



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

ERICKA FERNANDA FERREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL, *IN VITRO*, DE COMPOSTO
DERIVADO DE SELÊNIO**

RECIFE – PE

2016

ERICKA FERNANDA FERREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL, *IN VITRO*, DE COMPOSTO
DERIVADO DE SELÊNIO**

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ellen Cordeiro Bento da Silva.

RECIFE – PE

2016

ERICKA FERNANDA FERREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL, *IN VITRO*, DE COMPOSTO
DERIVADO DE SELÊNIO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau do Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, a disposição na Biblioteca Central desta Universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitada às normas éticas científicas.

Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz
Discente

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Aplicada – UFRPE
Orientador/Presidente

Prof^a. Dr^a. Aurea Wischral
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Maria de Mascena Diniz Maia
Departamento de Biologia - UFRPE

Dr^a Silvany de Sousa Araujo
UFRPE

"Bendito és Tu, Senhor, Deus de Israel, nosso pai, de eternidade em eternidade. Teu, Senhor, é o poder, a honra, a vitória e a majestade; porque teu é tudo quanto há nos céus e na terra; teu, Senhor, é o reino, e tu te exaltaste por chefe sobre todos. Riquezas e glória vêm de ti, tu dominas sobre tudo, na tua mão há força e poder; contigo está o engrandecer e a tudo dar força. Agora, pois, ó nosso Deus, graças te damos e louvamos o teu glorioso nome. Porque quem sou eu, e quem é o meu povo para que pudéssemos dar voluntariamente todas estas coisas? Porque tudo vem de ti, e das tuas mãos to damos."

(Bíblia Sagrada: 1ª Crônicas, cap. 29, vs. 10-14)

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, soberano criador e galardoador de todas as bênçãos, por sua graça, misericórdia e amor incondicional.
- A meus pais, Gildo Queiroz e Luzinete Queiroz e a minha irmã Millana Queiroz, sem os quais essa conquista não seria possível.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filhos pela oportunidade, apoio, encorajamento e ensinamentos.
- A professora Ellen Cordeiro da Silva pelo carinho, disponibilidade, atenção e ensinamentos imprescindíveis.
- Meu agradecimento especial a Diego Dantas pela oportunidade de ter aprendido grandes lições de perseverança, dedicação e simplicidade que levarei por toda a vida
- A Silvany Araujo e Luciana Costa pelo compartilhamento de experimentos e esforços para obtenção dos melhores resultados possíveis.
- Ao casal Cloves Alberto e Elizabeth grandes amigos que quero levar por toda a vida. É um privilégio tê-los conhecido e compartilhado vitórias e dificuldades.
- Aos colegas de laboratório Diogo, Jamilly Macêdo, Isabella Ramalho e Ariele Milet que me receberam com carinho e paciência.
- A todos os meus familiares avó (Alzira Maria) tias e tios, e os primos queridos.
- A Lúcia Arruda e André Mariano pela paciência, disponibilidade, atenção e valioso auxílio com a citometria de fluxo.
- A CAPES pelo apoio financeiro e bolsa concedida.
- A UFRPE pelos valiosos anos em que tive a oportunidade de crescer intelectual, pessoal e socialmente.

LISTA DE FIGURAS

Parte Textual

Figura 1: Estimativa mundial de incidência e mortalidade relacionadas ao câncer.....	15
Figura 2: Incidência de câncer, em números absolutos, nas diversas regiões político-administrativas do Brasil.....	16
Figura 3: Etapas da carcinogênese.....	19
Figura 4: Via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	22
Figura 5: Esquema da cascata de metástase.....	26
Figura 6: Características adquiridas pelas células tumorais.....	27
Figura 7: Representação da translocação entre os cromossomos 15 e 17 – t(15;17) e conseqüente fusão dos genes PML e RAR α	28
Figura 8: Alvos celulares da quimioterapia.....	31
Figura 9: Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos em relação à fase do ciclo celular.....	32
Figura 10: Estrutura química dos derivados de platina: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.....	34
Figura 11: Estrutura química, em 2D, da doxorubicina.....	35
Figura 12: Estrutura química, em 2D, da 5-FU.....	36
Figura 13: Estrutura química do docetaxel e paclitaxel.....	37
Figura 14: Estrutura, química, em 2D, do selenito e do selol.....	43

Artigo Científico

Figure 1: Structural formula of selenium compound. MW = 363.23 g/mol ¹	81
Figure 2: Assessment of cellular viability (%) in HL-60 line (A) and PBMC cells (B) after 24 hours of incubation with compound HSe-02 at four different concentrations. IC ₅₀ values are expressed in μ g/mL. Data were compared to negative control (non-treated group) by ANOVA, followed by Student Newman-Keuls test. **p<0.01, ***p<0.001.....	82
Figure 3: A) Assessment of membrane integrity of HL-60 cells after incubation with different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. B)	

Percentage of cell viability, necrosis and apoptosis in HL-60 cells treated at different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. **C)** Assessment of mitochondrial depolarization by JC-1 assay of HL-60 cells incubated at different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. Data are mean \pm SEM and were compared to negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. DOX - Doxorubicin (0.78 $\mu\text{g/mL}$)..... 83

Figure 4: Determination of expression of caspases 3 and 7. CP = predominance of dead cells by apoptotic pathway, highlighted by high expression of caspases (green quadrant), followed by necrotic events (red quadrant); Treat. 3.12 = It is observed low cytotoxicity, as evidenced by predominance of events in unlabeled field (gray quadrant), accompanied by low caspases expression (green and brown quadrant); Treat. 6.25 = preponderance of apoptotic events demonstrated by caspases expression (green and brown quadrant), followed by unlabeled cells. It is not observed necrotic cells; Treat. 12.5 = high caspases expression (green and brown quadrant), followed by unlabeled cells..... 84

Figure 5: A) Assessment of expression of caspases 3 and 7 by flow cytometry. HL-60 cells were incubated with different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. **B)** Percentage of tumor cells HL-60 killed without activation of apoptotic pathway. Cells were exposed to different concentrations of Hlf-02 for 24 hours. Data are mean \pm SEM and were compared to positive control by ANOVA followed by the post hoc Tukey test. $**p < 0.01$. DOX - Doxorubicin (0.78 $\mu\text{g/mL}$)..... 85

LISTA DE TABELAS

Parte Textual

Tabela 1: Principais classes de antineoplásicos, seus respectivos mecanismos de ação, principais tipos de cânceres sobre os quais atuam e seus principais representantes..... 38

Tabela 2: Dose recomendada e limite máximo tolerado de Se de acordo com a idade..... 41

Artigo Científico

Table 1: Mean (\bar{X}) and standard error of the mean (SEM) of cytotoxic activity of selenium organic compound HSe-02 in tumor cell line (HL-60) and non-tumor cells (PBMC) compared to doxorubicin..... 86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BE – Brometo de etídio

CI₅₀ - Concentração que inibe 50% do crescimento celular

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

DCF - Diacetato de carboxifluoresceína

DMSO - Dimethyl sulphoxide (Dimetil Sulfóxido)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DOX – Doxorrubicina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM – Erro padrão médio

EROS – Espécies reativas de oxigênio

JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina

HL-60 – Linhagem celular - Leucemia promielocítica aguda

HSe-02 – Se-(2-oxo-2-(4-nitrofenilamina))benzoselenoato de etila

IARC - International Agency for Research on Cancer

IP – Iodeto de propídio

IV - Espectroscopia de infravermelho

LA – Laranja de acridina

LA/BE – Laranja de acridina/Brometo de etídio

LLA – Leucemia linfocítica aguda

LMA – Leucemia mieloide aguda

LPA – Leucemia promielocítica aguda

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio

NT – Não testado

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

PBMC – Peripheral blood mononuclear cells (linfócitos, monócitos e neutrófilos)

PML – Gene que codifica a proteína da leucemia promielocítica

RAR α – Gene do receptor alfa do ácido retinóico

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear carbono-13

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Se – Selênio

T3 – Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TRAT - Tratamento

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

O câncer configura-se como um importante problema de saúde pública, principalmente para os países em desenvolvimento. Diante disso, são crescentes, em todo o mundo, as pesquisas que buscam o desenvolvimento de novos e mais eficientes fármacos contra o câncer. Nessa perspectiva, os compostos derivados do selênio ganham significativa importância devido às diversas experiências que destacam o seu potencial antitumoral, bem como baixa citotoxicidade para células não tumorais. Neste trabalho objetivou-se avaliar o potencial antitumoral, *in vitro*, do composto HSe-02 (Se-(2-oxo-2-(4-nitrofenilamina))benzoselenoato de etila), inédito e derivado do selênio, na linhagem tumoral de leucemia promielocítica aguda (HL-60), bem como em células não tumorais (linfócitos, monócitos e neutrófilos). A avaliação do potencial citotóxico do HSe-02 foi realizada pelo método do MTT, utilizando as concentrações de 0,395; 0,781; 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 50,0 µg/mL. Após 24 horas de incubação, verificou-se que o HSe-02 promoveu a redução da viabilidade das células tumorais já na concentração de 3,12 µg/mL ($p < 0,01$), apresentando maior citotoxicidade para as células tumorais em detrimento as não tumorais. O composto também apresentou menor citotoxicidade ($CI_{50} = 3,42 \pm 0,14$) quando comparado com o controle positivo – doxorubicina ($CI_{50} = 0,52 \pm 0,13$), droga largamente utilizada no tratamento de neoplasias. Os demais experimentos foram feitos utilizando apenas a linhagem tumoral. A avaliação da integridade da membrana plasmática foi feita por citometria de fluxo, utilizando dois fluorocromos: Iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína. Quando comparado ao controle negativo, o composto apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) de células com membranas íntegras nas concentrações de 6,25 e 12 µg/mL. O HSe-02 apresentou, nas concentrações 3,12, 6,25 e 12,5 µg/mL, maiores valores de células com membranas íntegras ($p < 0,001$) do que a doxorubicina. O padrão de morte celular foi analisado por microscopia de fluorescência, utilizando laranja de acridina e brometo de etídio. O composto ocasionou diminuição no percentual de células viáveis ($p < 0,05$), favoreceu o aumento de células em apoptose ($p < 0,05$) e não apresentou eventos necróticos significativos ($p > 0,05$). O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado pelo ensaio do JC-1. O composto de selênio promoveu significativa despolarização da membrana mitocondrial ($p < 0,01$), sugerindo, desta forma, a ativação da via intrínseca da apoptose. Na concentração de 12,5 µg/mL promoveu uma despolarização superior a doxorubicina ($p < 0,001$). A expressão das caspases efetoras 3 e 7 foi avaliada utilizando o kit CellEvent™ Caspase-3/7 Green para citômetro de fluxo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão das caspases entre os grupos tratamento (3,12, 6,25 e 12,5 µg/mL) e o controle positivo ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que o selênio possui relevante potencial antitumoral por atuar de forma seletiva em células tumorais, induzindo eventos celulares e moleculares que culminam na morte do tumor por apoptose.

Palavras-chave: Câncer, Antineoplásico, Citotoxicidade, Quimioterápico, Apoptose.

ABSTRACT

The cancer appears as a major public health problem, especially for developing countries. Therefore, they are increasing around the world, research aimed at the development of new and more efficient drugs against cancer. In this perspective, the derivatives of selenium compounds gain significant importance because of the different experiences that highlight their antitumor potential as well as low cytotoxicity to non-tumor cells. This work aimed to evaluate the antitumor potential, *in vitro*, the compound HSe-02 (Se-(2-oxo-2-(4-nitrophenylamine)) benzoselenoato acetate), unpublished and derived from selenium in tumor lineage leukemia acute promyelocytic (HL-60) as well as in non-tumor cells (lymphocytes, monocytes and neutrophils). The evaluation of the cytotoxic potential of HSe-02 was performed by the MTT method using concentrations of 0,395; 0,781; 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 50,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$. After 24 hours of incubation, it was found that the HSe-02 promoted the reduction of viability of the tumor cells already at a concentration of 3,12 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($p < 0.01$), with higher cytotoxicity to tumor cells rather than the no tumor. The compound also showed lower cytotoxicity ($\text{CI}_{50} = 3,42 \pm 0,14$) when compared to the positive control - doxorubicin ($\text{CI}_{50} = 0,52 \pm 0,13$), widely used drug in the treatment of neoplasms. Other experiments were carried out using only the tumor. The assessment of membrane integrity was performed by flow cytometry using two fluorochrome: propidium iodide and carboxyfluorescein diacetate. When compared to the negative control, the compound exhibits a statistically significant reduction ($p < 0,001$) of cells with intact membranes in concentrations of 6,25 to 12 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The HSe-02 showed at concentrations 3,12; 6,25 and 12,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$, larger cells with intact membranes values ($p < 0,001$) than doxorubicin. The pattern of cell death was analyzed by fluorescence microscopy using acridine orange and ethidium bromide. The compound causes a decrease in the percentage of viable cells ($p < 0,05$), promoted the increase of apoptotic cells ($p < 0,05$) and no significant necrotic events ($p > 0,05$). The mitochondrial membrane potential was estimated by the JC-1 assay. The selenium compound caused a significant depolarization of the mitochondrial membrane ($p < 0,01$), suggesting thereby activating the intrinsic apoptosis pathway. At concentration of 12,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ promoted a greater depolarization doxorubicin ($p < 0.001$). The expression of the effector caspases 3 and 7 was performed using the kit CellEvent™ Caspase-3/7 Green for flow cytometer. No statistically significant difference was observed in the expression of caspases between treatment groups (3,12; 6,25 and 12,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) and positive control ($p > 0.05$). The results suggest that selenium has significant antitumor potential to act selectively in tumor cells, inducing cellular and molecular events that culminate in the death by apoptosis of the tumor.

Keywords: Cancer, Antineoplastic, Cytotoxicity, Chemotherapy, Apoptose.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	15
2.2 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	17
2.3 LEUCEMIA.....	27
2.4 FORMAS DE TRATAMENTO DO CÂNCER.....	29
2.5 COMPOSTOS DE SELÊNIO.....	40
2.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS.....	44
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4. REFERÊNCIAS.....	47
ARTIGO.....	65
APÊNDICE.....	87
APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO COMPOSTO ESTUDADO.	87
APÊNDICE B - PEDIDO DE PATENTE DEPOSITADO NO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL.....	88

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença resultante de alterações genéticas, ou seja, que causam modificações na estrutura do DNA, ou epigenéticas, que são capazes de alterar a constituição química do DNA, não alterando diretamente a sequência de nucleotídeos. Geralmente, os genes atingidos estão relacionados aos processos de indução e controle do ciclo de divisão celular e/ou um desequilíbrio no controle da morte celular programada (ALBERTS et al., 2003).

As células tumorais são definidas por múltiplas características estruturais, comportamentais e moleculares. Algumas alterações são citadas como essenciais na fisiopatologia do câncer que coletivamente determinam o crescimento maligno, capacidade proliferativa permanente, insensibilidade aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, bem como reprogramação metabólica, escape do sistema imune, instabilidade genômica e inflamação pró-tumorigênica (LUO, SOLIMINI e ELLEDGE, 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O combate ao câncer envolve a descoberta dos processos bioquímicos que levam a célula a se modificar e se tornar neoplásica, assim como as formas de induzir esta célula a sofrer morte celular. O processo de morte celular tem um papel fundamental no tratamento de várias doenças, pois é através da modulação das vias de morte que vários fármacos promissores estão sendo desenvolvidos para doenças como o câncer, doença isquêmica e doença neurodegenerativas. Os mecanismos complexos que controlam a morte celular estão sendo mais bem compreendido, o que torna cada vez mais evidente que diferentes vias de morte celular têm um papel crítico em múltiplas doenças, inclusive o câncer (KEPP et al., 2011).

Além do entendimento dos processos bioquímicos envolvidos na transformação neoplásica, o desenvolvimento de uma terapia segura e eficaz aliada à descoberta de novos e seletivos fármacos constituem passos importantes no tratamento do câncer.

A baixa eficiência das drogas disponíveis, bem como a resistência ao tratamento e os efeitos colaterais agressivos, impulsionam as pesquisas para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, que para serem eficazes devem ter a capacidade de atingir o tecido tumoral e destruir apenas as células tumorais (seletividade), além de apresentar um efetivo mecanismo de controle de liberação da sua forma ativa (PRAKASH et al., 2011).

Diante disso é crescente número de trabalhos que avaliam a atividade antitumoral de diversas substâncias naturais e sintéticas em modelos *in vitro* e *in vivo*. Dentre esses produtos, os compostos de selênio vêm chamando a atenção de oncologistas e pesquisadores da química farmacêutica, em virtude das experiências promissoras nos modelos *in vitro*, *in vivo* animal e humano, que destacam seu potencial como quimioterápico. Nesse sentido, diversas formulações, incluindo compostos inorgânicos, orgânicos a exemplo de compostos derivados de selenoaminoácidos, do ácido metilselênico, selênio conjugado com compostos heterocíclico e nanopartículas, vem sendo avaliados quanto à sua atividade antitumoral (FERNANDES e GANDIN, 2014).

Para este trabalho levantou-se a hipótese que um composto inédito derivado do ácido selenoglicólico, apresentaria atividade antitumoral frente à linhagem tumoral de leucemia promielocítica. A fim de avaliar tal atividade, foram desenvolvidos ensaios *in vitro*, como a análise do tipo de morte celular induzido pelo composto, a ação sobre a integridade de membrana, o potencial de membrana mitocondrial e a ativação das caspases efetoras 3 e 7.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, representando 13% do total, ou seja, cerca de oito milhões de mortes anuais. Estudos recentes mostram que estão surgindo anualmente aproximadamente 13 milhões de novos casos de câncer e que este número chegará a 17 milhões no final da presente década (GOULART, 2011). Em 2012 foram registrados 14 milhões de novos casos e aproximadamente 8,2 milhões de mortes relacionadas com o câncer, o equivalente a uma taxa de incidência e mortalidade de 182 e 102 por 100.000 habitantes, respectivamente (Fig. 1) (FERLAY et al., 2012).

