade celular (%) de células HeLa após 72 horas de tratamento com SeB2 (5 μM) ou (DXR, 4 μM), na presença ou ausência de inibidores das vias de MAPKs.

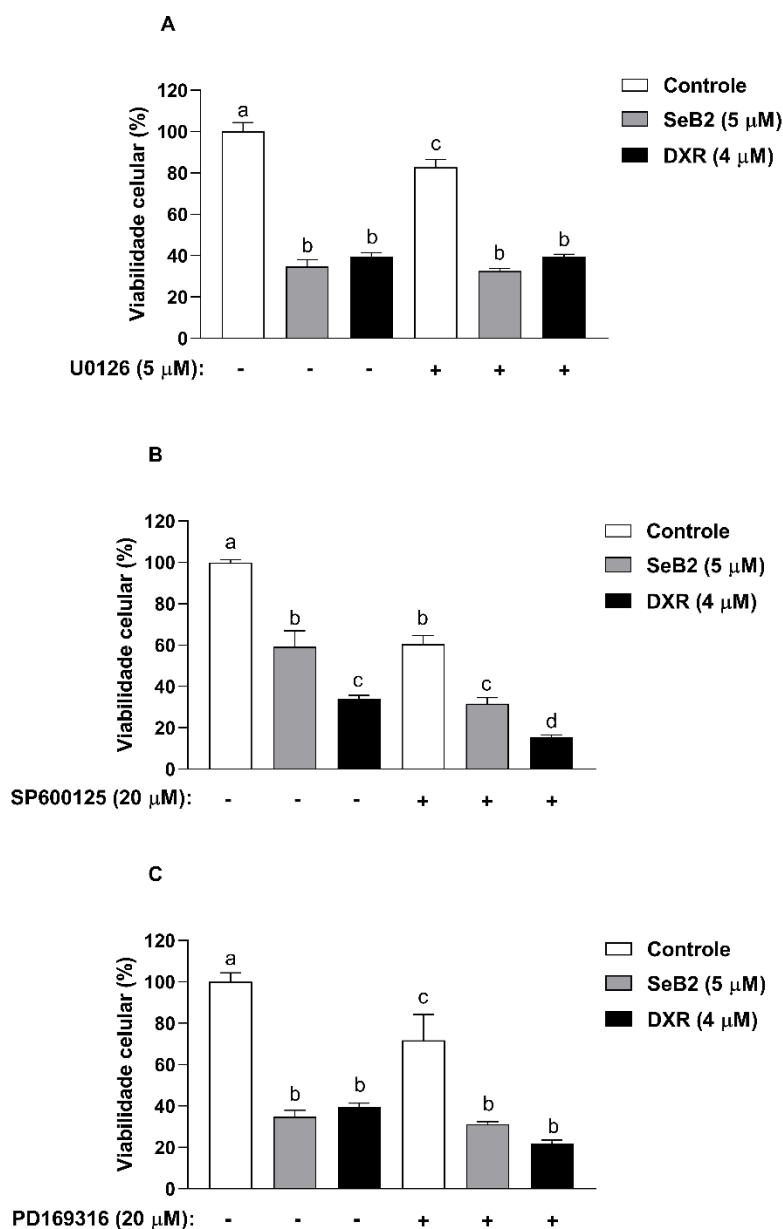
Na figura 19A, o tratamento com SeB2 nas concentrações de 5 μM, com DXR (4 μM), reduziu significativamente a viabilidade celular para $34,75 \pm 3,15\%$, em comparação ao controle sem inibidor de MEK/ERK1/2 – U0126, 5 μM ($100 \pm 4,36\%$; $p < 0,05$). A associação de SeB2 com o inibidor U0126 não promoveu alterações significativas na viabilidade celular em relação ao tratamento com SeB2 isoladamente. De forma semelhante, a combinação de DXR com U0126 também resultou em uma redução significativa da viabilidade ($39,50 \pm 1,14\%$) em relação ao controle, porém

sem diferença estatística quando comparada ao tratamento com DXR sem inibidor ($39,60 \pm 1,77\%$, $p < 0,05$).

Na Figura 19B, o tratamento com SeB2 a 5 μM , na presença do inibidor de JNK - SP600125, 20 μM , reduziu significativamente a viabilidade celular para $31,63 \pm 2,93\%$, em comparação ao tratamento com SeB2 sem o inibidor ($59,13 \pm 7,82\%$; $p < 0,05$). De maneira semelhante, a associação de DXR (4 μM) na presença do SP600125 promoveu uma redução significativa da viabilidade celular ($15,51 \pm 1,09\%$) em relação ao tratamento com DXR isolado ($34,07 \pm 1,60\%$; $p < 0,05$).

Na figura 19C, observa-se que o tratamento com SeB2 induziu redução significativa da viabilidade celular (5 μM : $34,75 \pm 3,15\%$). A presença do inibidor de p38 MAPK – PD169316, 20 μM , não promoveu alterações significativas na viabilidade celular quando comparada aos respectivos tratamentos sem o inibidor.

Figura 19. Efeito do *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-tilenolactamida (SeB2) ou doxorubicina (DXR), na presença ou ausência de inibidores de MEK/ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD 169316), sobre a viabilidade de células em células HeLa (câncer de colo do útero) após 72 h de tratamento



Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com SeB2 (5 ou 10 μ M) ou DXR (4 μ M) na presença ou ausência dos inibidores de (A) ERK1/2 (U0126), (B) JNK (SP600125); ou (C) p38 MAPK (PD 169316). Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de *Tukey*. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições ($p < 0,05$).

DXR: Doxorubicina;

Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo que os tratamentos atualmente disponíveis enfrentam importantes limitações, como a resistência das células tumorais e os efeitos tóxicos significativos associados à quimioterapia convencional (George *et al.*, 2022; Bray *et al.*, 2024). Diante desse cenário, a busca por novas substâncias com potencial antitumoral surge como uma estratégia promissora para ampliar o arsenal farmacológico para o tratamento dessa doença (Liu *et al.*, 2024). Nesse contexto, diversos compostos de selênio têm sido sintetizados e investigados quanto aos seu potencial antitumoral (Hu *et al.*, 2025). Assim, o presente trabalho investigou o efeito anticâncer *in vitro* do composto de selênio *N*-(4-metilfenil)benzoseleno-etilenolactamida (SeB2).

O SeB2, derivado de selênio, é uma substância inédita cuja atividade biológica ainda é pouco descrita na literatura científica. Os poucos estudos disponíveis indicam que o SeB2 possui atividade antiparasitária contra *Leishmania* e efeito antibacteriano frente ao *Mycobacterium tuberculosis* (Sousa *et al.*, 2023; Sousa *et al.*, 2025). No entanto, seus potenciais efeitos citotóxicos, bem como os mecanismos moleculares subjacentes à sua ação em linhagens tumorais, ainda não foram devidamente elucidados.

Inicialmente, foi realizado o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), um teste colorimétrico amplamente empregado para avaliar a viabilidade e a proliferação.

A doxorubicina é um quimioterápico muito utilizado na prática oncológica, reconhecido por sua elevada toxicidade (Lisboa *et al.*, 2024). A escolha da doxorubicina para o presente estudo fundamenta-se não apenas em seu uso recorrente em ensaios *in vitro* com células HeLa, mas também em seu reconhecido efeito antitumoral, associado à indução de estresse oxidativo e à modulação de vias da MAPK, evidenciando diferentes mecanismos de toxicidade (Sanzana *et al.*, 2023).

No ensaio do MTT, o SeB2 demonstrou efeito citotóxico significativo na linhagem celular humana de câncer de colo de útero HeLa, apresentando concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (CI₅₀) de $5,03 \pm 0,32 \mu\text{M}$. As células HeLa, isoladas em 1951 de Henrietta Lacks, uma paciente afro-americana diagnosticada com câncer cervical, são uma ferramenta valiosa, amplamente empregada em pesquisas nas áreas de virologia, genética, farmacologia e no

desenvolvimento de vacinas (Hendges; Oliveira; Cardoso, 2024).

O câncer do colo do útero é atualmente a quarta principal causa de morbidade e mortalidade por neoplasias malignas entre mulheres em todo o mundo (Bray *et al.*, 2024). No Brasil, em 2020, foram registrados 6.627 óbitos por essa doença, com uma taxa ajustada de mortalidade de 4,60 por 100 mil mulheres (INCA, 2021a). Apesar dos avanços na prevenção por meio da vacinação contra o Papilomavírus Humano (HPV), vírus que representa o principal fator etiológico para o desenvolvimento de câncer cervical (Yu; Majerciak; Zheng; 2022), e dos programas de rastreamento, ainda são necessárias novas estratégias terapêuticas que contribuam para o controle da doença em estágios avançados ou refratários (Waly *et al.*, 2025.) .

Souza (2018) investigou compostos contendo selênio, denominados selenoglicolicamidas, que demonstraram atividade citotóxica significativa contra células da linhagem de leucemia promielocítica humana (HL-60). Dentre os compostos avaliados, alguns apresentaram efeito citotóxico mais pronunciado, com destaque para o HSe-02, que exibiu maior potencial antitumoral em comparação aos demais. Além disso, esse composto mostrou baixa toxicidade frente a células normais, sugerindo uma boa seletividade e reforçando seu potencial como candidato promissor no desenvolvimento de novas terapias anticâncer.

De forma semelhante, Szemerédi e colaboradores (2021) relataram que os cetona-selenoésteres apresentaram atividade citotóxica significativa em diferentes linhagens tumorais, incluindo células de carcinoma hepatocelular humano, de câncer cervical e de melanoma murino. Os autores também verificaram que os ciano-selenoésteres exibiram potência variável conforme a linhagem celular avaliada. Essa diferença na resposta biológica foi atribuída à presença de grupos halogênios nas estruturas moleculares, que parecem potencializar o efeito citotóxico desses compostos frente às células tumorais.

O quimioterápicos possuem baixa seletividade e portanto, produzem efeitos adversos, como mielossupressão, alopecia e problemas gastrointestinais, que podem perdurar por anos após o término do tratamento, comprometendo significativamente a qualidade de vida do paciente. Nessa perspectiva, a citotoxicidade do SeB2 foi avaliada em linhagem de células renais embrionárias humanas (HEK293). O composto SeB2 apresentou citotoxicidade significativa e seletividade seis vezes maior para as células HeLa, demonstrando afinidade preferencial pelas células tumorais em comparação à célula não tumoral utilizadas como controle. Por sua vez, a DXR, droga

padrão e quimioterápico amplamente utilizado na prática clínica, apresentou um IS de 0,13, sendo considerada pouco seletiva para essa linhagem celular. Assim, considerando a significativa citotoxicidade e seletividade para as células tumorais HeLa, o composto SeB2 demonstrou promissor para a continuidade dos experimentos de investigação do seu efeito antitumoral *in vitro*.

Segundo Gajdács e colaboradores (2017), o composto selenoéster 9 de cetona apresentou seletividade dez vezes maior para células da linhagem de adenocarcinoma de cólon humano (Colo 205) em relação às células da linhagem de fibroblastos pulmonares embrionários humanos (MRC-5) não tumorais. Para a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano resistente a múltiplos fármacos (Colo 320), a seletividade foi de 9,7 vezes em comparação às células não tumorais MRC-5.

Em outro estudo, o composto contendo selênio Anidrido diselenoperóxi 2-(4-isobutilfenil)propanóico apresentou seletividade 4,8 vezes maior para a linhagem T-47D, derivada de câncer de mama humano, em comparação à linhagem mamária saudável humano 184B5. Além disso, para a linhagem de células de câncer de pulmão humano A549, o composto mostrou-se ainda mais seletivo, com um índice de seletividade de 3,5 vezes em relação às células da linhagem de epitélio brônquico humano saudável BEAS-2B (Ramos-Inza *et al.*, 2023).

De acordo com a literatura, a atividade de um composto contra células tumorais é classificada como fortemente seletiva quando o índice de seletividade (IS) é ≥ 6 , moderadamente seletiva quando > 3 e < 6 , levemente seletiva quando > 1 e < 3 , e não seletiva quando $IS < 1$ (Dobiasová *et al.*, 2022). Com base nesse critério, a linhagem HeLa - para a qual o composto SeB2 demonstrou seletividade - foi escolhida para a continuidade dos experimentos.

Para definir as condições experimentais dos ensaios de investigação dos mecanismos de ação antitumorais do SeB2, avaliou-se a citotoxicidade dessa molécula em diferentes tempos de tratamento. Observou-se que as concentrações efetivas foram semelhantes entre os tempos testados, sendo, portanto, selecionada a menor concentração associada ao menor tempo de tratamento. Essa abordagem segue estratégias previamente descritas em estudos de avaliação citotóxica, nos quais a escolha de menores tempos e concentrações é preferida para conseguir avaliar o mecanismo de ação (Chen; Wong, 2009; Szemerédi *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2021; LV *et al.*, 2024).

Tem sido relatado na literatura, que a atividade antitumoral de compostos de selênio envolve a indução da apoptose, a indução do estresse oxidativo e a modulação de vias de sinalização celular, como a via das Proteínas Cinase Ativadas por Mitógenos (MAPK) (Li *et al.*, 2022).

A apoptose é um processo complexo caracterizado por diversos eventos morfológicos, como a condensação da cromatina, fragmentação do DNA e redução do volume celular (picnose) (Kerr; Wyllie; Currie, 1972; Ullah *et al.*, 2023). Para avaliação da indução de apoptose, diversas metodologias podem ser utilizadas, incluindo a marcação de células com o laranja de acridina (LA) e o iodeto de propídeo (IP). A combinação de LA/IP é usada para diferenciar células em apoptose inicial, tardia ou necrose. Células vivas, com a membrana intacta, o LA passa pelas membranas e se liga ao RNA e DNA, emitindo fluorescência verde. Células mortas, com a membrana danificada, o IP se liga ao DNA e emitem fluorescência vermelha/laranja (Ude *et al.*, 2022).

O ensaio de marcação do LA/IP permitiu evidenciar que o tratamento com o SeB2 induziu aumento do percentual de células em apoptose o que foi corroborado pelas imagens obtidas por microscopia confocal a laser que evidenciaram características morfológicas típicas de apoptose, como formação de *blebs* na membrana e condensação da cromatina.

No estudo realizado por Chen e Wong (2009), utilizando a técnica de marcação anexina V/PI por microscopia confocal, foi evidenciado que a selenocistina induziu apoptose de células das linhagens tumorais humanas A375 (melanoma humano), HepG2 e MCF7. Em adição, Dos Santos e colaboradores (2020) avaliaram o organosselênio IP-Se-06 por meio da técnica LA/PI em microscopia confocal. O IP-Se-06 induziu apoptose de células carcinoma hepatocelular humano.

Em adição, Ranjitha, Muddegowda e Ravishankar (2019) avaliaram peptídeos bioconjugados a nanopartículas de selênio, observando que as células HT-29 tratadas apenas com o peptídeo apresentaram discreta citotoxicidade. No entanto, o tratamento com o complexo peptídeo–nanopartícula resultou em um número significativamente maior de células apoptóticas em comparação aos tratamentos com nanopartículas ou peptídeo isoladamente por marcação com LA/IP.

Além do LA/PI, outros marcadores fluorescentes, como o Hoechst 34580, têm sido amplamente empregados para caracterizar alterações nucleares associadas à apoptose. O Hoechst é capaz de atravessar a membrana plasmática e se ligar às

regiões ricas em adenina e timina do DNA, permitindo a visualização de condensação de cromatina e fragmentação nuclear (Bucevičius; Lukinavičius; Gerasimaitė, 2018). Essa combinação de técnicas (LA/PI para discriminar apoptose inicial e tardia, e Hoechst para confirmar alterações nucleares) amplia a robustez da caracterização do mecanismo de morte celular, contribuindo para a definição do potencial antitumoral desses compostos.

O aumento da fluorescência após marcação do DNA com Hoechst 34580 em células HeLa após tratamento com SeB2, indicou condensação e fragmentação nuclear características de apoptose. De forma semelhante, em estudo realizado por Cao e colaboradores (2021), foi observado que o composto selenita de sódio (Na_2SeO_3) induziu apoptose em células MCF7, evidenciada pela condensação nuclear, após marcação nuclear com o Hoechst 34580. De forma semelhante, o tratamento de células HT-29 com selenato resultou em condensação da cromatina e fragmentação nuclear dependente da concentração (Hwang e colaboradores, 2006).