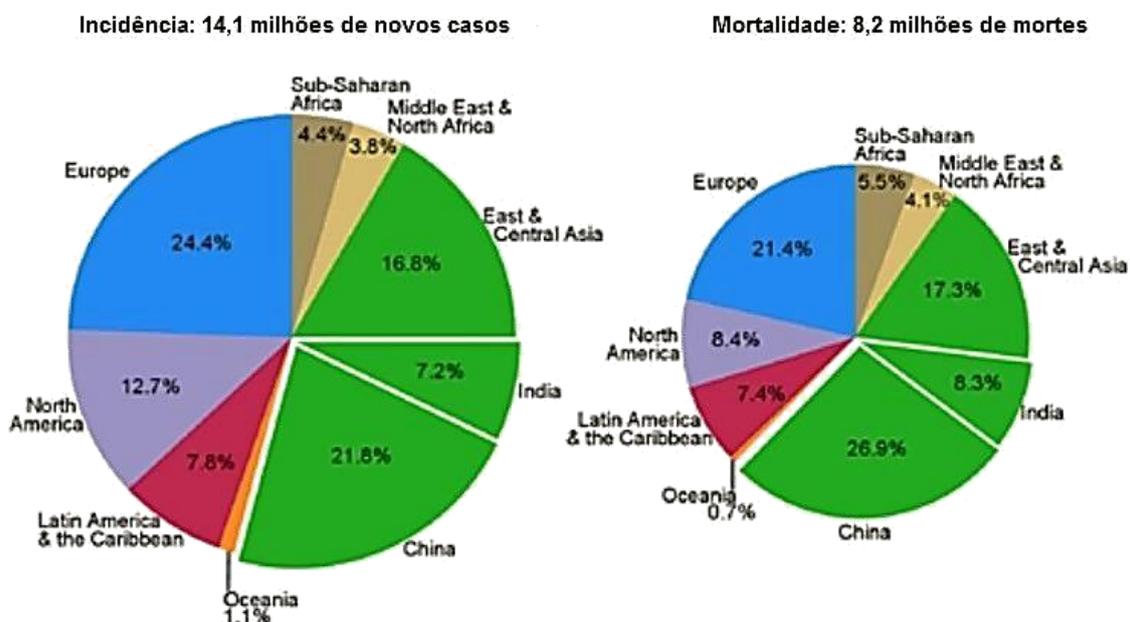


Figura 1. Estimativa mundial de incidência e mortalidade relacionadas ao câncer. Adaptada de WORLD CÂNCER REPORT, 2014.

Estima-se que a incidência de câncer continue aumentando, para o ano 2030 podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer. O maior efeito desse aumento irá incidir em países de baixa e média renda. O crescimento e envelhecimento da população nos países em desenvolvimento, somado a falta de detecção precoce e acesso ao tratamento, resultam na forma desproporcional com que

estes países são afetados pelo câncer em relação ao mundo. Mais de 60% do total de casos ocorrem na África, Ásia, América Central e América do Sul, representando 70% das mortes no mundo. (BRASIL, 2011; WORLD CANCER REPORT, 2014).

O fumo é, de longe, o fator de risco mais importante para a ocorrência do câncer. Foi a causa, em 2008, de 22% de todas as mortes ocasionadas por câncer (ERIKSEN et al., 2012). As infecções crônicas, causadas pelos vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), papilomavirus humano (HPV) e outros agentes infecciosos, representam outro importante fator de risco. Para o ano de 2008 foi estimado que dos 12,7 milhões de casos de câncer 2,1 milhões (16,4%) seriam causados por infecções. Esta porcentagem é substancialmente maior nas regiões menos desenvolvidas do mundo (23,4% de todos os cânceres) em comparação com as regiões mais desenvolvidas (7,5%) (DE MARTEL et al., 2012).

Para o Brasil, segundo estimativas do INCA para os anos de 2016/2017, deverá ocorrer o registro de 596 mil casos de câncer. Entre os homens, são esperados 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 300.800. As regiões mais afetadas, em números absolutos, serão: a sudeste, sul e nordeste, respectivamente (Fig. 2) (BRASIL, 2015a).

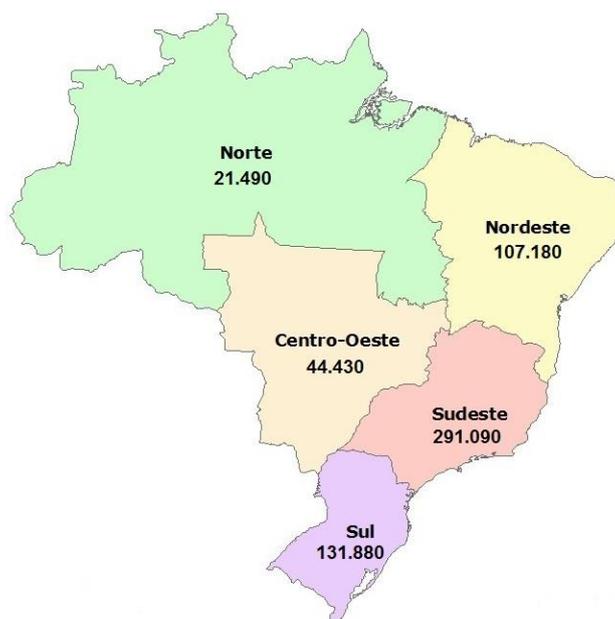


Figura 2. Incidência de câncer, em números absolutos, nas diversas regiões político-administrativas do Brasil. Adaptada de BRASIL, 2015a.

O tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos será o de pele não melanoma (175.760 casos novos a cada ano, sendo 80.850 em homens e 94.910 em mulheres), que corresponde a 29% do total estimado. Depois desse, para os homens, os cânceres mais incidentes serão os de próstata (61.200 novos casos/ano), pulmão (17.330), cólon e reto (16.660), estômago (12.920), cavidade oral (11.140), esôfago (7.950), bexiga (7.200), laringe (6.360) e leucemias (5.540). Entre as mulheres, as maiores incidências serão de cânceres de mama (57.960), cólon e reto (17.620), colo do útero (16.340), pulmão (10.860), estômago (7.600), corpo do útero (6.950), ovário (6.150), glândula tireoide (5.870) e linfoma não-Hodgkin (5.030) (BRASIL, 2015a).

A magnitude do câncer está relacionada aos fatores de risco, qualidade da assistência prestada, qualidade da informação e envelhecimento da população. Geralmente, quanto maior a proporção de pessoas idosas (tal como a população dos países da Europa, Estados Unidos e Canadá), maiores as taxas de incidência, especialmente dos tipos de câncer associados ao envelhecimento, como mama e próstata (BRASIL, 2015a).

O crescente aumento do número de casos novos fará com que não haja recursos suficientes para dar conta das necessidades de diagnóstico, tratamento e acompanhamento. As consequências serão mortes prematuras que poderiam ser evitadas. Assim, medidas preventivas devem ser implementadas agora para reduzir a carga do câncer, como: estratégias para o controle do tabagismo; programas de educação em saúde; promoção da alimentação saudável; vacinação; adoção de estilos de vida mais saudáveis, como uma alimentação adequada e a prática de atividade física; aumento e melhoria da formação de recursos humanos, na assistência aos pacientes e no incentivo à pesquisas. Essas medidas crescem em importância, principalmente em países como o Brasil, que se encontra em um processo de transição econômica, o que o faz ganhar, progressivamente, o ônus global do câncer observado em países economicamente desenvolvidos (BRASIL 2011, 2014).

2.2 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais

com potencial de invadir os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Sua origem se dá pela combinação de alterações genéticas e epigenéticas induzidas por fatores ambientais e de estilo de vida, que desencadeiam a inadequada ativação ou inativação de genes específicos, levando à transformação neoplásica (BRASIL, 2011, 2014; BIENNIAL REPORT, 2013).

Os mais de 100 tipos de câncer podem ser agrupados em quatro grandes grupos dependendo dos tecidos nos quais surgem. Os **carcinomas** são originários das células epiteliais da pele ou que revestem os órgãos internos, sendo o tipo mais frequente, representando 80% dos casos diagnosticados a cada ano. Os **sarcomas** são originários dos ossos, cartilagens, tecido adiposo, músculos, vasos sanguíneos ou outros tecidos conectivos ou de suporte. As **leucemias** originam-se em tecidos responsáveis pela formação das células sanguíneas como a medula óssea, levando a formação de um número anormal de células sanguíneas. Por fim, os **linfomas** são originários das células do sistema imune (PELENGARIS e KHAN, 2013).

O que difere o câncer de um tumor benigno é a sua capacidade de invadir os tecidos próximos (invasão local) e de colonizar regiões distintas do organismo através da corrente sanguínea e vasos linfáticos (metástase). Devido a essas características, os tumores malignos são extremamente mais mortais do que os benignos. Em 2010, nos Estados Unidos (EUA), por exemplo, os tumores malignos responderam por quase 98% das mortes ocasionadas por tumores (574.743 mortes por tumores malignos e 14.917 por tumores benignos) (MURPHY et al., 2013).

As evidências sugerem que a maior parte dos tumores é originária de uma única célula que devido a uma mutação, adquiriu certa vantagem proliferativa em relação às células normais. A célula mutada produz clones que também carregam a mutação e que, portanto, também possuem uma vantagem proliferativa (HEIDI et al., 2009; KUMAR et al., 2010).

Segundo Bogliolo e Brasileiro (2011), a formação e desenvolvimento de neoplasias, conhecido como carcinogênese é um processo lento e complexo

que se desenvolve em três principais etapas: iniciação, promoção e progressão.

O estágio inicial é caracterizado por uma série de mutações cumulativas no material genético, que predispõe células normais à evolução maligna e imortalidade. As alterações podem ser decorrentes de uma lesão genética não letal, que pode ocorrer espontaneamente ou pela exposição à agentes ambientais, como substâncias químicas, radiação ou vírus. A promoção, segunda etapa da carcinogênese, é marcada pela proliferação da célula mutada, bem como sua ampliação clonal (HEIDI et al., 2009; KUMAR et al., 2010). A progressão é um processo irreversível, caracterizada pela presença de alterações fenotípicas, instabilidade gênica, aceleração no crescimento, autonomia replicativa, invasiva e metástase (Fig. 3) (OLIVEIRA et al., 2007).

ETAPAS DA CARCINOGENESE

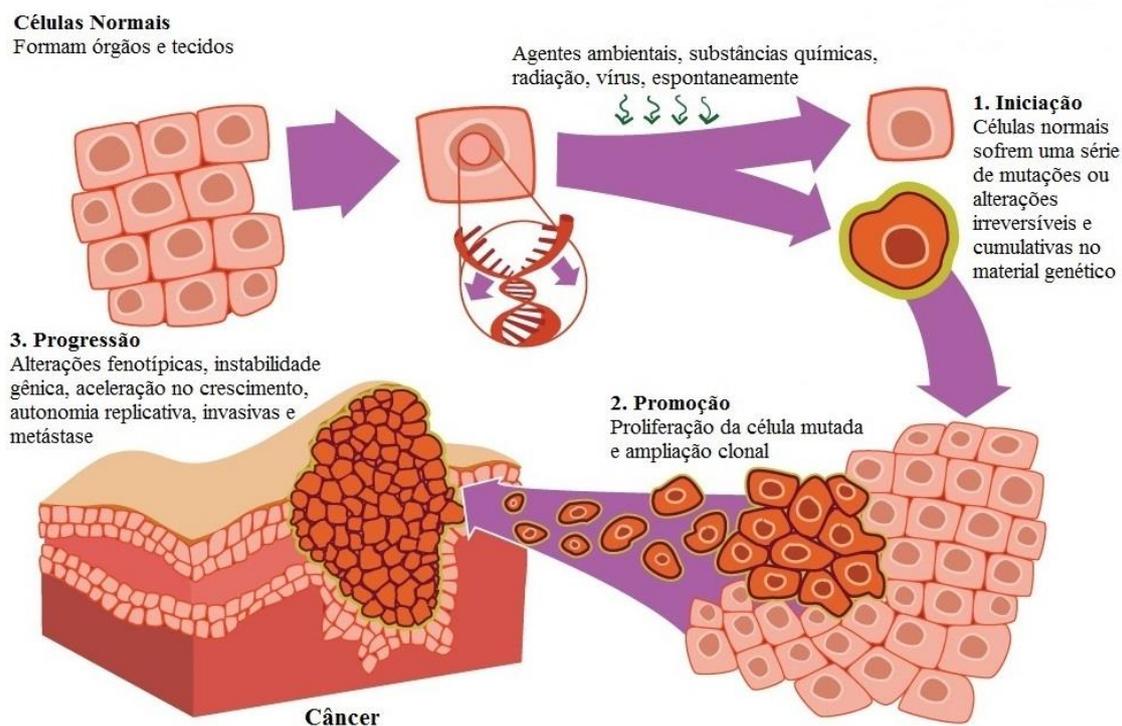


Figura 3. Etapas da carcinogênese. Adaptada de <https://questoesdefisicomentadas.files.wordpress.com/2015/02/cancer.jpg>. Acesso em :10 de Fev. de 2016.

A progressiva transformação de uma célula normal para o estado neoplásico é um processo complexo e requer a aquisição sucessiva de determinadas características que lhe possibilita torna-se tumorigênica e,

finalmente maligna. Hanahan e Weinberg (2011) sugerem que um grupo de seis mutações na fisiologia das células é suficiente para que o câncer se desenvolva. Estas seis mutações, acompanhadas da instabilidade genética, são essenciais na origem e disseminação de tumores. Tais características são:

1) Capacidade proliferativa desordenada: Sem dúvidas a característica mais marcante das células cancerígenas envolve sua capacidade de sustentar a proliferação desordenada (crônica). Tecidos normais controlam atentamente a produção e liberação de sinais mitogênicos (proliferativos) que instruem a entrada, a progressão do ciclo de crescimento celular e divisão, e assim, a manutenção da função e arquitetura do tecido normal. As células cancerosas, através da desregulação desses sinais, se tornam mestres de seus próprios destinos adquirindo a capacidade de sustentar a sinalização mitogênica por diversas formas: estimulação autócrina de ligantes; envio de sinais para estimular as células normais a supri-las com fatores de crescimento; desregulação na sinalização dos receptores desses fatores, tornando as células hiperresponsivas a tais fatores; bem como defeitos nos mecanismos de *feedback* negativo, responsáveis por atenuar a sinalização proliferativa (BHOWMICK et al, 2004; CHENG et al, 2008; JIANG e LIU, 2009; SUDARSANAM e JOHNSON, 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

2) Insensibilidade aos supressores de crescimento: As células cancerígenas devem contornar programas poderosos que regulam negativamente a proliferação de células, muitos dos quais dependem da ação de genes supressores de tumor, os mais conhecidos são o *RB* e o *TP53*, cujos produtos atuam como controladores centrais dentro de dois circuitos complementares que regem as decisões de proliferação e ativação de senescência celular, bem como programas apoptóticos (BURKHART e SAGE, 2008; KNUDSEN e KNUDSEN, 2008; AYLON e OREN, 2011; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A proteína pRb, produto do gene *RB*, integra sinais de fontes intra e extracelulares (principalmente) e, em resposta, decide se uma célula deve ou não prosseguir o seu ciclo de crescimento e divisão. Foi observado que numa ampla gama de cânceres humano esse gene encontra-se inativado devido a

diversos fatores, como: mutação, deleção, perda de expressão, sobre-expressão de cíclicas do tipo D, expressão de oncoproteínas virais, entre outros (BURKHART e SAGE, 2008; GORDON e DU, 2011; ZHAO et al, 2014). O gene *TP53* é o mais frequentemente mutado em cânceres humano (KANDOTH et al., 2013). Alterações foram encontradas em praticamente todas as regiões da proteína, as mais frequentemente associadas aos tumores foram resultado de mutações missense (substituição de um único nucleotídeo por outro) que podem ser estavelmente expressas nas células tumorais. Essas substituições ocorrem ao longo da proteína e conduzem geralmente a uma perda ou diminuição da atividade do tipo selvagem da p53. Essas proteínas mutantes podem funcionar como inibidores negativos dominantes sobre qualquer remanescente p53 de tipo selvagem (WANG et al., 2011; LEROY et al., 2013; MULLER e VOUSDEN, 2014).

3) Resistência à morte celular: A apoptose, ou morte celular programada, é um processo geneticamente programado que resulta na fragmentação do DNA e morte celular, desempenha papel importante em vários processos fisiológicos, tais como remodelagem dos tecidos, e na manutenção do sistema imune. A sua desregulação pode acarretar malformações e doenças, como é observado no desenvolvimento e progressão do câncer, onde a célula falha ao iniciar o processo de apoptose em resposta ao dano no DNA. A apoptose é orquestrada por uma família de cisteína proteases chamadas caspases. Duas vias apoptóticas são possíveis. Uma delas, a via extrínseca, ocorre através da ligação de ligantes (Fas, TNF α e TRAIL) em seus receptores de membrana, recrutamento de FADD e ativação da caspase-8. A outra via, chamada de via intrínseca ou mitocondrial, envolve a liberação de citocromo c da mitocôndria, desencadeada pela proteína Bax, membro pró-apoptótico da família Bcl2. A liberação de citocromo c leva à ativação de Apaf-1, uma proteína ATP ou dATP dependente capaz de se ligar à pró-caspase-9, formando um apoptossomo capaz de auto ativar a caspase-9. Tanto a caspase-8 quanto a caspase-9 ativadas desencadeiam a ativação de caspases efetoras (caspases-3,-6,-7) capazes de clivar substratos celulares levando à apoptose (Fig. 4) (LIU et al., 1996; LI et al., 1997; YANG et al., 1997; ZOU et al., 1997; GREEN, 2000; OW et al., 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011; TAKEKAWA et al., 2011).

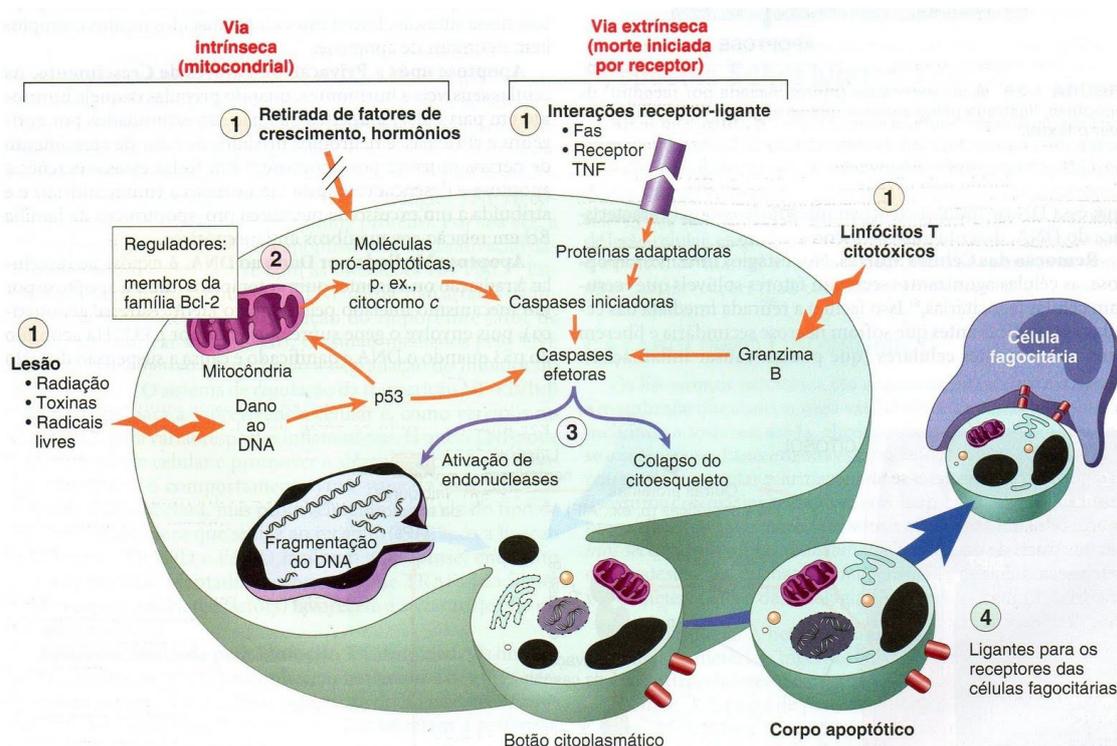


Figura 4. Via intrínseca e extrínseca da apoptose. Fonte: KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005.