Além disso, Guo e colaboradores (2013) avaliaram o efeito do tratamento com selenito de sódio e sacarose-Se em células HeLa marcadas com Hoechst 33258 e observaram indução de apoptose, caracterizada por núcleo condensado ou fragmentado, reconhecíveis pela sua típica morfologia em “meia-lua”. Segundo Yu e colaboradores (2022), a incorporação de selênio a polissacarídeos de cadeia longa potencializou o efeito anticancerígeno em células da linhagem HT-29 marcadas com Hoechst 33258. Foram observadas alterações morfológicas típicas de apoptose, como encolhimento e fragmentação nuclear, além de condensação da cromatina.

Para melhor caracterizar o efeito de indução de apoptose em induzida por SeB2 em células HeLa, avaliou-se a alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) pelo ensaio do JC-1. O JC-1 é um corante catiônico lipofílico amplamente utilizado como indicador sensível e confiável da integridade mitocondrial e do estado apoptótico celular (Sivandzade, Bhalerao & Cucullo, 2019). Em células saudáveis, que apresentam potencial de membrana mitocondrial preservado, o JC-1 tende a formar agregados no interior das mitocôndrias, emitindo fluorescência vermelha. Por outro lado, em células em processo de morte, com perda do potencial de membrana mitocondrial, o corante permanece na forma de monômeros, distribuídos no citoplasma, emitindo fluorescência verde (Smiley et al., 1991). Para este ensaio, utilizou-se o CCCP como controle positivo, um inibidor químico da fosforilação oxidativa que afeta as reações de síntese proteica nas mitocôndrias e resulta na perda

do potencial de membrana mitocondrial (Takegawa *et al.*, 2025).

O aumento da fluorescência verde observada após o tratamento com SeB2 promoveu a perda do potencial de membrana mitocondrial de células HeLa. Esse evento está relacionado à ativação da via intrínseca da apoptose, uma vez que a perda do potencial de membrana mitocondrial favorece a abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial, levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas (Bhat; Bhat; Abdullah, 2025).

De forma semelhante, Barman e colaboradores (2025) relataram um aumento significativo e dependente da concentração na fluorescência verde, em comparação ao controle, na presença de um dissulfeto de selênio substituído por nitrogênio em linhagem celular de câncer triplo negativo humano (MDA-MB-231), indicando perda do potencial. Esse aumento na despolarização mitocondrial, associado à perda de $\Delta\Psi_m$, foi corroborado pela liberação de citocromo *c*.

Notavelmente, células tratadas com nanopartículas contendo selênio (BMMP-Mn²⁺/Se) exibiram a fluorescência verde mais intensa e menor $\Delta\Psi_m$ em células HeLa, indicando que o BMMP-Mn²⁺/Se apresentou o efeito mais pronunciado de dano mitocondrial comparado ao controle. Esses achados foram consistentes com a geração de ERO, sugerindo que o dano mitocondrial foi desencadeado principalmente pela via oxidativa (Xiao *et al.*, 2021).

Pei e colaboradores (2023) descreveram uma nanopartícula de fosfato de manganês dopada com selênio (OX-Se-MnP) que induziu perda de $\Delta\Psi_m$. Esse efeito, observado após 24 h de tratamento, indica que o OX-Se-MnP promove disfunção mitocondrial, associada à superprodução ROS e consequente indução de apoptose em células HCT-116/DR resistentes à oxaliplatina, evidenciada por marcação com JC-1.

A perda do $\Delta\Psi_m$ pode ser provocada pelo aumento da produção de EROs, que interagem com proteínas mitocondriais e desencadeiam a liberação do citocromo *c* (Attique *et al.*, 2025). Com base nesse efeito mediado por EROs, avaliou-se o potencial oxidativo do composto SeB2 por meio do ensaio com N-acetilcisteína (NAC). Observou-se que o SeB2, na ausência de NAC, promoveu redução da viabilidade celular, enquanto sua presença reverteu esse efeito, indicando que a atividade citotóxica do SeB2 está associada à indução de estresse oxidativo devido ao aumento na produção de ROS.

Esse efeito foi demonstrado no estudo de Cao *et al.* (2021). O pré-tratamento

com NAC, antes do tratamento de Na_2SeO_3 , inibiu significativamente a geração de ROS e a citotoxicidade do Na_2SeO_3 em células MCF-7, indicando que o estresse oxidativo é induzido pelo Na_2SeO_3 e está diretamente envolvido na indução da morte celular por apoptose.

Segundo Hu e colaboradores (2023), a citotoxicidade de um derivado de tepotinibe contendo selênio, nomeado 8b, em células da linhagem de carcinoma hepatocelular humano (MHCC97H) foi significativamente atenuada pela coadministração da NAC, que reverteu a viabilidade celular. Esse resultado evidencia que a morte celular induzida pelo composto 8b depende da produção de EROs, confirmando o papel fundamental do estresse oxidativo no mecanismo de ação do composto.

Fan e colaboradores (2017) demonstraram que NAC atenuou significativamente a inibição do crescimento celular induzida pela selenocisteína (SeC) em células da linhagem de glioma de camundongos U251. Além de neutralizar os radicais livres intracelulares, a NAC também restaurou os níveis dos antioxidantes endógenos, revertendo, assim, os danos ao DNA e a apoptose induzidos pelo tratamento com SeC.

Além de promoverem danos celulares, EROs atuam como moléculas sinalizadoras essenciais capazes de modular a atividade de proteínas de diversas vias de sinalização intracelulares, incluindo as MAPK (ERK, JNK e p38 MAPK), culminando na indução de apoptose (Nigan *et al.*, 2025). Nessa perspectiva, avaliou-se o efeito do SeB2 sobre a viabilidade celular, na presença ou ausência de inibidores de MAPK (iMAPK). Essas proteínas desempenham papéis cruciais na regulação da sobrevivência, proliferação e morte celular (Yan *et al.*, 2024).

O SeB2 não afetou a viabilidade celular na presença dos inibidores de ERK1/2 (U0126) e p38 MAPK (PD169316). Em contrapartida, o efeito citotóxico do SeB2 foi potencializado na presença do inibidor de JNK (SP600125). Considerando que, em células de câncer cervical, a proteína JNK é conhecida por promover proliferação e sobrevivência celular (Morgan *et al.*, 2021), pode-se inferir que a inibição dessa via favoreceu a citotoxicidade induzida pelo SeB2, sugerindo um possível efeito de quimiossensibilização ou sinergismo, o que necessita ser melhor avaliado por meio de estudos de combinação farmacológica com o SeB2.

Estudos de An e colaboradores (2013) demonstraram que, após 24 horas de tratamento com selenita na presença do inibidor de JNK (SP600125), observou-se

uma redução ainda maior da viabilidade das células de leucemia promielocítica aguda humana (NB4). O selenita promoveu a geração de EROs, que, por sua vez, inibiram o eixo JNK/ATF2, levando à parada do ciclo celular na fase G0/G1 e culminando em apoptose.

Até o momento, não foram encontrados relatos na literatura sobre compostos de selênio com atividade antitumoral atuando diretamente sobre a proteína JNK. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar a expressão dessa proteína após o tratamento com SeB2.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- O SeB2 apresentou efeito citotóxico seletivo para as células HeLa quando comparado com a linhagem não tumoral (HEK 293);
- O SeB2 induziu apoptose em células HeLa;
- A apoptose induzida pelo SeB2 está associada à perda do potencial mitocondrial e aumento de EROs;
- A inibição da via da JNK potencializou o efeito citotóxico do SeB2;
- Os resultados indicam que o SeB2 é um candidato promissor ao desenvolvimento de novos agentes antitumorais, sendo necessários estudos adicionais para elucidar seus mecanismos de ação e potencial terapêutico.

Referências

8 Referências

ABDELRAHMAN, K. S., HASSAN, H. A., ABDEL-AZIZ, S. A., MARZOUK, A. A., NARUMI, A., KONNO, H., ABDEL-AZIZ, M. JNK signaling as a target for anticancer therapy. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 2, p. 405-434, 2021.

ABOUD, K., MEISSNER, M., OCEN, J., JONES, R. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine**, v. 51, n. 1, p. 23-27, 2023.

ABU-RUSTUM, N. R.; YASHAR, C. M.; AREND, R.; BARBER, E.; BRADLEY, K.; BROOKS, R.; CAMPOS, S. M.; CHINO, J.; CHON, H. S.; CRISPENS, M. A.; DAMAST, S.; FISHER, C. M.; FREDERICK, P.; GAFFNEY, D. K.; GAILLARD, S.; GIUNTOLI, R.; GLASER, S.; HOLMES, J.; HOWITT, B. E.; LEA, J.; MANTIA-SMALDONE, G.; MARIANI, A.; MUTCH, D.; NAGEL, C.; NEKHLYUDOV, L.; PODOLL, M.; RODABAUGH, K.; SALANI, R.; SCHORGE, J.; SIEDEL, J.; SISODIA, R.; SOLIMAN, P.; UEDA, S.; URBAN, R.; WYSE, E.; MCMILLIAN, N. R.; AGGARWAL, S.; ESPINOSA, S. NCCN Guidelines® Insights: Cervical Cancer, Version 1.2024. **Jornal of the National Comprehensive Cancer Network**, Fort Washington, v. 21, n. 12, p. 1224–1233, dez. 2023.

ADJEI BOAKYE, E., MCKINNEY, S. L., WHITTINGTON, K. D., BOYER, V. E., FRANCA, M. C., LEE, M., GEREND, M. A. Association between sexual activity and human papillomavirus (HPV) vaccine initiation and completion among college students. **Vaccines**, v. 10, n. 12, p. 2079, 2022.

AI, Y., MENG, Y., YAN, B., ZHOU, Q., WANG, X. The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death. **Molecular cell**, v. 84, n. 1, p. 170-179, 2024.

ALI, W., BENEDETTI, R., HANDZLIK, J., ZWERGEL, C., BATTISTELLI, C. The innovative potential of selenium-containing agents for fighting cancer and viral infections. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 1, p. 256-263, 2021.

AMIRI, S., RASEKH, S., MOEZZI, S. M. I., SEIFI, N., FATEMI, S. A., FATHI, S., NEGAHDARIPOUR, M. Prophylactic vaccines against HPV-caused cervical cancer: novel vaccines are still demanded. **Infectious Agents and Cancer**, v. 20, n. 1, p. 16, 2025.

AN, J. J., SHI, K. J., WEI, W., HUA, F. Y., CI, Y. L., JIANG, Q., XU, C. M. The ROS/JNK/ATF2 pathway mediates selenite-induced leukemia NB4 cell cycle arrest and apoptosis in vitro and in vivo. **Cell death & disease**, v. 4, n. 12, p. e973-e973, 2013.

ATTIQUE, I., HAIDER, Z., KHAN, M., HASSAN, S., SOLIMAN, M. M., IBRAHIM, W. N., & ANJUM, S. Reactive Oxygen Species: From Tumorigenesis to Therapeutic Strategies in Cancer. **Cancer Medicine**, v. 14, n. 10, p. e70947, 2025.

BANDARU, P.; KONDO, Y.; KURIYAN, J. The interdependent activation of Son-of-Sevenless and Ras. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 9, n. 2, p. a031534, 2019.

BANKÓ, C., NAGY, Z. L., NAGY, M., SZEMÁN-NAGY, G. G., REBENKU, I., IMRE, L., BACSO, Z. Isocyanide substitution in acridine orange shifts DNA damage-mediated phototoxicity to permeabilization of the lysosomal membrane in cancer cells. **Cancers**, v. 13, n. 22, p. 5652, 2021.

BARMAN, P., CHAKRABORTY, R., MISRA, R., BHUYAN, H. J., ROY, S., SARKAR, S., P. BHABAK, K. Nitro-Substituted Benzylic Organochalcogenides as Anticancer Agents: Unravelling the Multifaceted Pathways to Combat Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2025.

BASKIĆ, D., POPOVIĆ, S., RISTIĆ, P., ARSENIJEVIĆ, N. N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell biology international**, v. 30, n. 11, p. 924-932, 2006.

BAYO, M., FRENIS, K., HAHAD, O., STEVEN, S., COHEN, G., CUADRADO, A., DAIBER, A. Protective actions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and downstream pathways against environmental stressors. 2022.

BEHBOUDI, E., CHAROSTAD, J., NAKHAIE, M., KHAJOUEI, A., GHELMANI, Y. JNK signaling pathways and oncoviruses. **Iranian Journal of Medical Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 148-162, 2024.

BHAT, G. R., SETHI, I., SADIDA, H. Q., RAH, B., MIR, R., ALGEHAINY, N., BHAT, A. A. Cancer cell plasticity: from cellular, molecular, and genetic mechanisms to tumor heterogeneity and drug resistance. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 43, n. 1, p. 197-228, 2024.

BHAT, I. A.; BHAT, A. M.; ABDULLAH, S. T. *Apoptosis-Mechanisms, Regulation in Pathology, and Therapeutic Potential*. In: **Cell Death Regulation in Pathology**. IntechOpen, 2025. Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/1210078#>. Acesso em: 17 ago. 2025.

BHATLA, N., AOKI, D., SHARMA, D. N., SANKARANARAYANAN, R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 155, p. 28-44, 2021.

BJØRKLUND, G., SHANAIDA, M., LYSIUK, R., ANTONYAK, H., KLISHCH, I., SHANAIDA, V., PEANA, M. Selenium: an antioxidant with a critical role in anti-aging. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6613, 2022.

BOVO, A. C., PEDRÃO, P. G., GUIMARÃES, Y. M., GODOY, L. R., RESENDE, J. C. P., LONGATTO-FILHO, A., DOS REIS, R. Combined oral contraceptive use and the risk of cervical cancer: Literature review. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 45, n. 12, p. e818-e824, 2023.

BRAY, F., LAVERSANNE, M., SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a**

cancer journal for clinicians, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

BRAY, F., LAVERSANNE, M., SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

BUCEVIČIUS, J.; LUKINAVIČIUS, G.; GERASIMAITĖ, R. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. **Chemosensors**, v. 6, n. 2, p. 18, 2018.

BURTON, J. C., ANTONIADES, W., OKALOVA, J., ROOS, M. M., GRIMSEY, N. J. Atypical p38 signaling, activation, and implications for disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4183, 2021.

CAO, L., ZHANG, J., DU, Y., SUN, M., XIANG, Y., SHENG, Y., SHAO, J. Selenite induced breast cancer MCF7 cells apoptosis through endoplasmic reticulum stress and oxidative stress pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 349, p. 109651, 2021.

CHAN, P. K., LUK, A. C., PARK, J. S., SMITH-MCCUNE, K. K., PALEFSKY, J. M., KONNO, R., BANKS, L. Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 11, p. 1565-1573, 2011.

CHARGARI, C., PEIGNAUX, K., ESCANDE, A., RENARD, S., LAFOND, C., PETIT, A., HAIE-MÉDER, C. Radiotherapy of cervical cancer. **Cancer/Radiothérapie**, v. 26, n. 1-2, p. 298-308, 2022.

CHEN, T.; WONG, Y.-S. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, n. 2, p. 105-113, 2009.

CHENG, Y., CHEN, J., SHI, Y., FANG, X., TANG, Z. MAPK signaling pathway in oral squamous cell carcinoma: biological function and targeted therapy. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4625, 2022.

CORRALES, T. R.; LOSADA-PÉREZ, M.; CASAS-TINTÓ, S. JNK pathway in CNS pathologies. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 8, p. 3883, 2021.

CREE, L. A. "WHO Classification of tumours: female genital tumours 5th edit. vol. 4. Edited by WHO classification of tumours editorial board." **IARC**: 272-276, 2020.

DAI, X., THONGCHOT, S., DOKDUANG, H., LOILOME, W., KHUNTIKEO, N., TITAPUN, A., NAMWAT, N. Potential of selenium compounds as new anticancer agents for cholangiocarcinoma. **Anticancer Research**, v. 36, n. 11, p. 5981-5988, 2016.

DAVIES, A., ZOUBEIDI, A., BELTRAN, H., SELTH, L. A. The transcriptional and epigenetic landscape of cancer cell lineage plasticity. **Cancer discovery**, v. 13, n. 8, p. 1771-1788, 2023.