Embora as condições que desencadeiam a apoptose ainda não sejam totalmente esclarecidas, foram identificados vários sensores de anormalidades celulares, os quais desempenham um papel chave no desenvolvimento de tumores. O mais notável é o sensor de danos no DNA que funciona através da expressão do gene supressor de tumor *TP53* que, em resposta a quebras no DNA e outras anormalidades cromossômicas, induz a super-expressão das proteínas Noxas e Puma-BH3, responsáveis pelo desencadeamento da apoptose (LOWE, CEPERO e EVAN, 2004; ADAMS e CORY, 2007; JUNTILLA e EVAN, 2009).

As células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias para limitar ou burlar a apoptose, a mais comum é a perda da função supressora de tumores do gene *TP53*. Alternativamente, os tumores podem: aumentar a expressão de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x_L) ou de sinais de sobrevivência (Igf-1/2), baixar a expressão de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim Puma), entre outros. Acredita-se que a multiplicidade de mecanismos para evitar a apoptose reflete a diversidade de sinais indutores de apoptose que as

populações de células cancerígenas encontram durante a sua evolução para o estado maligno (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Outro tipo de morte celular que pode estar envolvido no processo tumorigênico, a autofagia é um processo de autodigestão de uma célula causada pela ação de enzimas lisossomais da própria célula levando a digestão de estruturas citoplasmáticas. É um processo catabólico geralmente utilizado como um mecanismo de sobrevivência em condições de estresse celular, como a deficiência de nutrientes (MIZUSHIMA, 2007; LEVINE e KROEMER, 2008; DENTON, NICOLSON e KUMAR, 2012). A autofagia exerce um papel crítico nas células em resposta a vários estímulos, além de ter um papel essencial na manutenção da integridade genômica e mitocondrial. Falhas nesta via estão associadas a diversas patologias como infecções, doenças neurodegenerativas, doenças metabólicas, bem como instabilidade genômica, provocada pelo estresse oxidativo, e a inflamação, provendo um ambiente propício para o surgimento de tumores (TOOZE e YOSHIMORI, 2010; VESSONI et al., 2013; JIANG e MIZUSHIMA, 2014).

Observou-se que ratos portadores de alelos inativados de certos genes reguladores da maquinaria autofágica apresentaram aumento da susceptibilidade ao câncer, sugerindo que a indução da autofagia pode servir como uma barreira para a tumorigênese, que pode operar de forma independente ou em conjunto com a apoptose (KROEMER e POUYSSEGUR, 2008; WHITE e DIPAOLA, 2009).

Evidências sugerem que a ativação da autofagia, em células normais, age como mecanismo supressor de tumores. Contudo, nas células tumorais a ativação desta via possui papel distinto, ou seja, depende do estágio da tumorigênese. Nos estágios iniciais atua como um mecanismo protetor, evitando a progressão tumoral, entretanto em fases avançadas da doença, a autofagia dificulta a eliminação do tumor e leva à resistência ao tratamento, uma vez que contribui para a manutenção dos níveis energéticos intracelulares, permitindo a sobrevivência das células tumorais (RUBINSZTEIN et al., 2007; ROSENFELDT e RYAN, 2011). Evidências sugerem que, quando expostas a tratamentos como, quimioterápicos, as células cancerígenas podem entrar em

um estado de dormência reversível, ativando para isso a via autofágica (LU et al., 2008; WHITE e DIPAOLA, 2009). Também é possível que a autofagia esteja envolvida na promoção da metástase. Quando as células tumorais perdem o contato com a matriz extracelular, o que normalmente levaria à morte celular apoptótica, a autofagia é ativada para promover a sobrevivência da célula e, desta forma, contribuir para a invasão de outros tecidos (XU et al., 2013).

Apesar da necessidade de maiores pesquisas e diante dos diferentes papéis que a autofagia pode exercer na tumorigênese, o mecanismo autofágico parece representar mais uma barreira contra o desenvolvimento de tumores do que um fator promotor (WHITE e DIPAOLA, 2009).

Diferentemente da apoptose e da autofagia, a morte celular por necrose libera sinais pró-inflamatórios para o microambiente circundante do tecido, o que pode desencadear o recrutamento de células inflamatórias do sistema imunológico com o objetivo de examinar a extensão do dano tecidual e remover restos necróticos. No contexto de neoplasias, várias evidências indicam que as células inflamatórias do sistema imunológico podem promover o desenvolvimento do tumor, pois são capazes de promover angiogênese local, favorecendo, desta forma, a proliferação de células cancerosas, bem como a invasividade (GALLUZZI e KROEMER, 2008; GRIVENNIKOV et al., 2010; WHITE et al., 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Conseqüentemente, a morte celular por necrose, embora aparentemente benéfica para contrabalancear a hiperproliferação associada ao câncer, pode vir a trazer mais danos do que benefícios, uma vez que as células inflamatórias podem liberar fatores de crescimento para as células cancerígenas sobreviventes, estimulando a sua proliferação e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

4) Potencial replicativo ilimitado: As células normais possuem um potencial limitado de crescimento e divisão celular que está relacionado com o tamanho dos telômeros. Cada vez que a célula se divide os telômeros vão se encurtando, após um número crítico de divisões celulares se tornam tão curtos que a célula identifica esse encurtamento como um dano no DNA (FAGAGNA

et al., 2003). A resposta celular a esse dano é a ativação de genes que impedem a célula de proliferar, levando-a ao estado senescente (processo de envelhecimento) (ALLSOPP et al., 1992) . Porém, nas células cancerígenas, os mecanismos de defesa que levam a célula a senescência - são inativados. Isso faz com que essas células consigam manter a integridade de seus telômeros e, conseqüentemente, adquiram potencial replicativo ilimitado (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

5) Angiogênese sustentada: Os tecidos normais possuem uma rede de vasos sanguíneos distribuída de tal forma que cada célula receba por difusão uma quantidade adequada de nutrientes e oxigênio. Ao surgir em um tecido, o tumor utiliza os recursos provenientes dessa rede para nutrir-se, nesse estágio, o tumor é dito avascular. Para que o tumor continue evoluindo é necessário que ele induza o organismo a expandir a rede de vasos sanguíneos com o intuito de suprir suas demandas. Esse processo é denominado angiogênese e representa uma fase de transição na evolução tumoral: de uma lesão localizada e relativamente inofensiva para uma doença sistêmica e potencialmente fatal (ALARCÓN et al., 2003).

6) Invasão tecidual e metástase: Para invadir outros tecidos, as células tumorais precisam adquirir inúmeras características/habilidades, como: alteração da morfologia celular, capacidade migratória e de degradação das moléculas de adesão (mantêm as células tumorais aderidas a outras células e a matriz celular), bem como de sobreviver em um tecido distinto daquele de origem (GOICHEVA et al., 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O processo de invasão e metástase foi esquematizado como uma sequência de múltiplos passos denominados cascata de invasão e metástase. Este processo prevê uma série de alterações na biologia da célula tumoral, seguida de invasão local, na sequência ocorre à invasão e posterior evasão dos sistemas linfático e hematopoiético para o parênquima de tecidos distantes (extravasamento), formação de pequenos nódulos de células cancerígenas (micrometástases) e, finalmente, o desenvolvimento de lesões micrometastáticas em tumores macroscópicos, este último passo é chamado de colonização (Fig. 5) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

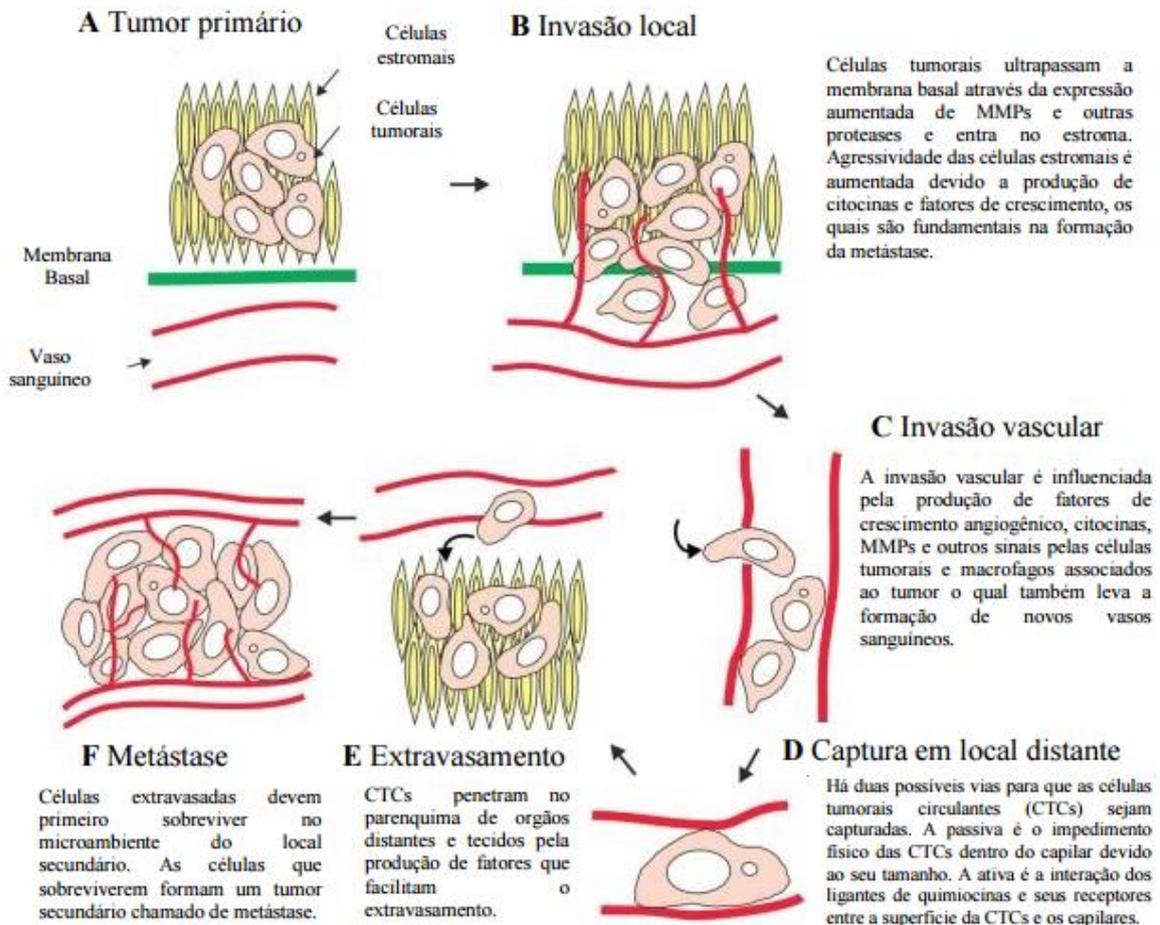


Figura. 5. Esquema da cascata de metástase. MMPs = metaloproteinases. Adaptada de MARYAS et al., 2014.

Hanahan e Weinberg (2011) adicionaram duas características envolvidas na patogênese de alguns e talvez todos os cânceres. A primeira envolve a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular para poder apoiar, de uma forma mais eficaz, a proliferação neoplásica. A segunda permite que as células cancerosas possam se evadir da destruição imunológica, em especial por linfócitos T e B e macrófagos. Por essas características ainda não terem sido totalmente validadas, são consideradas ainda como características emergentes. De forma adicional, duas características que os autores consideram consequentes ao câncer também estão sendo muito investigadas: a primeira é a instabilidade genômica que permite às células tumorais se dotar de mutabilidade, levando a progressão tumoral; e a segunda é a inflamação, onde células da imunidade inata e adaptativa contribuem para a progressão tumoral, fornecendo várias moléculas

bioativas para o microambiente tumoral como, fatores de crescimento e sobrevivência e modificando enzimas que facilitam a angiogênese, invasão e metástase (Fig. 6).



Figura 6. Características adquiridas pelas células tumorais. Adaptada de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

2.3 LEUCEMIA

As leucemias (todos os subtipos combinados) são neoplasias malignas hematológicas resultantes da proliferação anormal de células progenitoras hematopoiéticas da linhagem mieloide e linfóide, Frequentemente encontrada em pacientes com idade de 0 a 18 anos, representa 25-30% de todos os tumores nessa população, aparecendo quase sempre na sua forma aguda (REIS et al., 2011; REDAELLI et al., 2004) . No Brasil, para essa mesma faixa etária, o câncer é a segunda causa de morte e a leucemia é a forma mais comum com 29,9% de incidência (INCA, 2014).

A leucemia é classificada de acordo com a citologia, imuno-histoquímica e citogenética como leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA). A LLA representa 70-80% dos casos, e a LMA, cerca de 15% (MENDONÇA, 2003).

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo da LMA e corresponde a cerca de 20% a 25% das LMAs nos países latino-americanos. Em cerca de 90% dos casos a LPA esta associada à translocação entre os cromossomos 15 e 17 – $t(15;17)(q22;q21)$, que resulta na fusão dos genes *PML* (codifica a proteína da leucemia promielocítica) e *RAR α* (gene receptor alfa do ácido retinóico) identificada por Rowley e colaboradores, em 1977 (ROWLEY et al., 1977) (Fig. 7).

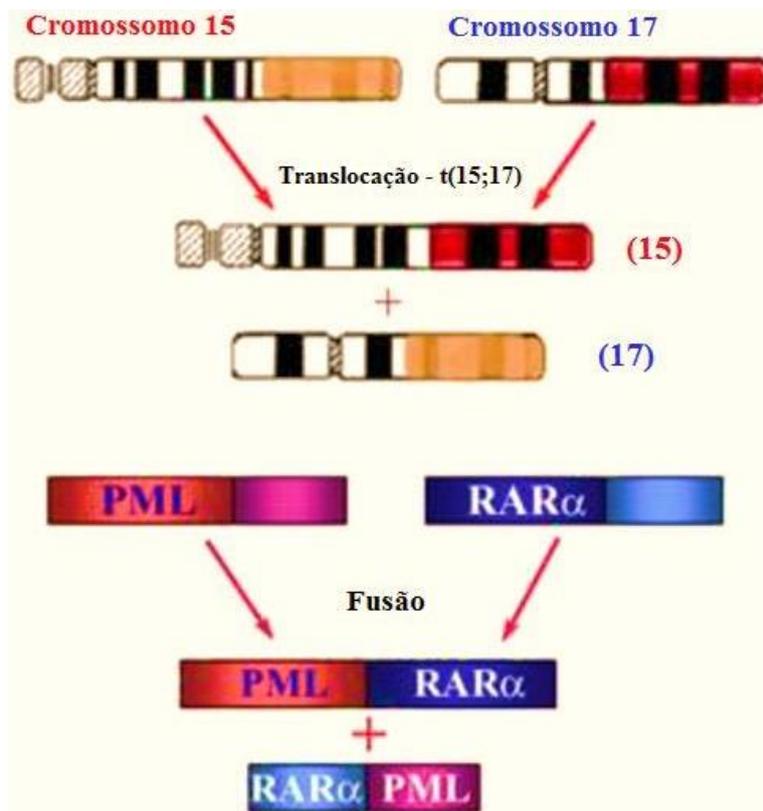


Figura 7. Representação da translocação entre os cromossomos 15 e 17 – $t(15;17)$ e consequente fusão dos genes *PML* e *RAR α* . Adaptada de: <http://hematologyinprogress.net/?p=1718>. Acesso em: 19 de Mar. de 2016.

A LPA apresenta características clínicas, morfológicas e biológicas que a distinguem dos demais subtipos dessa doença. Morfológicamente, apresenta promielócitos anormais, núcleo excêntrico, abundante granulação no citoplasma, presença de múltiplos bastonetes de Auer no citoplasma, interrupção da maturação mieloide e acúmulo de células leucêmicas semelhantes à mielócitos na medula óssea (BENNET et al., 1976). Do ponto de

vista clínico, difere das outras LMAs por estar associada à coagulopatia em cerca de 60% a 90% dos pacientes sendo responsável pelas altas taxas de morte durante as fases iniciais do tratamento (SANZ et al., 1999; HERNANDEZ et al., 2011; CANDONI et al., 2003). Na maioria dos casos, os pacientes apresentam sintomas relacionados à anemia, trombocitopenia, organomegalia e distúrbios da coagulação. Outras características menos frequentes são observadas em 15% a 20% dos pacientes. Infiltrações no sistema nervoso central e na pele são achados raros (MENÉNDEZ et al., 2000; MANDELLI, AVVISATI e COCO, 2002; SUN, 2002).

O tratamento de escolha para a LPA inclui a combinação do ácido transretinóico (ATRA) e quimioterápicos, que podem ser utilizados em conjunto com outras terapias. Os protocolos de quimioterapia duram mais de 18 meses (SANZ et al., 2004; LEUCEMIAS..., 2001). Melhorias nos resultados do tratamento foram observadas em crianças com essa neoplasia, contudo estudos ainda relatam a ocorrência de algumas complicações como leucemia secundária e complicações nos sistemas: musculoesquelético, pulmonar, urinário, gastrointestinal, cardíaco e nervoso (MACKENZIE, 2001).

As taxas de sobrevivência melhoraram notavelmente nas últimas décadas, em grande parte devido à quimioterapia convencional. No entanto, os efeitos secundários da quimioterapia permanecem significativos. Outras melhorias nos resultados dependerão de drogas anticâncer com alta eficácia e baixa toxicidade (SUN et al., 2013).

2.4 FORMAS DE TRATAMENTO DO CÂNCER

O tratamento contra o câncer tem como principais objetivos a cura e o prolongamento da sobrevida, bem como a melhoria da qualidade de vida do indivíduo. As principais formas de tratamento são: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Em muitos casos, é necessária a combinação de mais de uma modalidade para a obtenção de uma maior eficácia na eliminação e/ou diminuição do tumor (MURAD e KATZ, 1996; MACHADO, 2000).

O tratamento cirúrgico do câncer pode ser aplicado com finalidade curativa ou paliativa. É considerado curativo quando indicado nos casos iniciais

da maioria dos tumores sólidos. É um procedimento radical, que compreende a remoção do tumor primário. A cirurgia paliativa, por sua vez, tem a finalidade de reduzir a população de células tumorais ou de controlar sintomas que põem em risco a vida do paciente ou comprometem a qualidade da sua sobrevivência (BRASIL, 2015b).