DÁVILA-VEGA, J. P., GASTELUM-HERNÁNDEZ, A. C., SERRANO-SANDOVAL, S. N., SERNA-SALDÍVAR, S. O., GUTIÉRREZ-URIBE, J. A., MILÁN-CARRILLO, J., GUARDADO-FÉLIX, D. Metabolism and anticancer mechanisms of selocompounds: comprehensive review. **Biological Trace Element Research**, v. 201, n. 8, p. 3626-3644, 2023.

DE MARTEL, C., GEORGES, D., BRAY, F., FERLAY, J., CLIFFORD, G. M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet global health**, v. 8, n. 2, p. e180-e190, 2020.

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.

DEBNATH, S., AGARWAL, A., KUMAR, N. R., BEDI, A. Selenium-based drug development for antioxidant and anticancer activity. **Future Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 595-607, 2022.

DOS SANTOS, D. C., RAFIQUE, J., SABA, S., ALMEIDA, G. M., SIMINSKI, T., PÁDUA, C. OURIQUE, F. Apoptosis oxidative damage-mediated and antiproliferative effect of selenylated imidazo [1, 2-a] pyridines on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and in vivo. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 3, p. e22663, 2021.

DU, X. H., KE, S. B., LIANG, X. Y., GAO, J., XIE, X. X., QI, L. Z., LI, S. Z. USP14 promotes colorectal cancer progression by targeting JNK for stabilization. **Cell death & disease**, v. 14, n. 1, p. 56, 2023.

DUARTE, S.S.; SILVA, D.K.F.; LISBOA, T.M.H.; GOUVEIA, R.G.; ANDRADE, C.C.N.; SOUSA, V.M.; FERREIRA, R.C.; MOURA, R.O.; GOMES, J.N.S.; SILVA, P.M. AZEVEDO, F.L.A.A.; KEESEN, T.S.L.; GONÇALVES, J.C.R.; BATISTA, L.M. 148 SOBRAL, M.V. Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. **Pharmacol. Rep.**, v. 74, p. 545-554, 2022.

EKSTEEN, C., RIEDEMANN, J., RASS, A. M., PLESSIS, M. D., BOTHA, M. H., VAN DER MERWE, F. H., ENGELBRECHT, A. M. A review: genetic mutations as a key to unlocking drug resistance in cervical cancer. **Cancer Control**, v. 31, p. 10732748241261539, 2024.

FAN, C. D., FU, X. Y., ZHANG, Z. Y., CAO, M. Z., SUN, J. Y., YANG, M. F., SUN, B. L. Selenocysteine induces apoptosis in human glioma cells: evidence for TrxR1-

targeted inhibition and signaling crosstalk. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6465, 2017.

FERREIRA, R. C., DO NASCIMENTO, Y. M., DE ARAÚJO LOUREIRO, P. B., MARTINS, R. X., DE SOUZA MAIA, M. E., FARIAS, D. F., SOBRAL, M. V. Chemical composition, in vitro antitumor effect, and toxicity in zebrafish of the essential oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae). **Biomolecules**, v. 13, n. 10, p. 1439, 2023.

FERRO, Y., MAUROTTI, S., TARSITANO, M. G., LODARI, O., PUJIA, R., MAZZA, E., MONTALCINI, T. Therapeutic fasting in reducing chemotherapy side effects in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 15, n. 12, p. 2666, 2023.

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia. *Staging of cervical cancer 2018*. Londres, 2021. Disponível em: <https://www.figo.org/news/figo-staging-endometrial-cancer-2023>. Acesso em: 14 jul. 2025.

FRANCOEUR, A. A.; MONK, B. J.; TEWARI, K. S. Treatment advances across the cervical cancer spectrum. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 22, n. 3, p. 182-199, 2025.

GAJDÁCS, M., SPENGLER, G., SANMARTÍN, C., MARĆ, M. A., HANDZLIK, J., DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E. Selenoesters and selenoanhydrides as novel multidrug resistance reversing agents: A confirmation study in a colon cancer MDR cell line. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 4, p. 797-802, 2017.

GALLUZZI, L., VITALE, I., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., AGOSTINIS, P., TURK, B. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GAO, W., GUO, X. M., WANG, H. L., ZHAO, R. H., XIE, G. S., LI, C., HUANG, J. A double staining method using calcofluor white and acridine orange to differentiate life stages of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) on hepatopancreatic sections. **Aquaculture**, v. 528, p. 735628, 2020.

GARG, R., KUMARIYA, S., KATEKAR, R., VERMA, S., GOAND, U. K., GAYEN, J. R. JNK signaling pathway in metabolic disorders: An emerging therapeutic target. **European Journal of Pharmacology**, v. 901, p. 174079, 2021.

GEORGE, I. A., CHAUHAN, R., DHAWALE, R. E., IYER, R., LIMAYE, S., SANKARANARAYANAN, R., KUMAR, P. Insights into therapy resistance in cervical cancer. **Advances in Cancer Biology-Metastasis**, v. 6, p. 100074, 2022.

GHOSE, A., FLEMING, J., EL-BAYOUMY, K., HARRISON, P. R. Enhanced sensitivity of human oral carcinomas to induction of apoptosis by selenium compounds: involvement of mitogen-activated protein kinase and Fas pathways. **Cancer research**, v. 61, n. 20, p. 7479-7487, 2001.

GIANNELLA, L., GRELLONI, C., NATALINI, L., SARTINI, G., BORDINI, M., DELLI CARPINI, G., CIAVATTINI, A. Molecular Features of HPV-Independent Cervical Cancers. **Pathogens**, v. 14, n. 7, p. 668, 2025.

GREEN, D. R. The death receptor pathway of apoptosis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 14, n. 2, p. a041053, 2022.

GU, X., MU, C., ZHENG, R., ZHANG, Z., ZHANG, Q., LIANG, T. The cancer antioxidant regulation system in therapeutic resistance. **Antioxidants**, v. 13, n. 7, p. 778, 2024.

GUO, P., ZHAO, P., LIU, J., MA, H., BAI, J., CAO, Y., QI, C. Preparation of a novel organoselenium compound and its anticancer effects on cervical cancer cell line HeLa. **Biological trace element research**, v. 151, n. 2, p. 301-306, 2013.

GUO, Y. J., PAN, W. W., LIU, S. B., SHEN, Z. F., XU, Y., HU, L. L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 19, n. 3, p. 1997-2007, 2020.

HAKIM, R. U., AMIN, T., UL ISLAM, S. B. HAKIM, RAIYAN UL; AMIN, TASBIR; UL ISLAM, SM BAKHTIAR. Advances and challenges in cervical cancer: From molecular mechanisms and global epidemiology to innovative therapies and prevention strategies. **Cancer Control**, v. 32, p. 10732748251336415, 2025.

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

HENDGES, G. C.; OLIVEIRA, H. K. L.; CARDOSO, S. T. N. *HeLa: Célula imortal e seu marco histórico para medicina moderna*. **Caderno de ANAIS HOME**, 2024. Anais do IV SEVEN INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CONGRESS. Disponível em: <https://homepublishing.com.br/index.php/cadernodeanaais/article/view/1242/1354>. Acesso em: 17 ago. 2025.

HEPWORTH, E. M. W.; HINTON, S. D. Pseudophosphatases as regulators of MAPK signaling. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 12595, 2021.

HERRERA, S. C.; BACH, E. A. The emerging roles of JNK signaling in Drosophila stem cell homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5519, 2021.

HOGAN, C.; PERKINS, A. V. Selenoproteins in the human placenta: how essential is selenium to a healthy start to life?. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 628, 2022.

HÖHN, A. K., BRAMBS, C. E., HILLER, G. G. R., MAY, D., SCHMOECKEL, E., HORN, L. C. 2020 WHO classification of female genital tumors. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 81, n. 10, p. 1145-1153, 2021.

HU, H., CHEN, Y., XU, H., HOU, W. Research advances in the role of selenium in

reversing tumor multidrug resistance. **Journal of Holistic Integrative Pharmacy**, v. 6, n. 2, p. 184-194, 2025.

HU, J., CHEN, L., LU, Z., YAO, H., HU, Y., FENG, L., CHEN, W. H. Design, synthesis and antitumor activity of novel selenium-containing Tepotinib derivatives as dual inhibitors of c-met and TrxR. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1304, 2023.

HUANG, R., CHEN, H., LIANG, J., LI, Y., YANG, J., LUO, C., XIE, X. Dual role of reactive oxygen species and their application in cancer therapy. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 18, p. 5543, 2021.

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

HUSSAR, P. Apoptosis regulators bcl-2 and caspase-3. **Encyclopedia**, v. 2, n. 4, p. 1624-1636, 2022.

HUSSEIN, A. M., HUSSEIN, K. A. E., BABKAIR, H. A., & BADAWY, M. Anti-cancer medicins (classification and mechanisms of action). **Egyptian Dental Journal**, v. 70, n. 1, p. 147-164, 2024.

HWANG, J. T., KIM, Y. M., SURH, Y. J., BAIK, H. W., LEE, S. K., HA, J., PARK, O. J. Selenium regulates cyclooxygenase-2 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways by activating AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. **Cancer research**, v. 66, n. 20, p. 10057-10063, 2006.

IGEA, A.; NEBRED, A. R. The stress kinase p38 α as a target for cancer therapy. **Cancer research**, v. 75, n. 19, p. 3997-4002, 2015.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **DADOS E NÚMEROS SOBRE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**. Relatório Anual 2023. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/dados_e_numeros_colo_22marco2023.pdf. Acesso em julho de 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Deteção precoce do câncer – Rio de Janeiro** : INCA, 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//deteccao-precoce-do-cancer.pdf>. Acesso em julho de 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/diretrizesparaora-streamentodocancerdocolodoutero_2016_corrigido.pdf. Acesso em julho de 2025.

JAMASBI, E.; HAMELIAN, M.; HOSSAIN, M. A., VARMIIRA, K. The cell cycle, cancer development and therapy. **Molecular biology reports**, v. 49, n. 11, p. 10875-10883, 2022.

JOMOVA, K., RAPTOVA, R., ALOMAR, S. Y., ALWASEL, S. H., NEPOVIMOVA, E., KUCA, K., VALKO, M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Archives of toxicology**, v. 97, n. 10, p. 2499-2574, 2023.

KERR, J. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KIM, S. J., CHOI, M. C., PARK, J. M., CHUNG, A. S. Antitumor effects of selenium. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11844, 2021.

KITAGAWA, R., KATSUMATA, N., SHIBATA, T., KAMURA, T., KASAMATSU, T., NAKANISHI, T., YOSHIKAWA, H. Paclitaxel plus carboplatin versus paclitaxel plus cisplatin in metastatic or recurrent cervical cancer: the open-label randomized phase III trial JCOG0505. **Journal of clinical oncology**, v. 33, n. 19, p. 2129-2135, 2015.

KOBAYASHI, O., KAMATA, S., OKUMA, Y., NAKAJIMA, T., IKEDA, Y., SAITO, K., KAWANA, K. Carcinogenesis and epidemiology of cervical cancer: The hallmark of human papillomavirus-associated cancer. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 50, p. 25-30, 2024.

KUMAR, L., HARISH, P., MALIK, P. S., KHURANA, S. Chemotherapy and targeted therapy in the management of cervical cancer. **Current problems in cancer**, v. 42, n. 2, p. 120-128, 2018.

KWON, Youngjoo. Possible beneficial effects of N-acetylcysteine for treatment of triple-negative breast cancer. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 169, 2021.

LEE, S.; RAUCH, J.; KOLCH, W.. Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 1102, 2020.

LEELAHAVANICHKUL, K., AMORNPHIMOLTHAM, P., MOLINOLO, A. A., BASILE, J. R., KOONTONGKAEW, S., GUTKIND, J. S. A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. **Molecular oncology**, v. 8, n. 1, p. 105-118, 2014.

LEISCHING, G., LOOS, B., BOTHA, M., ENGELBRECHT, A. M. Bcl-2 confers survival in cisplatin treated cervical cancer cells: circumventing cisplatin dose-dependent toxicity and resistance. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 328, 2015.

LENARDÃO, E. J., SANTI, C., SANCINETO, L. Bioactive organoselenium compounds and therapeutic perspectives. **New Frontiers in Organoselenium Compounds**, p. 99-143, 2018.

LI, F., YANG, H., CAO, Y., LI, D., MA, J., LIU, P. DOX-loaded silver nanotriangles and photothermal therapy exert a synergistic antibreast cancer effect via ROS/ERK1/2 signaling pathway. **Nanotechnology**, v. 33, n. 7, p. 075101, 2021.

LI, K.; VAN DELFT, M. F.; DEWSON, G. Too much death can kill you: inhibiting intrinsic apoptosis to treat disease. **The EMBO journal**, v. 40, n. 14, p. e107341, 2021.

LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., ALNEMRI, E. S., WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **cell**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 1997.

LI, S., HAN, X., LU, Z., QIU, W., YU, M., LI, H., ZHUO, R. MAPK cascades and transcriptional factors: regulation of heavy metal tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4463, 2022.

LISBOA, M. T., DE LORENA, M. N., SOBREIRA, F. F., MOURA, A. C., DOS SANTOS, A. C. L., SANTANA, L. C., SILVA, J. C. Doxorubicina Versus Trastuzumabe: uma análise da cardiotoxicidade. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 4, p. e72363-e72363, 2024.

LIU, B., ZHOU, H., TAN, L., SIU, K. T. H., GUAN, X. Y. Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 9, n. 1, p. 175, 2024.

LIZARAZO-TABORDA, M. D. R., GODÍNEZ-RUBÍ, M., NÚÑEZ-AVELLANEDA, D., RAMÍREZ-DE-ARELLANO, A., PEREIRA-SUÁREZ, A. L., VILLEGAS-PINEDA, J. C. Cervical Cancer Biomarkers in Non-Cervical Samples: Emerging Tools for Diagnosis and Prognosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 13, p. 6502, 2025.

LOPEZ, A., REYNA, D. E., GITEGO, N., KOPP, F., ZHOU, H., MIRANDA-ROMAN, M. A., GAVATHIOTIS, E. Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1199, 2022.

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

LU, S., SHI, J., ZHANG, X., KONG, F., LIU, L., DONG, X., SHEN, D. Comprehensive genomic profiling and prognostic analysis of cervical gastric-type mucinous adenocarcinoma. **Virchows Archiv**, v. 479, n. 5, p. 893-903, 2021.

LUO, Z., TIAN, M., YANG, G., TAN, Q., CHEN, Y., LI, G., WU, J. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. **Signal Transduct. Target. Ther.** 7, 218, 2022.

LV, C., ZENG, Q., QI, L., WANG, Y., LI, J., SUN, H., LI, Q. 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.

Malagon, T., Franco, E. L., Tejada, R., Vaccarella, S. Epidemiology of HPV-associated cancers past, present and future: towards prevention and

elimination. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 21, n. 7, p. 522-538, 2024.

MARTÍNEZ-LIMÓN, A., JOAQUIN, M., CABALLERO, M., POSAS, F., DE NADAL, E. The p38 pathway: from biology to cancer therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 1913, 2020.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. AM. Cell cycle control in cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 1, p. 74-88, 2022.

MAURICIO, D., ZEYBEK, B., TYMON-ROSARIO, J., HAROLD, J., SANTIN, A. D. Immunotherapy in cervical cancer. **Current oncology reports**, v. 23, n. 6, p. 61, 2021.

MIRABELLO, L., YEAGER, M., YU, K., CLIFFORD, G. M., XIAO, Y., ZHU, B., SCHIFFMAN, M. HPV16 E7 genetic conservation is critical to carcinogenesis. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1164-1174. e6, 2017.

MOORE, A. R., ROSENBERG, S. C., MCCORMICK, F., MALEK, S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 19, n. 8, p. 533-552, 2020.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-53, 1983.

MSD MANUAL. *Câncer de colo do útero*. In: **Manual MSD – Versão para profissionais de saúde**. 2024. Disponível em: https://www.msmanuals.com/pt/profissional/ginecologia-e-obstetr%C3%ADcia/neoplasias-ginecol%C3%B3gicas/c%C3%A2ncer-de-colo-do-%C3%BAtero#Diagn%C3%B3stico_v1067339_pt. Acesso em: 13 jul. 2025.