A radioterapia é um método que emprega feixes de radiações ionizantes com o objetivo de destruir células tumorais. É um tratamento local e/ou regional, pode ser indicado de forma exclusiva ou associado aos outros métodos terapêuticos. Em combinação com a cirurgia, poderá ser pré-, per- ou pós-operatória. Também pode ser indicada antes, durante ou logo após a quimioterapia. A radioterapia pode ser radical (ou curativa), quando se busca a cura total do tumor; remissiva, quando o objetivo é apenas a redução tumoral; profilática, quando se trata a doença em fase subclínica, isto é, não há volume tumoral presente, mas possíveis células neoplásicas dispersas; paliativa, quando se busca a remissão de sintomas tais como dor intensa, sangramento e compressão de órgãos; e ablativa, quando se administra a radiação para suprimir a função de um órgão (BRASIL, 2015c).

A quimioterapia refere-se a qualquer tratamento que usa compostos químicos, chamados quimioterápicos, que afetam o funcionamento celular, com o objetivo de destruir as células cancerosas e bloquear o seu desenvolvimento (Fig.8). Entretanto, a maioria dos quimioterápicos atua de forma não específica, lesa tanto células malignas quanto células normais, porém eles acarretam maior dano às células malignas, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares (MURAD e KATZ, 1996; SALMONM e KATZUNG, 1998).

Dentre as formas de tratamento das neoplasias, a quimioterapia é a mais frequente, e até 70% dos tumores necessitarão de tratamento quimioterápico em algum momento do curso da doença, podendo ser utilizada de forma isolada ou em combinação com outras modalidades de terapias (BONASSA et al., 2012; DESANTIS et al., 2014).

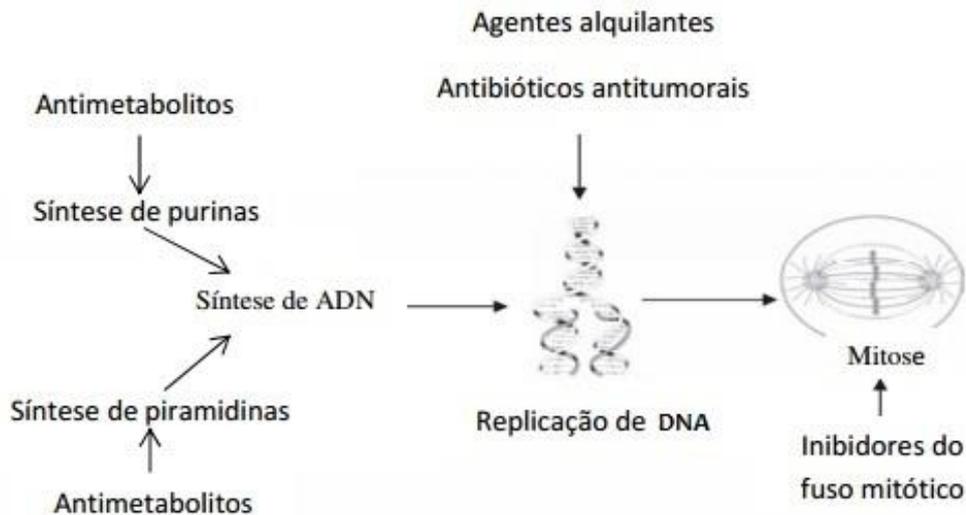


Figura 8. Alvos celulares da quimioterapia. Adaptada de ARGYLE et al., 2008.

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O uso de drogas isoladas (monoquimioterapia) mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia é de eficácia comprovada e tem como objetivos atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, utilizar a ação sinérgica das drogas, diminuir o desenvolvimento de resistência às drogas e promover maior resposta por dose administrada. A quimioterapia pode ser utilizada em combinação com a cirurgia e a radioterapia (BRASIL, 2015d). Segundo Brasil (2015d), a quimioterapia é classificada de acordo com suas finalidades em:

- Curativa - quando é usada com o objetivo de se conseguir o controle completo do tumor;
- Adjuvante - quando se segue à cirurgia curativa, tendo o objetivo de eliminar células residuais locais ou circulantes, diminuindo a incidência de metástases à distância;
- Neoadjuvante ou prévia - quando indicada para se obter a redução parcial do tumor, visando a permitir uma complementação terapêutica com a cirurgia e/ou radioterapia;

- Paliativa - não tem finalidade curativa. Usada com a finalidade de melhorar a qualidade da sobrevivência do paciente.

Os quimioterápicos atuam no ciclo celular (Fig. 9), interferindo nas diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução (MACHADO, 2000; OLIVEIRA e ALVES, 2002). A integridade do DNA é fundamental para a proliferação celular adequada. Por isso, altos níveis de danos ao DNA são detectados por proteínas envolvidas no *checkpoint* do ciclo celular, cuja ativação induz a parada do ciclo celular para evitar a transmissão de DNA danificado durante a divisão celular (CHEUNG-ONG et al., 2013). Lesões no DNA que ocorrem durante a fase S do ciclo celular durante a replicação estão entre as mais severas de todas. Se o DNA danificado não puder ser devidamente reparado, esse dano pode resultar na morte da célula (SPENCE e JONHSTON, 2001). As células cancerosas geralmente têm DNA desespiralizado, o que reduz a capacidade de sinalizar e reparar algum dano. Assim, elas podem ignorar os pontos de verificação do ciclo celular. Isso permite que as células alcancem altas taxas de proliferação, bem como predispõe a danos no DNA (CHEUNG-ONG et al., 2013). Assim, o objetivo das drogas anticâncer é atingir o DNA, o que inspirou o desenvolvimento de numerosos compostos, tais como a cisplatina, doxorubicina, 5-fluorouracil (BANDYOPADHYAY et al., 2010).

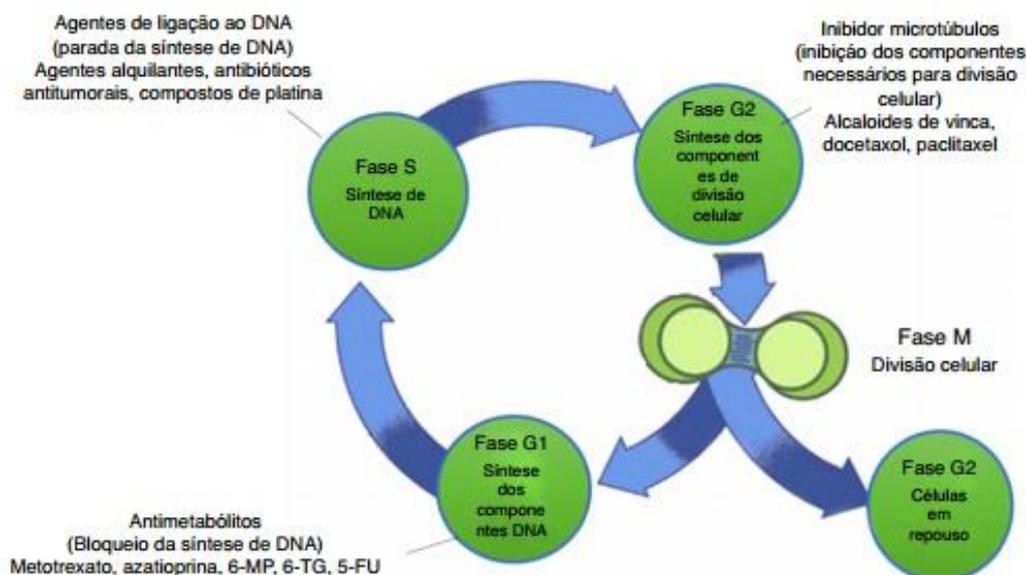


Figura 9. Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos em relação à fase do ciclo celular. Adaptada de KABLE, 2014.

Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga. A toxicidade é variável para os diversos tecidos e depende da droga utilizada. Nem todos os quimioterápicos ocasionam efeitos indesejáveis tais como mielodepressão, alopecia e alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia) (REIS, 2006).

Como visto acima, os fármacos antineoplásicos constituem um grupo heterogêneo de substâncias químicas capazes de inibir o crescimento e/ou os processos vitais das células tumorais com uma toxicidade tolerável sobre grande parte das células normais. Essas drogas podem ser classificadas em agentes alquilantes, antibióticos (antraciclinas), antimetabólitos, taxanos e agentes diversos (MALUF e ERDTMANN, 2000; CHUAI et al., 2012, BRASIL, 2015d).

Alquilantes

Os agentes alquilantes são os mais antigos e um dos grupos de fármacos mais utilizados no tratamento antitumoral. São compostos capazes de substituir, em uma molécula, um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Ligam-se covalentemente ao DNA de modo a impedir a desespiralização de sua dupla hélice, interferindo na replicação e/ou transcrição, processos essenciais para a divisão celular. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico. Dentre os agentes alquilantes, os quimioterápicos a base de platina são amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, como leucemia, linfomas, tumores de cabeça e pescoço, doença de Hodgkin (LOKICH e ANDERSON, 1998; SIDDIK, 2005; SCHMITT, FREZZA e DOU, 2013; BOWDEN, 2014; BRASIL, 2015d).

A ligação destes compostos de platina ao DNA é considerada o passo crítico para a sua atividade antitumoral, pois provoca a distorção na estrutura desta molécula, incluindo alterações nos processos de compactação da dupla hélice, que impede a replicação e a transcrição, resultando assim no aumento da morte celular (apoptose) e no bloqueio do ciclo celular na fase G2 (ALMEIDA et al., 2006; ANG, MYINT e LIPPARD, 2010). A principal via citotóxica desses compostos caracteriza-se pela formação de ligações

cruzadas intercadeias ou pontes intercadeias de DNA, entre duas guaninas adjacentes (GG) ou entre guanina e adenina (AG), tendo como efeito principal a inibição da replicação do DNA (FRANCESCO, RUGGIERO e RICCARDI, 2002, DEEPA, KOLANDAIVEL e SENTHILKUMAR, 2013). O risco de tumores secundários resultantes do tratamento com estes agentes aumenta possivelmente devido aos efeitos mutagênicos nas células normais (WU et al., 2011).

Apesar dos efeitos colaterais observados, os complexos de platina ainda são os fármacos de escolha no tratamento de aproximadamente 50 a 70% dos pacientes tratados com medicamentos antitumorais (HARPER et al., 2010). Atualmente, apenas quatro drogas de platina estão liberadas pelos órgãos de controle para uso clínico, dentre as quais podemos citar: a cisplatina, a carboplatina, a oxaliplatina ((JUNG e LIPPARD, 2007; WHEATE et al., 2010; ALI et al., 2013) (Fig. 10).

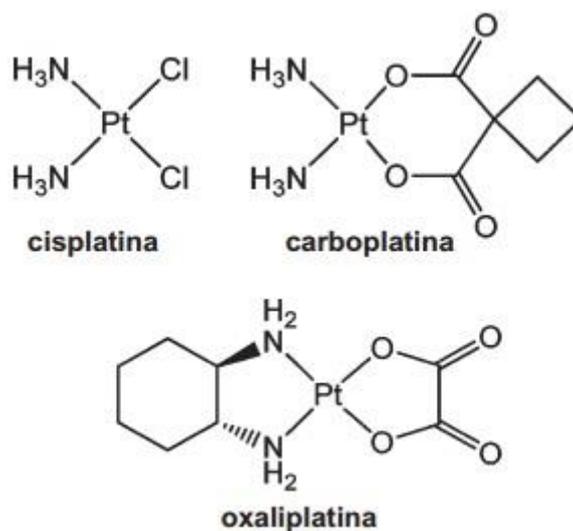


Figura 10. Estrutura química dos derivados de platina: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina. Adaptada de ANG, MYINT e LIPPARD, 2010.

Antibióticos

São um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA e inibam a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular.

Apesar de apresentarem tal variação, possuem em comum anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos. Uma das principais classes de antibióticos antitumorais são as antraciclinas, quimioterápicos mais bem estudados e utilizados no tratamento de muitas neoplasias malignas (TAKEMURA e FUJIWARA, 2007; BRASIL, 2015d).

Dentre as drogas mais usadas nesse grupo destaca-se a doxorubicina (Fig. 11), que foi isolada pela primeira vez em 1960, em ensaios clínicos a partir da bactéria *Streptomyces peucetis* var. *Caesius* e ainda é um agente fundamental na quimioterapia de primeira linha. É indicada no tratamento de vários tipos de câncer, tais como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma de células transicionais de bexiga urinária, carcinoma de mama, neuroblastoma, tumor de Wilms, carcinoma ovariano, carcinoma tireóideo, carcinoma prostático, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, sarcoma de Ewing (TAKEMURA e FUJIWARA, 2007; CHOW, DONG e DEVESA, 2010; Medline Plus, 2015).

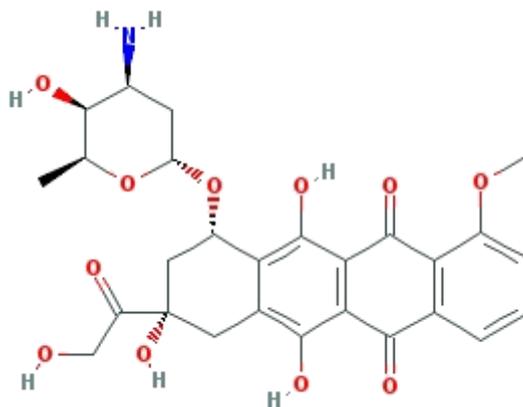


Figura 11. Estrutura química, em 2D, da doxorubicina. Adaptada de: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31703#section=Top>. Acesso em: 15 de Jan. de 2016.

Os mecanismos de ação da doxorubicina podem ocorrer através de: (1) intercalação na cadeia de DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; (2) formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

causando danos ao DNA ou peroxidação lipídica; (3) ligação e alquilação do DNA; (4) ligação cruzada do DNA; (5) interferência no DNA levando à separação das fitas duplas; (6) efeito direto na membrana; (7) lesões no DNA através da inibição da topoisomerase II; (8) indução da apoptose em resposta à inibição da topoisomerase II (TAKEMURA e FUJIWARA, 2007).

Antimetabólitos

Os antimetabólitos afetam as células inibindo bioquimicamente a síntese do DNA, por atuar na fase S do ciclo celular, impedindo, desta forma, a multiplicação celular. Esta inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas, à produção de ácido timidílico e a outras etapas da síntese de ácidos nucleicos (INCA, 2015). Os principais compostos desses grupos são os análogos de pirimidina (5-fluorouracil (5-FU), capecitabina, floxuridina e gencitabina) e de purina (6-mercaptopurina, 8-azaguanina, fludarabina e cladribina). O 5-fluorouracil é um antimetabólito vastamente utilizado no tratamento de tumores gastrointestinais e de cabeça e pescoço (Fig.12) (SÁ et al., 2009; CHEUNG-ONG K, GIAEVER G e NISLOW, 2013).

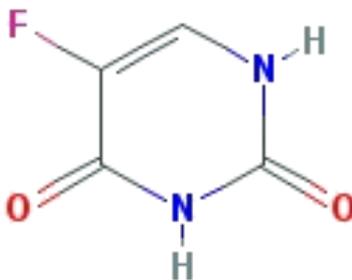


Figura 12. Estrutura química, em 2D, da 5-FU. Adaptada de: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Fluorouracil#section=Top>. Acesso em: 15 de Jan. de 2016.

Taxanos

Os taxanos são moléculas terpênicas, presentes em um conjunto de fármacos antineoplásicos, cuja principal ação consiste no bloqueio do crescimento celular. Esses quimioterápicos foram introduzidos na década de 1980 por exercer o seu efeito citotóxico através da ligação de forma reversível à subunidade β da tubulina, interrompendo, desta forma, a polimerização/despolimerização normal dos microtúbulos, o que conduz a uma parada do ciclo de divisão celular na fase G2-M (MANFREDI e HORWITZ, 1984; MINISINI et al., 2003; HEIDARY, NAIK e BURGIM, 2008; REDDY e BAZILE, 2014).

O paclitaxel (derivado da casca das plantas *taxus brevifolia* e *taxus bacatta*) foi a primeira droga da família, descoberto no ano de 1967, contudo devido à necessidade de uma grande quantidade de matéria prima, sua comercialização se tornou inviável. Diante disso, no início da década de 80 foi desenvolvido o docetaxel, um derivado semi-sintético do paclitaxel (Fig. 13). Tanto o paclitaxel como o docetaxel possuem o mesmo mecanismo de ação, ou seja, ambos promovem ligação estável com a tubulina e inibem a despolimerização dos microtúbulos. Seu mecanismo de ação independe da presença de quaisquer cofatores (BRUNO e SANDERIK, 1993; WALL e WANI, 1995; ROWINSKY, 1997; SOUZA, 2004).

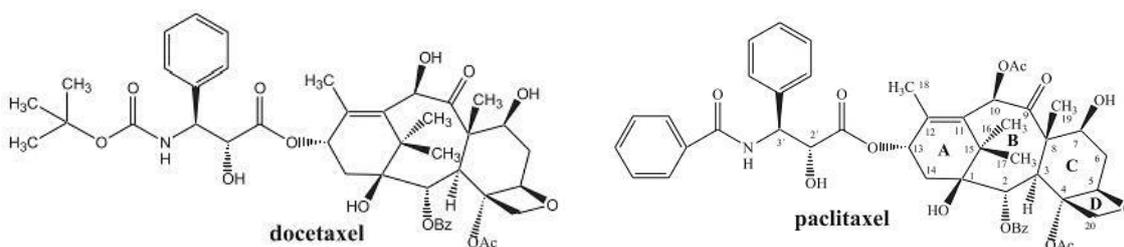


Figura 13. Estrutura química do docetaxel e paclitaxel. Adaptada de SOUZA, 2004.

Os taxanos rapidamente mostraram-se eficazes no tratamento do câncer e permanecem como escolha na abordagem do câncer de pulmão, para esquemas quimioterápicos de resgate e para tratamento de doença metastática ou localmente avançada (FOSSELLA, LEE e BERILLE, 1995). Ainda, estão

sendo amplamente utilizados como primeira escolha em diversos outros tipos de tumores malignos como mama, próstata, esôfago, estômago e em tumores de cabeça e pescoço (CORTES e PAZDUR, 1995; KAYE, 1995). Para o câncer de próstata, por exemplo, representam a única classe de quimioterápicos com reconhecida atividade e impacto na sobrevida global dos pacientes (FUJIMOTO et al., 2010; SERPA NETO et al., 2011; OSANTO e VAN POPPEL, 2012). A tabela 1 apresenta as principais classes de antineoplásicos com seus respectivos mecanismos de ação, bem como os principais tipos de cânceres sobre os quais atuam e os principais fármacos utilizados em cada grupo.

Tabela 1. Principais classes de antineoplásicos, seus respectivos mecanismos de ação, principais tipos de cânceres sobre os quais atuam e seus principais representantes.