MSD MANUAL. *Classificação citológica do colo do útero pelo sistema Bethesda*. 2023.

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.

NAKAMURA, H.; TAKADA, K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. **Cancer science**, v. 112, n. 10, p. 3945-3952, 2021.

NAKANO, R.; NAKAYAMA, T.; SUGIYA, H. Biological properties of JNK3 and its function in neurons, astrocytes, pancreatic β -cells and cardiovascular cells. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1802, 2020.

NIGAM, M., PUNIA, B., DIMRI, D. B., MISHRA, A. P., RADU, A. F., BUNGAU, G. Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in the Modulation of Cancer Signaling Pathway Dynamics. **Cells**, v. 14, n. 15, p. 1207, 2025.

OLMEDO-NIEVA, L., MUÑOZ-BELLO, J. O., CONTRERAS-PAREDES, A., LIZANO, M. The role of E6 spliced isoforms (E6*) in human papillomavirus-induced carcinogenesis. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 45, 2018.

OZBUN, M. A.; CAMPOS, S. K. The long and winding road: human papillomavirus entry and subcellular trafficking. **Current opinion in virology**, v. 50, p. 76-86, 2021.

PAL, A.; KUNDU, R. Human papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 3116, 2020.

Park, Kay J. "Cervical adenocarcinoma: integration of HPV status, pattern of invasion, morphology and molecular markers into classification." **Histopathology** 76, no. 1 112-127, 2020.

PEI, M., LIU, K., QU, X., WANG, K., CHEN, Q., ZHANG, Y., ZHANG, Y. Enzyme-catalyzed synthesis of selenium-doped manganese phosphate for synergistic therapy of drug-resistant colorectal cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 21, n. 1, p. 72, 2023.

PEREZ-FIDALGO, J. A. Cell proliferation inhibitors and apoptosis promoters. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 15, p. 73-76, 2020.

PIMPLE, S.; MISHRA, G. Cancer cervix: Epidemiology and disease burden. **Cytojournal**, v. 19, p. 21, 2022.

PRAMANIK, R., QI, X., BOROWICZ, S., CHOUBEY, D., SCHULTZ, R. M., HAN, J., CHEN, G. p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun: The determinant role of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 4831-4839, 2003.

PRECI, D. P., ALMEIDA, A., WEILER, A. L., FRANCIOSI, M. L. M., CARDOSO, A. M. Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 31, n. 2, p. 265-271, 2021.

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.

RADOMSKA, D., CZARNOMYSY, R., RADOMSKI, D., BIELAWSKI, K. Selenium compounds as novel potential anticancer agents. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 3, p. 1009, 2021.

RAMOS-INZA, S., ALIAGA, C., ENCÍO, I., RAZA, A., SHARMA, A. K., AYDILLO, C., PLANO, D. First generation of antioxidant precursors for bioisosteric se-NSAIDs:

design, synthesis, and in vitro and in vivo anticancer evaluation. **Antioxidants**, v. 12, n. 9, p. 1666, 2023.

RANJITHA, V. R.; MUDDEGOWDA, U.; RAVISHANKAR RAI, V. Potent activity of bioconjugated peptide and selenium nanoparticles against colorectal adenocarcinoma cells. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 9, p. 1496-1505, 2019.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

RENVOIZÉ, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998.

ŘEZÁČOVÁ, K., ČÁŇOVÁ, K., BEZROUK, A., RUDOLF, E. Selenite induces DNA damage and specific mitochondrial degeneration in human bladder cancer cells. **Toxicology in vitro**, v. 32, p. 105-114, 2016.

REZATABAR, S., KARIMIAN, A., RAMESHKNIA, V., PARSIAN, H., MAJIDINIA, M., KOPI, T. A., YOUSEFI, B. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 9, p. 14951-14965, 2019.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Apoptosis and its pathways as targets for intracellular pathogens to persist in cells. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 60, 2024.

RONKINA, N.; GAESTEL, M. MAPK-activated protein kinases: servant or partner?. **Annual review of biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 505-540, 2022.

ROSKOSKI JR, R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. **Pharmacological research**, v. 66, n. 2, p. 105-143, 2012.

RUA, R. M., NOGALES, F., CARRERAS, O., OJEDA, M. L. Selenium, selenoproteins and cancer of the thyroid. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 76, p. 127115, 2023.

SANZANA, D. S., FAÚNDEZ, E. F., MELÉNDEZ, J., SOTO-ARRIAZA, M. Increased delivery and cytotoxicity of doxorubicin in HeLa cells using the synthetic cationic peptide pEM-2 functionalized liposomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 228, p. 113420, 2023.

SANZ-EZQUERRO, J. J.; CUENDA, A. p38 signalling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1003, 2021.

SBCO – Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica. **Como funciona a cirurgia para câncer de colo de útero**. Rio de Janeiro: SBCO, 12 dez. 2023. Disponível em: <https://sbco.org.br/como-funciona-a-cirurgia-para-cancer-de-colo-de-utero/>. Acesso em julho de 2025.

SCHAAFSMA, M., SCHUURMAN, T.N., KOOTSTRA, P., ISSA, D., HERMANS, I., BLEEKER, M.C., ZUSTERZEEL, P.L., BEKKERS, R.L., SIEBERS, A.G., MOM, C.H., VAN TROMMEL, N.E. Nationwide cohort study on the risk of high-grade cervical dysplasia and carcinoma after conservative treatment or hysterectomy for adenocarcinoma in situ. **International journal of cancer**, 156(6), pp.1203-1212, 2025.

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.

SELENICA, Pier et al. Massively parallel sequencing analysis of 68 gastric-type cervical adenocarcinomas reveals mutations in cell cycle-related genes and potentially targetable mutations. **Modern Pathology**, v. 34, n. 6, p. 1213-1225, 2021.

SEYOUM, A., ASSEFA, N., GURE, T., SEYOUM, B., MULU, A., MIHRET, A. Prevalence and genotype distribution of high-risk human papillomavirus infection among Sub-Saharan African women: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 890880, 2022.

SICIUS, H. Chalcogens: Elements of the Sixth Main Group. In: **Handbook of the Chemical Elements**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 351-401, 2024.

SINGH, P.; LIM, B. Targeting apoptosis in cancer. **Current oncology reports**, v. 24, n. 3, p. 273-284, 2022.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio-protocols**, v. 5, n. 9, 2019.

SMILEY, S. T., REERS, M., MOTTOLA-HARTSHORN, C., LIN, M., CHEN, A., SMITH, T. W., CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 9, p. 3671-3675, 1991.

SOUSA, V. M. D., DUARTE, S. S., FERREIRA, R. C., SOUSA, N. F. D., SCOTTI, M. T., SCOTTI, L., SOBRAL, M. V. AMTAC-19, a Spiro-Acridine Compound, Induces In Vitro Antitumor Effect via the ROS-ERK/JNK Signaling Pathway. **Molecules**, v. 29, n. 22, p. 5344, 2024.

SOUZA, H. D. S. **Selenoglicolicamidas: síntese, caracterização e avaliações das atividades antimicrobiana, leishmanicida e citotóxica em células tumorais**. 2018. 232 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

STINE, Z. E., SCHUG, Z. T., SALVINO, J. M., DANG, C. V. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. **Nature reviews Drug discovery**, v. 21, n. 2, p. 141-162, 2022.

STULPINAS, A., TENKUTYTE, M., IMBRASAITĖ, A., KALVELYTE, A. V. The role and efficacy of JNK inhibition in inducing lung cancer cell death depend on the concentration of cisplatin. **ACS omega**, v. 9, n. 26, p. 28311-28322, 2024.

SUGIURA, R.; SATOH, R.; TAKASAKI, T. ERK: a double-edged sword in cancer. ERK-dependent apoptosis as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cells*, v. 10, n. 10, p. 2509, 2021.

SUN, Q., WANG, L., ZHANG, C., HONG, Z., HAN, Z. Cervical cancer heterogeneity: a constant battle against viruses and drugs. **Biomarker Research**, v. 10, n. 1, p. 85, 2022.

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.

TAKEGAWA, R., HAYASHIDA, K., MURAO, A., ENDO, Y., KUSCHNER, C. E., KAZMI, J., BECKER, L. B. The role of homogenization cycles and Poloxamer 188 on the quality of mitochondria isolated for use in mitochondrial transplantation therapy. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 3350, 2025.