Tipos de Antineoplásicos	Mecanismo de Ação	Tipos de Câncer Tratados	Principal (is) Representante (s)
Alquilantes	Ligam-se covalentemente ao DNA provocando distorções em sua estrutura, como alterações nos processos de compactação da dupla hélice, que impede a replicação e a transcrição, resultando assim no aumento de morte celular (apoptose) e no bloqueio do ciclo celular na fase G2.	Leucemias, linfomas, tumores de cabeça e pescoço, doença de Hodgkin.	Compostos de platina - cisplatina, carboplatina, oxaliplatina.
Antibióticos	Interagem com o DNA inibindo a síntese deste ácido ou de proteínas.	Leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma de mama, neuroblastoma, carcinomas ovariano, tireóideo e prostático, entre outros.	Doxorrubicina.
Antimetabólitos	Inibem bioquimicamente a síntese do DNA, por atuar na fase S do ciclo celular, impedindo a multiplicação celular.	Tumores gastrointestinais, cabeça e pescoço.	5-fluorouracil.
Taxanos	Bloqueia o crescimento celular através da ligação de forma reversível à subunidade β da tubulina, interrompendo, desta forma, a polimerização/despolimerização normal dos microtúbulos, o que conduz a uma parada do ciclo de divisão celular na fase G2-M.	Tumores de pulmão, mama, próstata, esôfago, estômago e cabeça e pescoço.	Paclitaxel.

Apesar de a quimioterapia ser o tratamento mais administrado no combate as neoplasias, seu sucesso é limitado, devido à resistência a droga

desenvolvida pelas células tumorais e aos efeitos colaterais, produzidos em virtude da citotoxicidade às células normais (KUMAR, KAUR e SILAKARI, 2014).

Os agentes quimioterápicos bloqueiam importantes processos metabólicos comuns ao tumor e aos tecidos saudáveis. São os tecidos do corpo com maiores índices de renovação, como a medula óssea, couro cabeludo, pele e mucosas, que acabam sendo mais afetados, de forma indesejada, pela medicação. Por isso, durante este tipo de tratamento, efeitos colaterais podem ocorrer, variando em frequência e intensidade para cada indivíduo (HAMERSCHLAK et al., 2006).

Os sintomas mais comuns são: anemia, fadiga, suscetibilidade a infecções (leucopenia), lesões orais (mucosite), náuseas e vômitos, diarreia e alopecia (queda de cabelo) (HAMERSCHLAK et al., 2006). Além disso, doses altas desses agentes podem causar lesões irreversíveis nos sistemas cardíaco (CURIGLIANO et al., 2010), renal (PABLA E DONG, 2008), nervoso (CAVALETTI E MARMIROLI, 2010) e reprodutivo (KIM, KLEMP e FABIAN, 2011).

Com as dificuldades encontradas na terapia antineoplásica tradicional, como a resistências às drogas utilizadas, alta toxicidade e efeitos adversos de elevado grau, recentes estudos têm sido impulsionados para o melhoramento e desenvolvimento de novas terapias antitumorais mais específicas e menos tóxicas (FILOMENI et al., 2007).

Essas pesquisas buscam moléculas que atuem em mecanismos específicos para cada tipo de enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares entre outros. Todos os mecanismos visam à interrupção do ciclo de células cancerosas, tendo como característica essencial o máximo de distinção entre estas e as células normais. (BRANDÃO et al., 2010).

Nesse sentido, torna-se importante a busca por novos compostos com atividade antineoplásica e mais seletivos às células tumorais (DANTAS et al., 2015), bem como, identificar alvos terapêuticos mais específicos para o

combate a essa doença. Dentre esses, o estresse oxidativo tem sido reconhecido como um alvo específico do tumor para o desenho de novos agentes anticâncer (CAIRNS, HARRIS e MAK, 2011).

2.5. COMPOSTOS DE SELÊNIO

O selênio (Se), elemento 34 da tabela periódica dos elementos químicos, foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius. É considerado um semimetal com massa atômica de $78,96 \text{ g mol}^{-1}$ e pontos de ebulição e fusão de $685 \text{ }^\circ\text{C}$ e $217 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Na natureza, o Se apresenta amplo estado de oxidação que varia de -2 até +6, proporcionando-lhe um complexo comportamento químico, o que permite sua combinação com 22 outros elementos (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ e CHARLET, 2009; BOYD, 2011).

Durante muito tempo o Se foi conhecido como um microelemento de elevada toxicidade e apenas em 1957 teve sua importância para o metabolismo celular reconhecida (McLAREN, 1999; BERTECHINI, 2006; MEHDI et al., 2013). Atualmente sabe-se que o Se desempenha um papel importante para o adequado funcionamento celular da maioria dos mamíferos, sendo considerado essencial para a manutenção da saúde humana (BOYD, 2011; RAYMAN, 2012).

O Se é um oligoelemento (elemento químico essencial para os seres vivos) encontrado no solo e em alguns itens da dieta humana como, carnes, peixes, vegetais, grãos e leite. As recomendações diárias para a ingestão de Se são relativamente fáceis de serem alcançadas através de uma dieta equilibrada e pode variar de acordo com a idade. Para adultos recomenda-se a ingestão de $55\text{-}60 \text{ } \mu\text{g}$ de Se/dia, essa recomendação mantém-se inalterada para os idosos e é menor para as crianças. Quantidades maiores do que $400 \text{ } \mu\text{g}$ de Se/dia não são indicadas devido à possibilidade de intoxicação, conforme tabela 2. Casos de intoxicação ao Se não são comuns, mas pode causar sintomas como alterações no cabelo e corpo, anormalidades nas unhas e pele, letargia e esclerose lateral amiotrófica (CLARK et al., 1996; IOM, 2000; JENSEN, WING e DELLAVALLE, 2010; STOCKLER-PINTO et al., 2010; RAYMAN, 2012; VICENTI et al., 2014a).

Tabela 2. Dose recomendada e limite máximo tolerado de Se de acordo com a idade.

Faixa etária	Recomendações de ingestão/dia (RDA, diária)	Limites de ingestão máxima tolerável/dia (UL, diário)
1 – 3 anos	20 µg	90 µg
4 – 8 anos	30 µg	150 µg
9 – 13 anos	40 µg	180 µg
14 – 18 anos	55 µg	400 µg
19 – 30 anos	55 µg	400 µg
31 – 50 anos	55 µg	400 µg
51 – 70 anos	55 µg	400 µg
>70 anos	55 µg	400 µg

Fonte: IOM (2000). RDA: *Recommended Dietary Allowance*; UL: *Tolerable Upper Intake Level*.

Segundo Fairweather-Tait *et al.* (2011), o metabolismo do Se ainda é pouco conhecido, todavia as rotas e mecanismos básicos de absorção e metabolismo do mineral já estão descritos. O mineral encontra-se distribuído de forma desigual no corpo humano, os tecidos com maiores quantidades de Se são os provenientes da glândula tireoide, rim, gônada, músculo, glândula adrenal e fígado (DICKSON e TOMLINSON, 1967). A absorção ocorre principalmente no duodeno e no ceco e, em humanos, a excreção acontece basicamente através da urina (MEHDI *et al.*, 2013).

Já é bem estabelecido na literatura que o Se é um cofator essencial de várias enzimas, entre elas as deiodinases, tiroxina redutases e glutathione peroxidases (enzimas responsáveis pela conversão de H₂O₂ em H₂O), atua, também, na ativação de outros antioxidantes de baixo peso molecular como, a coenzima Q10 e as vitaminas C e E, importantes para manter a homeostase do organismo. (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2008; RAYMAN, 2012; MEHDI *et al.*, 2013; WEEKLEY, *et al.*, 2013; FERNANDES e GANDIN, 2014).

O Se desempenha um papel fundamental no equilíbrio do estado redox da célula e na remoção de EROs, o que contribui para seu efeito anti-inflamatório. Seu poder antioxidante é possivelmente mediado pelas enzimas glutathione peroxidases (GPx) e sua ação ocorre no espaço extracelular e no citosol, em associação com membranas celulares e especificamente no trato gastrointestinal (FIELD, JOHNSON, SCHLEY, 2002; ARTHUR, MCKENZIE, BECKETT, 2003). Além de sua relevante função antioxidante, os compostos de selênio estão envolvidos em importantes processos em quase todos os

tecidos e tipos celulares, inclusive naqueles envolvidos nas respostas imunológicas inatas e adaptativas, na síntese dos hormônios tireoidianos T3 e T4 e na prevenção de doenças crônicas (MAGGINI, et al., 2007; HOFFMANN e BERRY, 2008). Vários outros benéficos têm sido atribuído ao selênio, incluindo a prevenção de desordens metabólicas, remoção de vírus, resistência bacteriana e a infecções parasitárias, bem como destruição de células neoplásicas, atuando, desta forma, na prevenção do câncer (PETRIE, KLASSEN, KAY, 1989; ARTHUR, MCKENZIE, BECKETT, 2003; SHRIMALI, et al., 2008).

A associação entre selênio e câncer tem sido estudada há mais de 25 anos e as evidências disponíveis confirmam que o selênio (testado isoladamente ou em conjunto com outros agentes antioxidantes) tem efeitos antitumorais, prevenindo angiogênese e metástase em câncer de mama, próstata, colorretal, melanoma, fígado, pulmão, entre outros (CHEN, PRABHU e MASTRO, 2013; VINCETI et al., 2014). Compostos que contêm selênio no seu nível de oxidação +4 (selenito, selol, entre outros) possuem elevada atividade como um sequestrador de radicais livres e, conseqüentemente, como um agente antitumoral (Fig. 14) (RAHDEN-STARON, SUCHOCKI e CZECHOT, 2010; SUCHOCKI et al., 2007).

Estudos realizados por Suchocki e colaboradores (2007) mostraram que o selol, composto orgânico sintetizado a partir de selenitotriglicerídeos, os quais possuem selênio tetravalente (+4) em sua estrutura, tornou sensíveis células leucêmicas resistentes a quimioterápicos, indicando que esse composto poderia ser utilizado como agente quimiosensibilizador no tratamento do câncer. Estevanato *et al.*, (2012) comprovaram que células de adenocarcinoma mamário, quando tratadas com nanopartículas magnéticas contendo selol, na ausência e presença de campo magnético alternado, foram mais afetadas do que células de mama normal.

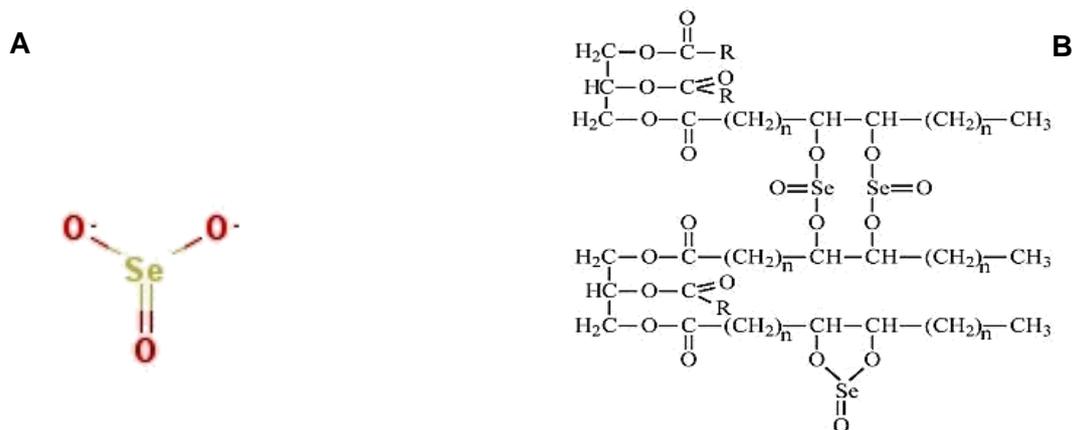


Figura 14. A) Estrutura, química, em 2D, do selenito. Adaptada de: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/273878731#section=2D-Structure>. Acesso em: 15 de Jan. de 2016. B) Estrutura química do selol. Adaptada de SUCHOCKI et al., 2007.

Estudos *in vitro* mostraram que o selênio causa apoptose de uma maneira dose dependente nas linhagens celulares de melanoma humano A375 e SK-MEL-28 (CHEN et al., 2008; JARIWALLA, GANGAPURKAR, NAKAMURA, 2009). Outro importante estudo demonstrou diminuição significativa de metástases pulmonares em camundongos portando melanoma quando estes foram submetidos ao tratamento com selênio (SONG et al., 2009).

Ainda não se sabe o exato mecanismo de ação do selênio, mas tem sido proposto que ele exerce sua ação antitumorigênica por meio da inibição do crescimento celular pela regulação da p53, danos no DNA e apoptose, sendo este último o mecanismo mais aceito na literatura (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; GROMADZINSKA et al., 2008).

O selênio tem sido relatado em vários estudos como um possível fator protetor para diferentes tipos de câncer. O composto aumentaria a resistência das células não carcinogênicas ao estresse. Ele atuaria como um pró-oxidante nas células neoplásicas, tornando-as mais sensíveis à toxicidade de selênio do que as células normais, diminuindo o seu crescimento e atividade. Assim, pode haver uma janela terapêutica farmacológica para a utilização de compostos derivados do selênio no tratamento do câncer (RAYMAN, 2012; WEEKLEY e HARRIS, 2013).

Diante do crescimento no número de novos casos de câncer em todo o mundo, inclusive no Brasil e da necessidade mundial por novos e mais específicos fármacos que previnam e combatam a progressão de tumores, os compostos de selênio se tornam uma importante opção de prevenção e tratamento contra o câncer.

2.6 CULTIVO *IN VITRO* E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O cultivo de células consiste nos processos de isolamento e manutenção da viabilidade e da proliferação das células provenientes de um determinado tecido (animal ou vegetal) em um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições ideais de temperatura, pH e osmolaridade (AMARAL e MACHADO-SANTELLI, 2011).

A primeira tentativa de cultivar tecidos ocorreu no século XIX, há mais de 100 anos (BACELAR e SOUSA, 2004; CURI e PERES, 2005). Ao longo dos anos, a biotecnologia para a produção de tecidos, bem como para o cultivo celular *in vitro* apresentou um notável crescimento (COSTA, MIGUEL, ROSA, 2010). Atualmente a técnica de cultivo celular *in vitro* é aplicada para uma grande variedade de finalidades, dentre as quais podemos citar: produção de imunobiológicos e vacinas para uso humano, desenvolvimento de novos farmacoterápicos, análises de citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas, caracterização de modelos biológicos importantes, testes farmacêuticos, entre outros (TAKATA et al., 1994; UNCHERN, 1999; YOKOMIZO, 2001; MORAIS, AUGUSTO, CASTILHO, 2008; CALDAS, 2010; BRETAS, 2011; LANDRY et al., 2013).

Contudo, esse grande avanço só foi possível com o estabelecimento de linhagens celulares. Linhagem celular é uma população de células específicas originadas pelo subcultivo sequencial de uma população celular primária com característica uniforme e estocada em depósito apropriado, sob condições definidas de armazenamento (BRETAS, 2011). Para que o cultivo se desenvolva satisfatoriamente, o meio na qual a célula se encontra deve fornecer todos os nutrientes, vitaminas, íons inorgânicos, matérias-primas necessárias à síntese de novas células e um ambiente parecido àquele que elas dispunham *in vivo* (TAVEIRA, 2007).

A linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (HL-60) é um bom exemplo de linhagem celular amplamente utilizada como um sistema experimental para o estudo *in vitro* de possíveis drogas que poderão ser utilizadas no tratamento e prevenção de diferentes tipos de leucemias (COLLINS, GALLO, GALLAGHER, 1977; GALLAGHER, 1979; SOKOLOSKI e SORTORELLI, 1997; UZUNOGLU et al., 1999). Essa linhagem é derivada a partir do sangue periférico de uma paciente com leucemia promielocítica aguda, prolifera continuamente em suspensão e consiste predominantemente de promielócitos (NEWBURGER, et al., 1979; BREITMAN, 1990)

O desenvolvimento da técnica de cultivo celular *in vitro* aliada ao estabelecimento de linhagens celulares tornou-se essencial para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos na formação de neoplasias, bem como na realização de testes com fármacos, objetivando estabelecer doses ou mesmo, a descoberta de novas substâncias (CALDAS, 2010; ELLIOTT et al., 2011; BARBOSA et al., 2015). As duas etapas envolvidas no processo de desenvolvimento de fármacos baseiam-se, resumidamente, no estudo de compostos para o tratamento de doenças. A primeira etapa, também chamada de estudos pré-clínicos, tem como objetivo principal a avaliação farmacológica em sistemas *in vitro* e em *in vivo* para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades e dos efeitos adversos do fármaco em desenvolvimento. A segunda etapa, ou estudos clínicos, corresponde à pesquisa conduzida em pacientes, ou em voluntários sadios, geralmente, destinada a avaliar um novo tratamento (LOMBARDINO e LOWE, 2004; FERREIRA et al., 2009; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010; LIMA et al., 2003).

Os modelos de estudo *in vitro* são largamente utilizados em diversos experimentos, pois podem ser controlados, diminuindo a possibilidade de erro, além de serem, geralmente, menos dispendiosos. Outras vantagens apontam pela rapidez na busca de resultados, comparativamente aos modelos animais, além de permitir o estudo de um número maior de combinações, com diferentes parâmetros (NEWSAM et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral, *in vitro*, de composto derivado do selênio em células tumorais humanas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade citotóxica do composto orgânico de selênio na linhagem celular de câncer de leucemia (HL-60), além de linfócitos, monócitos e neutrófilos;
- Avaliar a ação do composto na integridade da membrana e potencial de membrana mitocondrial na linhagem HL-60;
- Estabelecer o tipo de morte celular (apoptose ou necrose) associado ao composto orgânico de selênio sobre células cancerígenas;
- Avaliar a ativação das caspases efetoras 3 e 7 em células tumorais (HL-60).

4. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324-1337, 2007.

ALARCÓN, T.; BYRNE, H. M.; MAINI, P. K. A cellular automaton model for tumour growth in an inhomogeneous environment. **J. Theor. Biol.**, v. 225, p. 257—274, 2003.

ALBERTS, W. N. et al. Lung cancer guidelines. **Chest Journal**, v. 123, (Suplement), 2003.

ALI, I. et al. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. **Anti-Cancer Agents Med. Chem**, v. 13, n. 2, p. 296-306, 2013.

ALLSOPP, R. C. et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, n. 21, p. 10114–10118, 1992.

ALMEIDA, G. M. et al. Detection of oxaliplatin-induced DNA crosslinks in vitro and in cancer patients using the alkaline comet assay. **DNA Repair**, v. 5, n. 2, p. 219-225, 2006.

AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v. 34, p.1-20, 2011.

ANG, W. H.; MYINT, M.; LIPPARD, S. J. Transcription inhibition by platinum-DNA cross-links in live mammalian cells. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, n. 21, p. 7429-7435, 2010.

ARGYLE, D. J.; BREARLEY, M. J.; TUREK, M. M. Introduction: cancer biology and terminology. decision making in small animal. **Oncology**, Blackwell Publishing: 3-17, 2008.

ARTHUR, J. R.; MCKENZIE, R. C.; BECKETT, G. J. Selenium in the immune system. **J Nutr**, v. 133, p. 1457S-1459S, 2003.

AYLON, Y.; OREN, M. New plays in the p53 theater. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 21, n. 1, p. 86-92, 2011.

BACELLAR, F.; DE SOUSA, R. A importância do isolamento por cultivo celular e identificação de rickettsias através de técnicas de biologia molecular para o conhecimento das rickettsioses. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v. 13, n. suplemento 1, p. 190, 2004.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1385–1389, 2010.

BARBOSA, B. S. et al. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma revisão. **Rev. Bras. Hig. Sanid. Anim**, v. 2, n.2, p. 334-347, 2015.

BENNET, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemia. French-American-British (FAB) Cooperative Group. **Br. J. Haematol**, v. 33, p. 451-458, 1976.

BERTECHINI, A. G. Nutrição do monogástrico. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2006.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332–337, 2004.

BIENNIAL REPORT 2012 – International Agency for Research on Cancer (IARC). 2013, Lyon, France, 2013. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/breport/breport1213/index.php>>; Acesso em 20 de Dez. de 2015.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO, F. G. Bogliolo Patologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BONASSA, E. M. A. et al. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

BOYD, R. Selenium stories. **Nat. Chem**, v. 3, n. 7, p. 570, 2011.

BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? **Cancer Lett**, v. 346, n. 2, p. 163-171, 2014.

BRANDÃO H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa/2014 Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa/2016 Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Tratamento cirúrgico. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=98>; Acesso em: 26 de Dez de 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Radioterapia. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=100>; Acesso em: 26 de Dez de 2015c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Quimioterapia. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=98>; Acesso em: 26 de Dez de 2015d.

BREITMAN, T. R. Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL-60. **Methods in Enzymology**, v. 190, p. 118-130, 1990.

BRETAS, R. M. **Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais**, 2011, 170p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. RJ, 2011.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Selenium Compounds and Selenoproteins in Cancer. **Chem. Biodiversity**, v. 5, n. 3, p. 389-395, 2008.

BRUNO, R.; SANDERIK, G. J. Pharmacokinetics and metabolism of taxotere (docetaxel). **Cancer Surv**, v. 17, p. 305–313, 1993.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p. 671-682, 2008.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, 2011.

CALDAS, C. Vida, morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa. **Cienc. Cult**, [online], São Paulo, v. 62, n. 2, p. 17-18, 2010.

CANDONI, A. et al. Clinical characteristics, prognostic factors and multidrug-resistance related protein expression in 36 adult patients with acute promyelocytic leukemia. **Eur. J. Haematol**, v. 71, n. 1, p. 1-8, 2003.

CAVALETTI, G.; MARMIROLI, P. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. **Nat. Rev. Neurol**, v. 6, p. 657-666, 2010.

CHEN, T. et al. Selenium nanoparticles fabricated in Undaria pinnatifida polysaccharide solutions induce mitochondriamediated apoptosis in A375 human melanoma cells. **Colloids. Surf**, v. 67, n. 1, p. 26-31, 2008.

CHEN, Y. C.; PRABHU, K. S.; MASTRO, A. M. "Is selenium a potential treatment for cancer metastasis?". **Nutrients**, v. 5, n. 4, 2013.

CHENG, N. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res**, v. 6, n. 10, p. 1521–1533, 2008.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. **Chem. Biol**, v. 20, n. 5, p. 648-659, 2013.

CHOW, W. H.; DONG, L. M.; DEVESA, S. S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat. Rev. Urol**, v. 7, n. 5, p. 245–257, 2010.

CHUAI, Y.; XU, X.; WANG, A. Preservation of fertility in females treated for cancer. **Int. J. Biol. Science**, v. 8, n. 7, p. 1005–1012, 2012.

CLARK, L. C. et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. **JAMA**, v. 276, p. 1957–1963, 1996.

COLLINS, S. J.; GALLO, R. C.; GALLAGHER, R. E. **Nature (London)**, v. 270, p. 347-349, 1977

CORTES, J. E.; PAZDUR, R. Docetaxel. **J. Clin. Oncol**, v. 13, n. 10, p. 2643–2655, 1995.

COSTA, R. C. C.; MIGUEL, F. B.; ROSA, F. P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **Rev. Cienc. Med. Biol, Salvador**, v. 4, n. 1, p. 70-76, 2010.

CURI, R.; PERES, C. M. **Como cultivar células**. 1th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v.1. 283p.

CURIGLIANO, G. et al. Cardiac toxicity from systemic cancer therapy: A comprehensive review. **Prog. Cardiovasc. Dis**, v. 53, n. 2, p. 94-104, 2010.

DANTAS, B. B. et al. Effects of curine in HL-60 leukemic cells: cell cycle arrest and apoptosis induction. **J. Nat. Med**, v. 69, n. 2, p. 218-223, 2015.

DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 6, p. 607-615, 2012.

DEEPA, P.; KOLANDAIVEL, P.; SENTHILKUMAR, K. Structural properties and the effect of platinum drugs with DNA base pairs. **Struct. Chem**, v. 24, n. 2, p. 583-595, 2013.

DENTON, D.; NICOLSON, S.; KUMAR, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 87–95, 2012.

DESANTIS, C. E. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, **Cancer J. Clin**, v. 64, n. 4, p. 252-271, 2014.

DICKSON, R. C.; TOMLINSON, R. H. Selenium in blood and human tissues. **Clin. Chim. Acta**, v. 16, p. 311-321, 1967.

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A. Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. **J. Pharm. Sci**, v.100, n.1, p.59-74, 2011.

ERIKSEN, M.; MACKAY, J.; ROSS, H. **The Tobacco Atlas**. 4th ed. Atlanta, USA: American Cancer Society, 2012.

ESTEVANATO, L. L. et al. Co-nanoencapsulation of magnetic nanoparticles and selol for breast tumor treatment: in vitro evaluation of cytotoxicity and magnetohyperthermia efficacy. **Int. J. Nanomed.**, v. 7, p. 5287-99, 2012.

FAGAGNA, F. A. et al. A DNA damage checkpoint response in telomere initiated senescence. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 194–198, 2003.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in human health and disease. **Antioxid. Redox Signaling**, v. 14, n. 7, p. 1337-1383, 2011.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN v1.0, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 02 de Fev. de 2016, 2012.

FERNANDES, A.; GANDIN V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1850, n. 8, p. 1642-60, 2014.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, A.; CHARLET, L. Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view. **Environmental Science and Biotechnology, Ashford**, v. 8, n. 1, p. 81-110, 2009.

FERREIRA, F. G. et al. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia.Goiás**, v.6, n.1, p.14-24, 2009.

FIELD, C. J.; JOHNSON, I. R.; SCHLEY, P. D. Nutrients and their role in host resistance to infection. **J. Leukoc. Biol**, v. 71, n. 1, p. 16-32, 2002.

FILOMENI, G. et al. Pro-apoptotic Activity of Novel Isatin-Schiff Base Copper(II) Complexes Depends on Oxidative Stress Induction and Organelle-selective Damage. **J. Biol. Chem**, v. 282, p. 12010-12021, 2007.

FOSELLA, F. V.; LEE, J. S.; BERILLE, J. Summary of phase 2 data of docetaxel (taxotere), an active in the first- and second-line treatment of non-small-cell lung cancer. **Semin. Oncol**, v. 22 (2 suppl 4), p. 22–29, 1995.

FRANCESCO, A. M. D. I.; RUGGIERO, A.; RICCARDI, R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 59, n. 11, p. 1914-1927, 2002.

FUJIMOTO, N. et al. Novel therapeutic strategies following docetaxel-based chemotherapy in castration-resistant prostate cancer. **Expert. Rev. Clin. Pharmacol**, v. 3, n. 6, p. 785–795, 2010.

GALLAGHER, R. et al. **Blood**, v. 54, p. 713-733, 1979

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell**, v. 135, p. 1161–1163, 2008.

GOCHEVA, V. et al. Il-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. **Genes Dev**, v. 24, n. 3, p. 241–255, 2010.

GORDON, G. M; DU, W. Conserved RB functions in development and tumor suppression. **Protein. Cell**, v. 2, n. 11, p. 864-878, 2011.

GOULART, F. A. A. **Doenças crônicas não transmissíveis: estratégias de controle e desafios e para os sistemas de saúde**. Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://apsredes.org/site2012/wp-content/uploads/2012/06/Condicoes-Cronicas_flavio1.pdf>; Acesso em: 02 de Fev. de 2016, 2011.

GREEN, D. R. Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 1–4, 2000.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GROMADZINSKA, J. et al. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. **Eur. J. Nutr**, v. 47, n. 2, p. 29-50, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados, São Paulo**, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

HAMERSCHLAK, N. et al. Retrospective study of stem cell transplantation for acute myeloid leukemia (AML): the Brazilian experience. **Rev. bras. hematol. Hemoter**, v. 28, p. 11-18, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARPER, B. W. et al. Advances in platinum chemotherapeutics. **Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 7064-7077, 2010.

HEIDARY, N.; NAIK, H.; BURGIN, S. Chemotherapeutic agents and the skin: An update. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 58; n. 4, p. 545-570, 2008.

HEIDI, H. et al. **Princípios de Farmacologia Antimicrobiana e Antineoplásica**. In: Koogan, G. (Ed.). David E. Golan - Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia, p.529-537, 2009.

HERNANDEZ, J. M. et al. Additional cytogenetic changes do not influence the outcome of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with an ATRA plus anthracyclin based protocol. A report of the Spanish group PETHEMA. **Haematologica**, v. 86, n. 8, p. 807-813, 2001.

HOFFMANN P. R.; BERRY M. J. The influence of selenium on immune responses. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 52, n. 11, p. 1273-1280, 2008.

Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva”. Diagnóstico precoce do câncer na criança e no adolescente (2a ed., rev. ampl., 3a reimp.). Rio de Janeiro: Inca, 2014.

International Agency for Research on Cancer (IACR). Global battle against cancer won't be won with treatment alone Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis. World Health Organization, 2014.

International Agency for Research on Cancer (IACR). World Cancer Report, 2014, edited by Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild. Lyon, France, 2014.

IOM – Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Food and nutrition board. Whashington, DC: National Academies Press; 2000.

JARIWALLA, R. J.; GANGAPURKAR, B.; NAKAMURA, D. Differential sensitivity of various human tumour-derived cell types to apoptosis by organic derivatives of selenium. **Br. J. Nutr**, v. 101, n. 2, p. 182-9, 2009.

JENSEN, J. D.; WING, G. J.; DELLAVALLE, R. P. Nutrition and melanoma prevention. **Clin. Dermatol**, v. 28; n. 6, p. 644-649, 2010.

JIANG, B. H.; LIU, L. Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Adv. Cancer Res**, v. 102, p. 19–65, 2009.

JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. Autophagy and human diseases. **Cell Res**, v. 24, n. 1, p. 69-79, 2014.

JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chem. Rev**, v. 107, n. 5, p. 1387-1407, 2007.

JUNTTILA, M. R.; EVAN, G. I. p53—a Jack of all trades but master of none. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 11, p. 821–829, 2009.

KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, p. 333–339, 2013.

KAYE, S. B. Docetaxel in the treatment of solid tumors others than breast and lung cancer. **Semin. Oncol**, v. 2, n. 2, p. 30–33, 1995.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–237, 2011.

KIM S. S.; KLEMP, J.; FABIAN, C. Breast cancer and fertility preservation. **Fertil. Steril**, v. 95, n. 5, p. 1535-1543, 2011.

KNUDSEN, E. S.; KNUDSEN, K. E. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 9, p. 714-724, 2008.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472-482, 2008.

KUMAR, R.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Physiological modulation approaches to improve cancer chemotherapy: A review. **Adv. Anticancer Agents Med. Chem**, v. 14, n. 5, p. 713-749, 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Bases patológicas das Doenças**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. (2010). **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Elsevier Editora Ltda, 2010.

LANDRY, J. M. et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. G3. **Genes [Genomes] Genetics, Heidelberg**, v. 3, n. 8, p. 1213-1224, 2013.

LEROY, B. et al. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. **Nucleic. Acids Res**, v. 41 (Database issue), p. 962-969, 2013.

LEUCEMIAS agudas na infância e adolescência. **Rev. Bras. Cancerol**, v. 47, p. 245-257, 2001.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, p. 27-42, 2008.

LI, P. et al. 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.

LIMA, J. S. et al. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 225-233, 2003.

LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 147–157, 1996.

LOKICH, J.; ANDERSON, N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. **Ann. Oncol**, v. 9, n. 1, p. 13-21, 1998.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug Discovery – then and now. **Nat. Rev. Drug Discovery London**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression, **Nature**, v. 432, p. 307-315, 2004.

LU, Z. et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. **J. Clin. Invest**, v. 118, p. 3917–3929, 2008.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136: 823–837. **Nature**, v. 432, p. 307–315, 2009.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

MACKENZIE, J. R. Complications of treatment of paediatric malignancies. **Eur. J. Radiol**, v. 37, p. 109-19, 2001.

MAGGINI, S. et al. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. **Br. J. Nutr**, v. 98, n. 1, p. 29-35, 2007.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutat. Res**, v. 471, n.1-2, p. 21-27, 2000.

MANDELLI, F, AVVISATI, G, LO COCO, F. Advances in the understating and management of acute promyelocytic leukemia. **Rev. Exp. Hematol**, v. 6, p. 60-71, 2002.

MANFREDI, J. J.; HORWITZ, S. B. Taxol: an antimitotic agent with a unique mechanism of action. **Pharmacol. Ther**, v. 25, p. 83–125, 1984.

MARYAS, J. et al. Proteomics in investigation of cancer metastasis: Functional and clinical consequences and methodological challenges. **Proteomics**, v. 14. P. 426-440, 2014.

McLAREN, D. S. Just 40 years ago. *Nutrition*, 15(3): 254, 256, 1999. Comentário sobre: SCHWARZ, K e FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of fator 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. **Nutrition** (reimpressão), v. 15, n. 3, p. 255, 1999.

Medline Plus. <www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682221.html> Acesso em: 26 de Dez. de 2015.

MEHDI, Y. et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3292-3311, 2013.

MENDONÇA, N. Childhood acute myeloid leukemia: how are we doing in Brazil? **J. Pediatr**, v. 79, p. 476-7, 2003.

MENÉNDEZ, A. et al. Clinical spectrum of extramedullary acute promyelocytic leukemia. **Eur. J. Haematol**, v. 64, p. 201-203, 2000.

MINISINI, A. et al. Taxane-induced nail changes: incidence, clinical presentation and outcome. **Ann. Oncol**, v. 14, n. 2, p. 333-337, 2003.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes Dev**, v. 21, n. 22, p. 2861–2873, 2007.

MORAIS, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2008.

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 304-317, 2014.

MURAD, A. M.; KATZ, A. **Oncologia. Bases clínicas do tratamento**. Guanabara: Rio de Janeiro, p. 41, 1996.

MURPHY, S. L.; XU, J.; KOCHANNEK, K. D. Deaths: final data for 2010. **Natl. Vital. Stat. Rep.**, v. 61, n. 4, 2013.

NEWBURGER, P. E. et al. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. **J. Cell Biol.**, v. 82, p. 315-322, 1979.

NEWSAM, J. M. et al. Screening soft materials for their effect on skin barrier function by high throughput experimentation. **J. Mater. Chem.**, v. 15, n. 30, p. 3061–3068, 2005.

OLIVEIRA, A. P. et al. Chemical carcinogenesis. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 593-616, 2007.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6, p. 976–984, 2002.

OSANTO, S.; VAN POPPEL, H. Emerging novel therapies for advanced prostate cancer. **Ther. Adv. Urol.**, v. 4, n. 1, p. 3–12, 2012.

OW, Y. P. et al. Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 532–542, 2008.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney International**, v. 73, p. 994–1007, 2008.

PELENGARIS, S.; KHAN, M. **The molecular biology of cancer: A bridge from bench to bedside**. 2ª edição, 2013.

PETRIE, H. T.; KLASSEN, L. W.; KAY, H. D. Selenium and the immune response: Modulation of alloreactive human lymphocyte functions in vitro. **J. Leukoc. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 207-214, 1989.

PRAKASH, S. et al. Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. **Adv. Drug Delivery**, v. 63, p. 1340-1351, 2011.

RAHDEN-STARON, I.; SUCHOCKI, P.; CZECZOT, H. Evaluation of mutagenic activity of the organo-selenium compound Selol by use of the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. **Mutat. Res**, v. 699; n. 1-2, p. 44-46, 2010.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet**, v. 379, p. 1256–1268, 2012.

REDAELLI, A. et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. **Expert Rev. Anticancer Ther**, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2004.

REDDY, L; BAZILE, D. Drug delivery design for intravenous route with integrated physicochemistry, pharmacokinetics and pharmacodynamics: Illustration with the case of taxane therapeutics. **Adv. Drug Delivery Rev**, v. 71, p. 34-57, 2014.

REIS, M. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 39; n. 4, p. 577-586, 2006.

REIS, R. S. et al. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 56, p. 58-64, 2011.

ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The multiple roles of autophagy in cancer. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 7, p. 955-963, 2011.

ROWINSKY, E. K. The taxanes: dosing and scheduling. **Oncology**, v. 11, n. 3 Suppl 2, p. 7–19, 1997.

ROWLEY, J. D. et al. Further evidence for a non-random chromosomal abnormality in acute promyelocytic leukemia. **Int. J. Cancer**, v. 20, p. 869-872, 1977.

RUBINSZTEIN, D. C. et al. Potential therapeutic applications of autophagy. Nature reviews. **Drug discovery**, v. 6, n. 4, p. 304-312, 2007.

SÁ, M. P. et al. Cardiotoxicidade e Quimioterapia. **Rev. Bras. Clin. Med**, v. 7, p. 326-330, 2009.

SALMÓN, S. E.; KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica clínica**. 6ª. ed., Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655, 1998.

SANZ, M. A. et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia. PETHEMA group. **Blood**, v. 94, n. 9, p. 3015-21, 1999.

SANZ, M. A. et al. Riskadapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. **Blood**, v. 103, n. 4, p.1237-43, 2004.

SCHMITT, S. M.; FREZZA, M.; DOU, Q. P. New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. **Front. Biosci**, v. 4, p. 375-391, 2013.

SERPA NETO, A. et al. Ten years of docetaxel-based therapies in prostate adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis of 2244 patients in 12 randomized clinical trials. **Clin. Genitourin. Cancer**, v. 9, n. 2, p. 115–123, 2011.

SHRIMALI, R. K. et al. Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. **J. Biol. Chem**, v. 283, n. 29, p. 20181-20185, 2008.

SIDDIK, Z. H. **Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: Dnainteractive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs**. In: Alison MR, editor. *The cancer handbook*. Houston: John Wiley & Sons; 2005.

SOKOLOSKI, J. A.; SORTORELLI, A. C. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D3. **Leuk. Res**, v. 22, p. 153-161, 1997.