TAM, S. Y.; LAW, H. K. JNK in tumor microenvironment: present findings and challenges in clinical translation. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2196, 2021.

TAN, B.; NORHAIZAN, M. Manilkara zapota (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. **Biomed. Pharmacother.**, v. 110, p. 748-757, 2018.

TANIMURA, K., YAMADA, T., HORINAKA, M., KATAYAMA, Y., FUKUI, S., MORIMOTO, K., TAKAYAMA, K. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling increased apoptosis and prevented the emergence of ALK-TKI-tolerant cells in ALK-rearranged non-small cell lung cancer. **Cancer Letters**, v. 522, p. 119-128, 2021.

TANWAR, P.. Understanding Carcinogenesis: The Process of Cancer Development. **Research Journal of Oncology**, v. 8, n. 2, p. 17, 26 dez. 2024.

THIGPEN, T., SHINGLETON, H., HOMESLEY, H., LAGASSE, L., BLESSING, J. Cis-platinum in treatment of advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a phase II study of the Gynecologic Oncology Group. **Cancer**, v. 48, n. 4, p. 899-903, 1981.

TIMOFEEV, O., GIRON, P., LAWOW, S., PICHLER, M., NOEPARAST, M. ERK pathway agonism for cancer therapy: evidence, insights, and a target discovery framework. **npj Precision Oncology**, v. 8, n. 1, p. 70, 2024.

TOMAS-LOBA, A., MANIERI, E., GONZALEZ-TERAN, B., MORA, A., LEIVA-VEGA, L., SANTAMANS, A. M., SABIO, G. p38γ is essential for cell cycle progression and liver tumorigenesis. **Nature**, v. 568, n. 7753, p. 557-560, 2019.

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

ULLAH, A., RAZZAQ, A., ALFAIFI, M. Y., ELBEHAIRI, S. E. I., MENAA, F., ULLAH, N., IQBAL, H. Sanguinarine attenuates lung cancer progression via oxidative stress-induced cell apoptosis. **Current Molecular Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. e18761429269383, 2024.

Ullah, R., Yin, Q., Snell, A. H., Wan, L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, p. 123-154, 2022.

VALDIVIA, A., GRAU-BÉJAR, J. F., GARCÍA-DURÁN, C., OAKNIN, A. Treatment strategies in cervical cancer: treatment of advanced disease. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 8, p. N/A-N/A, 2022.

VALLEJO-RUIZ, V., GUTIERREZ-XICOTENCATL, L., MEDINA-CONTRERAS, O., LIZANO, M. Molecular aspects of cervical cancer: a pathogenesis update. **Frontiers in Oncology**, v. 14, p. 1356581, 2024.

VINCETI, M., FILIPPINI, T., CILLONI, S., BARGELLINI, A., VERGONI, A. V., TSATSAKIS, A., FERRANTE, M. Health risk assessment of environmental selenium: emerging evidence and challenges. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 5, p. 3323-3335, 2017.

VORA, C.; GUPTA, S. Targeted therapy in cervical cancer. **ESMO open**, v. 3, p. e000462, 2018.

WADA, M., CANALS, D., ADADA, M., COANT, N., SALAMA, M. F., HELKE, K. L., HANNUN, Y. A. P38 delta MAPK promotes breast cancer progression and lung metastasis by enhancing cell proliferation and cell detachment. **Oncogene**, v. 36, n. 47, p. 6649-6657, 2017.

WALY, Y. M., SHARAFELDIN, A. B., AL-MAJMUEI, A., ALATOOM, M., FREDERICKS, S., ALOIA, A. A. Assessment of HPV screening modalities within primary care: a systematic review. **Frontiers in Medicine**, v. 12, p. 1567509, 2025.

WANG, K., FU, X. T., LI, Y., HOU, Y. J., YANG, M. F., SUN, J. Y., SUN, B. L. Induction of S-phase arrest in human glioma cells by selenocysteine, a natural selenium-containing agent via triggering reactive oxygen species-mediated DNA damage and modulating MAPKs and AKT pathways. **Neurochemical research**, v. 41, n. 6, p. 1439-1447, 2016.

WATKINS, D. E., CRAIG, D. J., VELLANI, S. D., HEGAZI, A., FREDRICKSON, K. J., WALTER, A., NEMUNAITIS, J. Advances in targeted therapy for the treatment of cervical cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 18, p. 5992, 2023.

WILD, C. P.; ELISABETE W.; BERNARD W. STEWART. "World cancer report." (2020). Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 15 de julho 2025.

WINTER, J. M.; YADAV, T.; RUTTER, J. Stressed to death: Mitochondrial stress responses connect respiration and apoptosis in cancer. **Molecular cell**, v. 82, n. 18, p. 3321-3332, 2022.

WU, J., JIN, Q., ZHANG, Y., JI, Y., LI, J., LIU, X., HUANG, Y. Global burden of cervical cancer: current estimates, temporal trend and future projections based on the GLOBOCAN 2022. **Journal of the National Cancer Center**, 2025.

WU, P., XIONG, H., YANG, M., LI, L., WU, P., LAZARE, C., XING, H. Co-infections of HPV16/18 with other high-risk HPV types and the risk of cervical carcinogenesis: a large population-based study. **Gynecologic Oncology**, v. 155, n. 3, p. 436-443, 2019.

XIAO, J., YAN, M., ZHOU, K., CHEN, H., XU, Z., GAN, Y., WU, Z. A nanoselenium-coating biomimetic cytomembrane nanoplatfor for mitochondrial targeted chemotherapy-and chemodynamic therapy through manganese and doxorubicin codelivery. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 227, 2021.

XU, M., CAO, C., WU, P., HUANG, X., MA, D. Advances in cervical cancer: current insights and future directions. **Cancer Communications**, v. 45, n. 2, p. 77-109, 2025.

YE, J., ZHENG, L., HE, Y., QI, X. Human papillomavirus associated cervical lesion: pathogenesis and therapeutic interventions. **MedComm**, v. 4, n. 5, p. e368, 2023.

YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. N-acetyl-l-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. **International journal of environmental research and public health**, v. 4, n. 2, p. 132-137, 2007.

YU, L.; MAJERCIK, V.; ZHENG, Z. HPV16 and HPV18 genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 9, p. 4943, 2022.

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, p. 1710, 2022.

YUAN, W., SHI, Y., DAI, S., DENG, M., ZHU, K., XU, Y., LIANG, S. The role of MAPK pathway in gastric cancer: unveiling molecular crosstalk and therapeutic prospects. **Journal of translational medicine**, v. 22, n. 1, p. 1142, 2024.

YUAN, Y., CHEN, J., GE, X., DENG, J., XU, X., ZHAO, Y., WANG, H. Activation of ERK–Drp1 signaling promotes hypoxia-induced A β accumulation by upregulating mitochondrial fission and BACE1 activity. **FEBS open bio**, v. 11, n. 10, p. 2740-2755, 2021.

ZHANG, B., PAN, C., FENG, C., YAN, C., YU, Y., CHEN, Z., WANG, X. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. **Redox Report**, v.

27, n. 1, p. 45-52, 2022.

ZHAO, S., MENG, Y., CAI, W., LUO, Q., GAO, H., SHEN, Q., SHI, D.
Docosahexaenoic Acid Coordinating with Sodium Selenite Promotes Paraptosis in Colorectal Cancer Cells by Disrupting the Redox Homeostasis and Activating the MAPK Pathway. **Nutrients**, v. 16, n. 11, p. 1737, 2024.

ZHAO, Y., YE, X., XIONG, Z., IHSAN, A., ARES, I., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ, M. A. Cancer metabolism: the role of ROS in DNA damage and induction of apoptosis in cancer cells. **Metabolites**, v. 13, n. 7, p. 796, 2023.

ZHOU, Z., ARROUM, T., LUO, X., KANG, R., LEE, Y. J., TANG, D., SONG, X.
Diverse functions of cytochrome c in cell death and disease. **Cell Death & Differentiation**, v. 31, n. 4, p. 387-404, 2024.

ZHU, H., LUO, H., ZHANG, W., SHEN, Z., HU, X., ZHU, X. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug design, development and therapy**, p. 1885-1895, 2016.