SONG, H. et al. Selenium Inhibits Metastasis of Murine Melanoma Cells through the Induction of Cell Cycle Arrest and Cell Death. **Immune Netw**, v. 9, n. 6, p. 236-42, 2009.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quim Nova**, v. 27, n. 2, p. 308–312, 2004.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. **Oncology**. Oxford University Press, Oxford, 2001.

STOCKLER-PINTO M, B. et al. Effect of Brasil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, n. 11-12, p. 1065-1069, 2010.

SUCHOCKI, P. et al. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. **Oncol. Rep**, v. 18, n. 4, p. 893-899, 2007.

SUDARSANAM, S.; JOHNSON, D. E. Functional consequences of mTOR inhibition. **Curr. Opin. Drug Discov**, v. 13, n. 1, p. 31–40, 2010.

SUN, T. **Flow cytometric analysis of hematologic neoplasms: A color atlas and text in Acute Promyelocytic Leukemia (M3)**. Lippincott Williams & Wilkins, 2° ed, p. 227-232, 2002.

SUN, Y. et al. Crocin exhibits antitumor effects on human leukemia HL-60 cells *in vitro* and *in vivo*. **J. Evidence-Based Complementary Altern. Med**, Volume 2013, Article ID 690164, p. 7, 2013.

TAKATA, C. S. et al. Susceptibility of Vero cell line to vaccine strains of the measles virus. **Revista de Saúde Pública, São Paulo**, v. 28, n. 3, p. 209-212, 1994.

TAKEKAWA, M. et al. Regulation of stressactivated MAP kinase pathways during cell fate decisions. **Nagoya J. Med. Sci**, v. 73, n. 1-2, p. 1-14, 2011.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management. **Prog. Cardiovasc. Dis**, v. 49, n. 5, p. 330-352, 2007.

TOOZE, S. A.; YOSHIMORI, T. The origin of the autophagosomal membrane. **Nat. Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 831-835, 2010.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture. In: Drug Delivery System Workshop. Bangkok, Thailand. P. 19-20, 1999.

UZUNOGLU, S. et al. Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors. **Leuk. Res**, v. 23, p. 507-512, 1999.

VESSONI, A. T. et al. Autophagy and genomic integrity. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 11, p. 1444-1454, 2013.

VINCETI, M. et al. Selenium neurotoxicity in humans: bridging laboratory and epidemiologic studies. **Toxicol. Lett**, v. 230, n. 2, p. 295-303, 2014a.

VINCETI, M. et al. Selenium for preventing cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 30, n. 3, 2014b.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: Discovery to clinic - thirteenth bruce f. cain memorial award lecture. **Cancer Res**, v. 55, n. 4, p. 763–760, 1995.

WANG, Y. et al. Restoring expression of wild-type p53 suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in mice with a p53 missense mutation. **J. Clin. Invest**, v. 121, n. 3, p. 893–904, 2011.

WEEKLEY, C. M. et al. Selenium metabolism in cancer cells: the combined application of XAS and XFM techniques to the problem of selenium speciation in biological systems. **Nutrients**, v. 5, n. 5, p. 1734–1756, 2013.

WEEKLEY, C. M.; HARRIS, H. H. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. **Chem. Soc. Rev**, v. 42, p. 8870–8894, 2013.

WHEATE, N. J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113-8127, 2010.

WHITE, E.; DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clin. Cancer Res**, v. 15, n. 17, p. 5308–5316, 2009.

WHITE, E. et al. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. **Curr. Opin. Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 212–217, 2010.

WORLD CANCER REPORT 2014, edited by STEWART, B. W.; WILD, C. P. (2014), Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

WU, B. et al. Specific DNA structural attributes modulate platinum anticancer drug site selection and cross-link generation. **Nucleic. Acids Research**, v. 39, n. 18, p. 8200-8012, 2011.

XU, Y.; XIA, X.; PAN, H. Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis. **Oncol. Lett**, v. 5, n. 2, p. 411-416, 2013.

YANG, J. et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, p. 1129–1132, 1997.

YOKOMIZO, A. Y. **Obtenção de antígeno viral a partir de culturas de células vero em microcarregadores porosos**. São Paulo, 2001. 99p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, SP, 2001.

ZHAO, J. et al. Mutation of the retinoblastoma tumor suppressor gene sensitizes cancers to mitotic inhibitor induced cell death. **Am. J. Cancer Res**, v. 4, n. 1, p. 42-52, 2014.

ZOU, H. et al. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, v. 90; n. 3, p. 405–413, 1997.

ARTIGO CIENTÍFICO

**ASSESSMENT OF ANTICARCINOGENIC POTENTIAL OF SELENIUM-
BASED COMPOUND *IN VITRO***

(Artigo submetido ao periódico International Journal of Cancer)

ASSESSMENT OF ANTICARCINOGENIC POTENTIAL OF SELENIUM-BASED COMPOUND *IN VITRO*

Erica Fernanda Ferreira de Queiroz¹, Diego de Sousa Dantas², Lúcia Cristina Pereira Arruda³, Silvany de Sousa Araújo¹, Helivaldo Diogenes da Silva Souza⁴, Bruno Freitas Lira⁴, Ellen Cordeiro Bento da Silva¹, Petrônio Figueiras de Athayde Filho⁴, Manoel Adrião Gomes Filho¹.

¹Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Zip code: 52171-900, Recife – PE, Brazil

²Federal University of Rio Grande do Norte, Tv. Trairí, s/n, Centro, Zipcode: 59200-000, Santa Cruz – RN, Brazil.

³Department of Veterinary, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Zip code: 52171-900, Recife – PE, Brazil

⁴Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, Campus I, Zip code: 58059-900, João Pessoa – PB, Brazil.

Selenium-based compounds are important due to several assays that highlight their antitumor potential, as well as low cytotoxicity to normal cells. This study evaluated *in vitro* the antitumor potential of a selenium-based compound HSe-02-Se-(oxo-2-(4-nitrophenylamine)) benzoselenoato acetate, at concentrations: 0.395; 0.781; 1.562; 3.125; 6.25; 12.5; 25.0; 50.0 µg/mL. Cytotoxicity was evaluated by spectrophotometry and cell death pattern by flow cytometry and fluorescence microscopy. The studied compound presented high cytotoxicity for promyelocytic leukemia line (HL-60) and showed a dose-dependent decrease in cell viability. However, for non-cancerous cells, HSe-02 showed low toxicity and selective toxicity for tumor cells over healthy cells, essential characteristic for the development of chemotherapy. HSe-02 was able to induce cell death by apoptosis in a frequency similar or higher than doxorubicin, a drug widely used in oncology clinic. Overall, findings are similar to other studies evaluating antitumor activity of selenium compounds in leukemic cells. Results suggest that selenium has significant pharmacological potential to act selectively in tumor cells, inducing molecular and cellular events that culminate in tumor cells death by apoptosis.

Key Words: Cancer, Antineoplastic, Cytotoxicity, Chemotherapy, Apoptosis.

Correspondence: Msc. Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Aplicada – UFRPE, Recife – PE, República Federativa do Brasil, Tel.: +55-81-30347262, E-mail: ericka.ffq@hotmail.com.

New and Impact

Chemotherapy is the most widely treatment used for various types of cancers, about 70% of tumors are treated with chemotherapy. This study evaluated the antitumor potential of a novel selenium compound in a tumor lineage of acute promyelocytic leukemia. Results suggest that the compound is promising in the search for new antineoplastic agents, because it acts selectively on tumor cells, inducing cellular and molecular events that culminate in tumor cells death by apoptosis, in a concentration-dependent manner.

INTRODUCTION

Cancer is the second leading cause of death worldwide, accounting for 13% of total deaths, which is about eight million deaths annually. Recent studies show that 13 million new cases of cancer are emerging each year and this number may reach 17 million by the end of this decade.¹ In 2030, it is estimated 27 million incident cases, 17 million deaths and 75 million people living with cancer. The greatest effect of this increase will focus on low and middle income countries.²⁻⁴

Cancer treatment mainly aims cure, prolonging survival and improving individual's quality of life.⁵⁻⁷ Among different cancer treatments, chemotherapy is the most common, up to 70% of tumors will require chemotherapy at some time during the disease and it may be used alone or in combination with other types of therapy.^{8,9} Although chemotherapy is the most used treatment for cancer, its success is limited due to resistance to the drug action developed by tumor cells, and side effects, because of its cytotoxicity to healthy cells.¹⁰

Studies show that selenium, tested alone or in combination with other antioxidants, have anti-tumor effects by preventing angiogenesis and metastasis in breast, prostate, colorectal, melanoma, liver and lung cancers, among others.^{11,12} The compound increases resistance of non-carcinogenic cells to stress, besides acting as a pro-oxidant in neoplastic cells, turning them

more sensitive to selenium toxicity than normal cells, decreasing growth and activity.^{13,14}

Compounds containing selenium in its +4 oxidation level (selenite) have high activity as a scavenger of free radicals and, consequently, as an antitumor agent.^{15,16} Given the growing need for new and more effective anticancer compounds, there might be a pharmacological therapeutic window for the use of selenium derivatives compounds in cancer treatment.^{13,14} Thus, the aim of this study was to evaluate the antitumor potential, *in vitro*, of a derived-selenium compound in tumor lineage of acute promyelocytic leukemia as well as to establish cytotoxicity of this compound in healthy mononuclear cells of peripheral blood.

Materials and methods

Selenium organic compound

Selenium organic compound used in this study was synthesized in the Research Laboratory of Bioenergy and Organic Synthesis of Federal University of Paraíba, Brazil, from selenoglycolic acid. It easily donates/receives electrons, which possibly allows it to interact with tumor cells (Figure 1)¹⁷. Moreover, it has molecular weight lower than doxorubicin (579.98 g / mol⁻¹), a chemotherapeutic drug with established clinical use.

Selenium compound was characterized by infrared spectroscopy (IR), hydrogen nuclear magnetic resonance (NMR ¹H) and carbon-13 (NMR ¹³C). In turn, biological assays were performed at Laboratory of Applied Molecular Animal Physiology at the Federal Rural University of Pernambuco.

Cell culture

Cell line of human promyelocytic leukemia (HL-60) used in this study was obtained from the Bank of Cells of Rio de Janeiro (BCRJ). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (HIMEDIA™, Mumbai, India) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK) and 1% penicillin/streptomycin and amphotericin (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil) and maintained in an incubator with atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

Obtaining PBMC cells

PBMC cells (peripheral blood mononuclear cells) were obtained from human peripheral blood, in vacuum tubes containing anticoagulant (EDTA). For cell isolation, it was employed discontinuous Percoll gradient technique, according to methodology of Mousinho (2010)¹⁸. Whole blood samples were first diluted in 1X PBS buffer, in a ratio of 3 mL of blood into 5 ml PBS (3:5). Commercial Percoll was diluted in 1x PBS to obtain solutions at concentrations of 70, 50 and 40% and pH adjusted to 7.4. Subsequently, 3 ml were deposited at each concentration of Percoll (from the highest to the lowest density) in 15 ml polypropylene plastic tubes, resulting in 9 ml of total gradient. Aliquots of 2 ml of blood were deposited on the discontinuous gradient and centrifuged for 30 minutes at 2,000 rpm at room temperature. After centrifugation, PBMC cloud was recovered and transferred to a new tube containing 11 ml 1x PBS and centrifuged again for 20 minutes at 1,000 rpm. The pellet was resuspended in RPMI 1640 supplemented with 20% of fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin and amphotericin, by the end there was cell counting and viability determination.

Determination of cell viability (MTT)

HSe-02 compound cytotoxicity was estimated by MTT assay, according to Mosmann (1983)¹⁹. HL-60 cells and PBMC were seeded in 96 well plates, at a concentration of 7×10^4 per well and exposed to eight increasing concentrations (0.395, 0.781, 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 $\mu\text{g/mL}$) of HSe-02 compound. For positive control, it was performed doxorubicin treatment (0.78 $\mu\text{g/mL}$), whereas negative control received equal volume of culture medium. After 24 hours of incubation at 37 °C and 5% atmosphere of CO₂ was added to the wells corresponding to treatments with HSe-02 and positive control, 20 μL of MTT. After 3 hours of incubation at 37 °C, the plate was centrifuged, supernatant discarded and 100 μL of DMSO added. Then the plate was shaken for 5 minutes to completely solubilize formazan crystals and absorbance was evaluated in a plate spectrophotometer (MultiskanTM GO, Thermo Scientific,

USA) at 570 nm wavelength.²⁰ The assay was performed in triplicate, and to calculate the concentration that inhibits 50% of cell growth (IC₅₀), GraphPad Prism software, version 5.0, was used.

Assessment of plasma membrane integrity of HL-60 cells by flow cytometry

For the following methods, HL-60 cells were plated at a concentration of 5×10^5 per well and incubated for 24 hours with HSE-02 compound at concentrations of 3.12; 6.25 and 12.50 $\mu\text{g/mL}$; established by IC₅₀. Doxorubicin (0.78 $\mu\text{g/mL}$) was used as positive control, whereas culture medium was added to the negative control. Then, cells were collected, centrifuged at 2,000 rpm for 5 minutes, pellets were resuspended in 100 μL of PBS 1X buffer, 0.5 μL of DCF added (0.048 mg/ml) and 0.5 μL of IP (0.17 mg/ml) and incubated for 10 minutes at 37 °C. Analysis of samples were performed in flow cytometer (ImageStreamX Mark II, amnis®). Two independent experiments were performed in duplicate.

Morphological analysis by differential staining with Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB)

After HSe-02 exposure period in concentrations of 3.12; 6.25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, HL-60 cells were collected and centrifuged at 2,000 rpm for 5 minutes, then pellets were resuspended in 25 μL of 1x PBS buffer, added 2 μL of aqueous solution of AO/EB (100 $\mu\text{g/ml}$) and incubated for 5 minutes.²¹ A 5 μL aliquot was placed on slides, covered with coverslip and brought to a fluorescence microscope (Carl Zeiss. Göttingen, Germany; 400x) using a 485-520 nm filter. Three hundred events were quantified by sample, which were classified as viable cells, apoptosis and necrosis. Three independent experiments were performed in duplicate.

Analysis of mitochondrial membrane potential

After HSe-02 exposure period in concentrations of 3.12; 6.25 and 12.5 µg/mL, HL-60 cells were collected and centrifuged at 2,000 rpm for 5 minutes, pellets were resuspended in 25 µL of 1x PBS buffer, added 5 µL of JC-1 (0.15 mM in DMSO) and incubated for 10 minutes at 37 °C. A 5 µL aliquot was placed on slides, covered with coverslips and taken to the fluorescence microscope (Carl Zeiss. Göttingen, Germany; 400x), in a 485-520 nm filter. Three hundred cell events were quantified by samples, which were classified as depolarized (stained in green) and polarized (stained in orange). Two independent experiments were performed in duplicate.

Quantification of caspases 3 and 7 by flow cytometry

A total of 5×10^6 cells/mL of HL-60 were plated in 6-well plates and incubated for 24 hours with the compound at concentrations 3.12; 6.25 and 12.5 µg/mL, established by IC_{50} , doxorubicin (0.78 µg/mL), positive control and negative control. After this period, contents of each well were transferred to 1.5 ml polypropylene microtubes and added 1 µL of CellEvent® caspase 3 and 7 Green Detection Reagent (Life Technologies) and incubated for 25 minutes at 37 °C, then 1 µL of SYTOX® AADvanced™ (Life Technologies) was added and incubated for 5 minutes at 37 °C. Sample analysis were performed in flow cytometer (ImageStreamX Mark II, amnis®). Two independent experiments were performed.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls test and post-hoc Tukey (caspases 3 and 7). For cytotoxicity analysis, GraphPad Prism software, version 5.0 was used. Results were expressed as mean ± standard error of the mean. Data were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Assessment of compound cytotoxicity activity and determination of cell viability

Development of a safe and effective therapy against cancer has been target of much research. Regarding chemotherapy, it needs to have a potential antitumor action, but with low toxicity or even a protective action against other treatments employed in patient care with cancer.²²

Table 1 shows that HSe-02 compound had cytotoxic activity for HL-60 cells and non-tumor cells (PBMC). The compound exhibited greater cytotoxicity in tumor cells compared to PBMC ($p < 0.05$); and less cytotoxicity on tumor cell line when compared to doxorubicin, expressed by a higher IC_{50} (3.42 ± 0.14) ($p < 0.05$).

The tested molecule was selective for tumor cells, requiring doses 70 times less than the doses required to produce the same effect on human cytotoxic lymphocytes. Thus, in addition to having cytotoxic activity, it is crucial that chemotherapeutic drugs or other substances being tested for this purpose are selective for tumor cells over healthy cells. Selectivity index (SI) is a mathematical quantity that expresses this relationship, and a value greater than two is significant and acceptable to chemotherapeutic drugs. To determine SI, one must calculate the ratio of IC_{50} inhibitory concentration in non-tumor cell lines by IC_{50} in tumor lines.²³

Among selenium compounds with selectivity for tumor cells and antiproliferative activity described in literature, we can mention inorganic compounds, such as selenite SeO_3^{2-} . This one has inhibitory activity in micromolar range, widely documented in several different tumor types. Moreover, among organic compounds include the forms selenium glutathione, selenium amino acids derivatives, methylseleninic acid, and selenides, diselenides, selenium cyanates, selenium conjugated heterocyclic groups, as well as selenium nanoparticles.²⁴

Figure 2 shows cell viability graphs for HSe-02 compound in tested cell lines. The compound promoted decrease of HL-60 cells viability at concentration of $3.12 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$). There was no significant decrease in PBMC cells viability at any of tested concentrations ($p > 0.05$).

The tested compound showed satisfactory cytotoxic activity showing dose-dependent decrease of cell viability in HL-60 line and IC_{50} in the range of 3.42 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 2A).

Among essential parameters in the development of new cancer drugs, the balance between therapeutic and toxicological effects is an important issue to be considered. Many drugs have cytotoxic activity, but are not selective only to tumor cells and may also affect non-tumor cells.²⁵

Assessment of cell membrane integrity in HL-60 tumor cell line

After 24 hours of treatment, there was significant decrease ($p < 0.001$) of cell percentages with intact plasma membrane, at concentrations of 6.25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ of selenium compound related to negative control (non-treated group). Compared to doxorubicin (positive control), the compound showed, at all concentrations, higher values of cells with intact membranes, that is, the compound caused less damage to HL-60 cell membranes than doxorubicin ($p < 0.001$). It is noteworthy that the compound promotes loss of membrane integrity, at a value above its IC_{50} (Figure 3A).

Loss of plasma membrane integrity is a characteristic of cell death, and it is related to structural and functional changes, which the cell is subjected and it may occur in late apoptosis or necrosis.^{26,27}

Investigation of cytotoxicity OA/EB assay

Results show that, when compared to negative control, HSe-02 caused percentage decrease in viable cells at concentrations of 6.25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). At concentration of 3.12 $\mu\text{g/mL}$, there was lower cytotoxicity compared to doxorubicin ($p < 0.05$). Increase of apoptotic cells was demonstrated at concentrations from 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$). Regarding necrotic events, there was no difference among groups, indicating that the compound does not have cytotoxic activity by necrosis ($p > 0.05$) (Figure 3B).

From the experiments, it can be seen that the compound induced apoptosis in a concentration-dependent manner ($p > 0.05$), in similar or higher frequency to doxorubicin, which consists of a drug widely used in clinical oncology. The

advantage of inducing apoptosis as a way of cell death by chemotherapeutic drugs consists in the fact that the cells can be eliminated by the immune system without triggering inflammatory response.²⁸

Our results corroborate previous studies that suggested anticarcinogenic activity of selenium against various tumor cell lines, through apoptosis induction associated with cell cycle stop, mediated by release of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage.^{29,30} Although the exact mechanisms by which anti-tumor activity is mediated still are not completely understood, several plausible mechanisms are already proposed and point to clinical advantages of using selenium for cancer.²⁴

Assessment of mitochondrial membrane depolarization

The compound, at all tested concentrations, promoted greater depolarization of mitochondrial membrane when compared to negative control ($p < 0.05$). At concentration of 12.5 $\mu\text{g/mL}$, the compound caused depolarization greater than doxorubicin, used as a positive control ($p < 0.001$). Results and other p values are shown in Figure 3C.

Given the main role of mitochondria and its membrane potential in maintaining bioenergetic and metabolic cell functions and their relationship to death process by apoptosis, it is essential to evaluate mitochondrial membrane potential in cells exposed to anti-tumor drugs, in order to prove activation of intrinsic apoptosis pathway.^{31,32,33}

Thus, the tested compound in this study promoted depolarization of mitochondrial membrane in the same ratio as the positive control, or higher values, as it was noticed for concentration 12.5 $\mu\text{g/mL}$, confirming that the compound promotes apoptosis signal transduction through mitochondrial pathway (intrinsic pathway).

Cytometric analysis of expression of caspases 3 and 7

Determination of expression of caspases 3 and 7, for positive control and treatments 3.12, 6.25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ are shown in Figure 4.

In assessing activation of caspases 3 and 7, selenium compound showed no statistically significant difference ($p > 0.05$) when compared to doxorubicin. At concentrations of 6.25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, standard expression was, respectively, similar and superior to that of doxorubicin (Fig. 5A). HSe-02 induced expression of caspases in a concentration-dependent manner.

On the other hand, since there was no activation of caspases pathways, it was observed that doxorubicin was highly cytotoxic to the cells, killing them, probably by necrosis ($p < 0.05$). Treatments 3.12 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$ showed the lowest cytotoxicity levels as evidenced by the low expression of necrotic cells (Figure 5B).

Apoptotic signaling happens by independent pathways (intrinsic and extrinsic) that converge to the activation of caspases, which act as regulators of initiation and execution of apoptosis.^{34,35} Caspases 3, 6 and 7 are known as executing, because once activated, they promote DNA fragmentation and consequently cell death by apoptosis.^{32,36}

Results corroborate several studies evaluating antitumor activity of selenium compounds in leukemic cells.³⁷⁻⁴⁰ These studies show that selenium compounds were able to induce apoptosis by induction of intrinsic pathway. In addition to that, studies on other cell lines demonstrated that selenium favors modification of thiol group of proteins and molecules with low molecular weight, promoting oxidative stress and poor protein formation, impacting negatively on cellular signaling, as well as it would act by connections or changes associated to chromatin, promoting DNA damage and decrease of RNA transcription and translation of encoding proteins associated to angiogenesis, such as vascular endothelial growth factor.²⁴

Results of this study corroborate those found in the literature, which show that selenium has significant pharmacological potential by acting selectively in tumor cells, inducing cellular and molecular events that culminate in tumor cells death by apoptosis.

CONCLUSION

Results suggest that HSe-02 is a promising compound in the search for new antineoplastic agents; it acts selectively on tumor cells, inducing cellular and molecular events that culminate in tumor cells death by apoptosis, in a concentration-dependent manner. Therefore, we filled a patent application at the National Institute of Industrial Property.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CNPq and CAPES for financial support. To Professor Dr. Maria Madalena Pessoa Guerra from Andrology Laboratory (UFRPE) for collaborating in by flow cytometry assays.

REFERENCES

1. Goulart FA A. [Non-transmissible chronic diseases: control strategies and challenges for systems of Health]. Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde, 2011. Available at: <http://apsredes.org/site2012/wp-content/uploads/2012/06/Condicoes-Cronicas_flavio1.pdf>; Accessed in: 02 de Feb. 2016.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, eds. GLOBOCAN v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available at: <<http://globocan.iarc.fr>>. Accessed in: 02/02/2016.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). [Estimtes/2012 Cancer Incidence in Brazil]. Rio de Janeiro, 2011.
4. World Cancer Report 2014, edited by Stewart BW, Wild CP. (2014), Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144: 646-674.

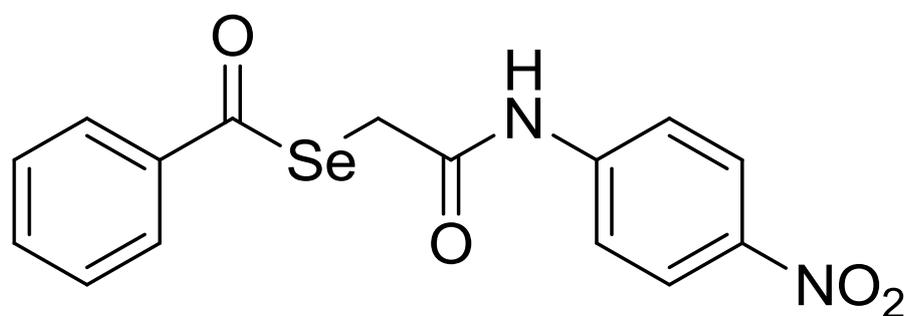
6. Murad AM, Katz A. Oncology. Clinical Basis for treatment. Guanabara: Rio de Janeiro, 1996.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). [Chemotherapy]. Available at: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=98>; Accessed in: 26 Dec, 2015.
8. Bonassa EMA, Gato MIR, Mota, MLS, Molina P. [General concepts in antineoplastic chemotherapy]. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. 4^a ed., Atheneu: São Paulo, 2012.
9. Desantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, eds. Cancer treatment and survivorship statistics. Cancer J Clin, 2014; 64: 252-271.
10. Kumar R, Kaur M, Silakari O. Physiological modulation approaches to improve cancer chemotherapy : A review. Anticancer Agents Med Chem, 2014; 14: 713-749.
11. Chen YC, Prabhu KS, Mastro AM. “Is selenium a potential treatment for cancer metastasis?”. Nutrients, 2013; 5: 1149-1168.
12. Vinceti M, Dennert G, Crespi CM, Zwahlen M, Brinkman M, Zeegers MP, Horneber M, D’Amico R, Del Giovane C. Selenium for preventing cancer. Cochrane Database Syst Rev, 2014; 3: CD005195.
13. Rayman MP. Selenium and human health. Lancet, 2012; 379: 1256–1268.
14. Weekley CM, Aitken, JB, Finney L, Vogt S, Witting PK, Harris HH. Selenium metabolism in cancer cells: the combined application of XAS and XFM techniques to the problem of selenium speciation in biological systems. Nutrients, 2013; 5: 1734–1756.
15. Suchocki P, Misiewicz I, Skupinska K, Waclawek K, Fijalek Z, Kasprzycka-guttman T. The activity of Selol in multidrug-resistant and sensitive human leukemia cells. Oncol Rep, 2007; 18: 893-899.

16. Rahden-staron I, Suchocki P, Czeczot H. Evaluation of mutagenic activity of the organo-selenium compound Selol by use of the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. *Mutat Res*, 2010; 699: 44-46.
17. Athayde-filho PF, Souza AG, Morais AS, Botelho JR, Barbosa-Filho JM, Miller J, Lira BF. Synthesis and characterization of three new organoselenium compounds. A convenient synthesis of aroylselenoglycolic acids. *ARKIVOC*, 2004; 6: 22-26.
18. Mousinho KC. Estudo do potencial anticâncer de um derivado de chalcona, 1-(4-Nitrofenil)-3-fenilprop-2-em-1-ona, *in vitro* e *in vivo*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2010.
19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983; 65(1-2): 55-63.
20. Riss TL, eds. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S. et al. (org) Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.
21. Liu K, Liu PC, Liu R, Wu X. Dual AO/BE staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Med Sci Monit Basic Res*, 2015; 21: 15-20.
22. Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc*, 2005; 64: 527-542.
23. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 2007; 42: 377-387.
24. Fernandes AP, Gandin V. Selenium compounds as therapeutic agentes in câncer. *Biochim Biophys Acta*, 2015; 1850: 1642-1660.

25. Mishra T, Khullar M, Bhatia A. Anticancer potential of aqueous ethanol seed extract of *Ziziphus mauritiana* against cancer cell lines and Ehrlich ascites carcinoma. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011.
26. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2001; 2: 589-598.
27. Kroemer G, eds. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 2009; 16: 3–11.
28. Liu JJ, Lin M, Yu JY, Liu B, Bao JK. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett*, 2011; 300: 105–114.
29. Gabel-jensen C, Lunoe K, Gammelgaard B. Formation of methylselenol dimethylselenide and dimethylselenide *in vitro* metabolism models determined by headspaceGC-MS. *Metallomics*, 2010; 2: 167-173.
30. Wu M, Kang MM, Schoene NW, Cheng WH. Selenium compounds activate early barriers of tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2010; 285(16): 12055-12062.
31. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer*, 2015.
32. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010; 11: 621–632.
33. Degli Esposti M. Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Biochem Soc Trans*, 2004; 32: 493–495.
34. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy. *Oncogene*, 2012; 31: 2805–2808.
35. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The role of Bcl 2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol*, 2012; 524308: 15.
36. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008; 9: 47–59.

37. Peng Z, Lan L, Zhao F, eds. A novel thioredoxin reductase inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in HL-60 and K562 cells. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008; 9: 16-21.
38. Jeong LS, eds. Discovery of a New Template for Anticancer Agents: 2'-deoxy-2'-fluoro-4'-selenoarabinofuranosyl-cytosine (2'-F-4'-Seleno-ara-C). *J Med Chem*, 2009; 52: 5303-5306.
39. Kim BM, eds. p38 mitogen-activated protein kinase is a key regulator of 5-phenylselenyl- and 5-methylselenyl-methyl-2'-deoxyuridine-induced apoptosis in human HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012; 417: 237-244.
40. Moreno E, eds. Sulfur and selenium derivatives of quinazoline And pyrido[2,3-d]pyrimidine: Synthesis and study of their potential cytotoxic activity *in vitro*. *Eur J Med Chem*, 2012; 47: 283-289.

FIGURES



HSe-02

Figure 1. Structural formula of selenium compound. MW = 363.23 g/mol⁻¹.

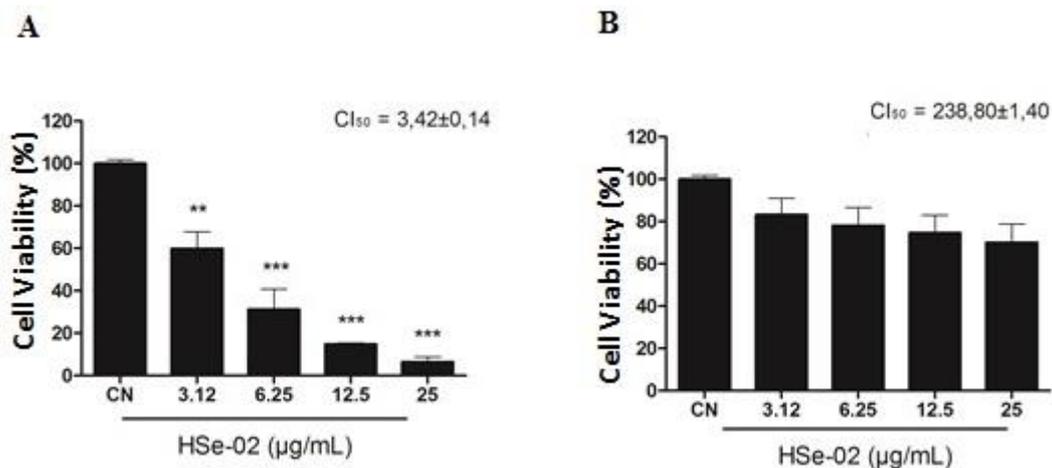


Figure 2. Assessment of cellular viability (%) in HL-60 line (A) and PBMC cells (B) after 24 hours of incubation with compound HSe-02 at four different concentrations. IC₅₀ values are expressed in µg/mL. Data were compared to negative control (non-treated group) by ANOVA, followed by Student Newman-Keuls test. **p < 0.01, ***p < 0.001.

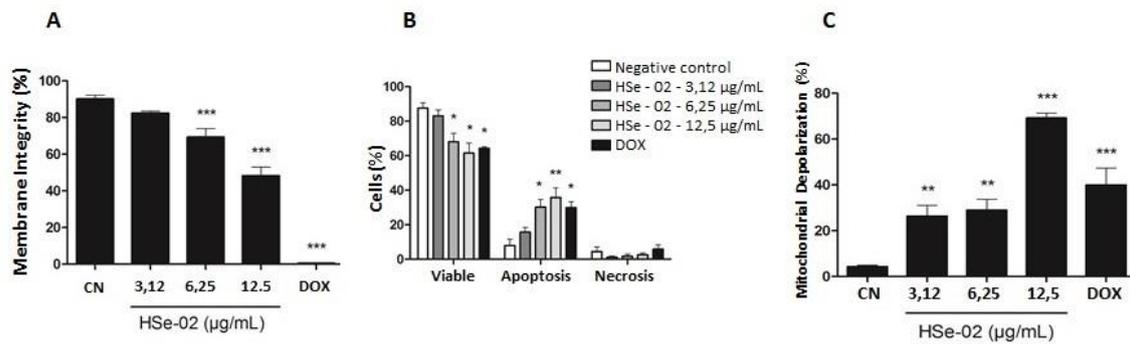


Figure 3. A) Assessment of membrane integrity of HL-60 cells after incubation with different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. **B)** Percentage of cell viability, necrosis and apoptosis in HL-60 cells treated at different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. **C)** Assessment of mitochondrial depolarization by JC-1 assay of HL-60 cells incubated at different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. Data are mean \pm SEM and were compared to negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. DOX - Doxorubicin (0.78 $\mu\text{g/mL}$).

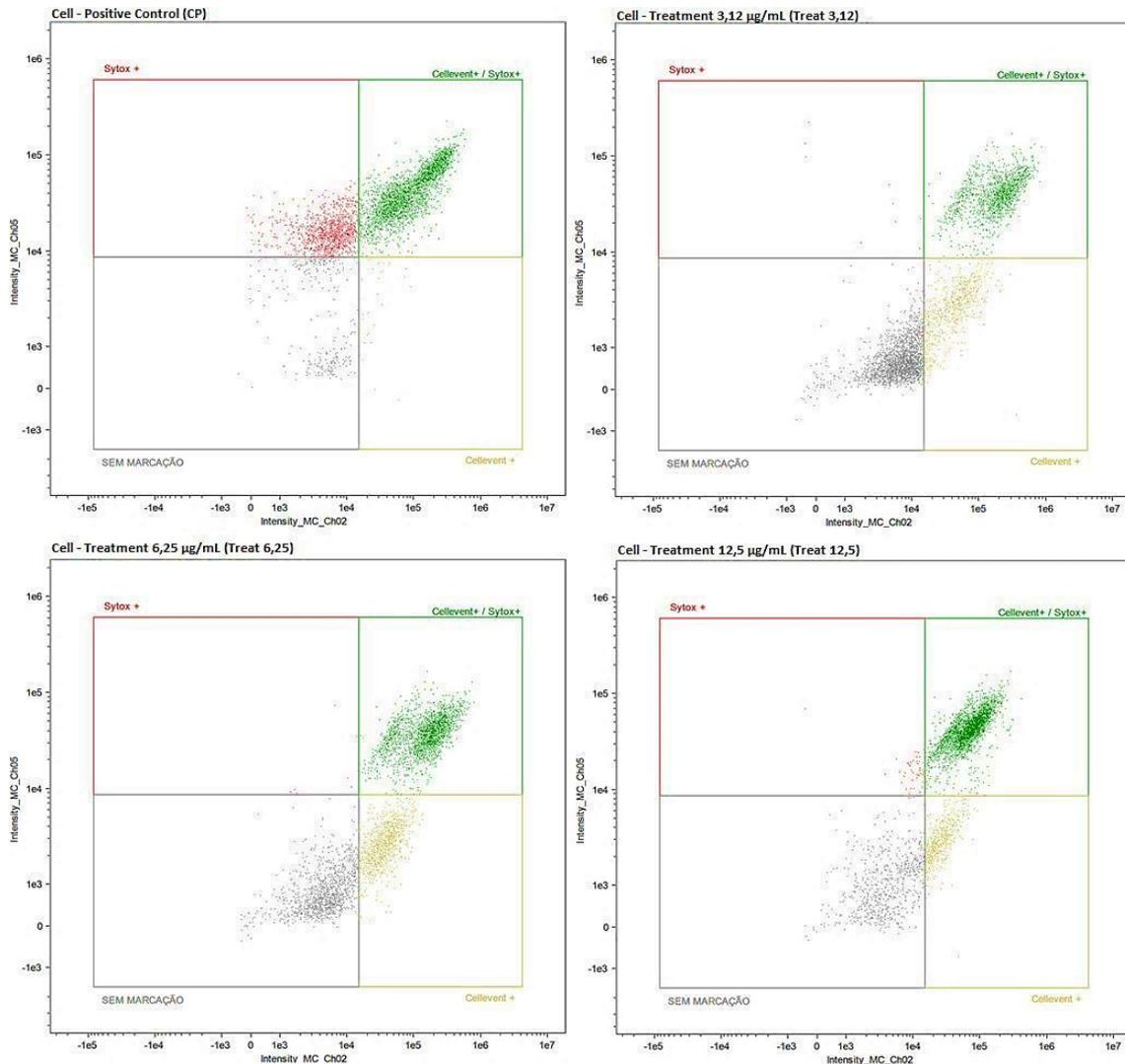


Figure 4. Determination of expression of caspases 3 and 7. CP = predominance of dead cells by apoptotic pathway, highlighted by high expression of caspases (green quadrant), followed by necrotic events (red quadrant); Treat. 3.12 = It is observed low cytotoxicity, as evidenced by predominance of events in unlabeled field (gray quadrant), accompanied by low caspases expression (green and brown quadrant); Treat. 6.25 = preponderance of apoptotic events demonstrated by caspases expression (green and brown quadrant), followed by unlabeled cells. It is not observed necrotic cells; Treat. 12.5 = high caspases expression (green and brown quadrant), followed by unlabeled cells.

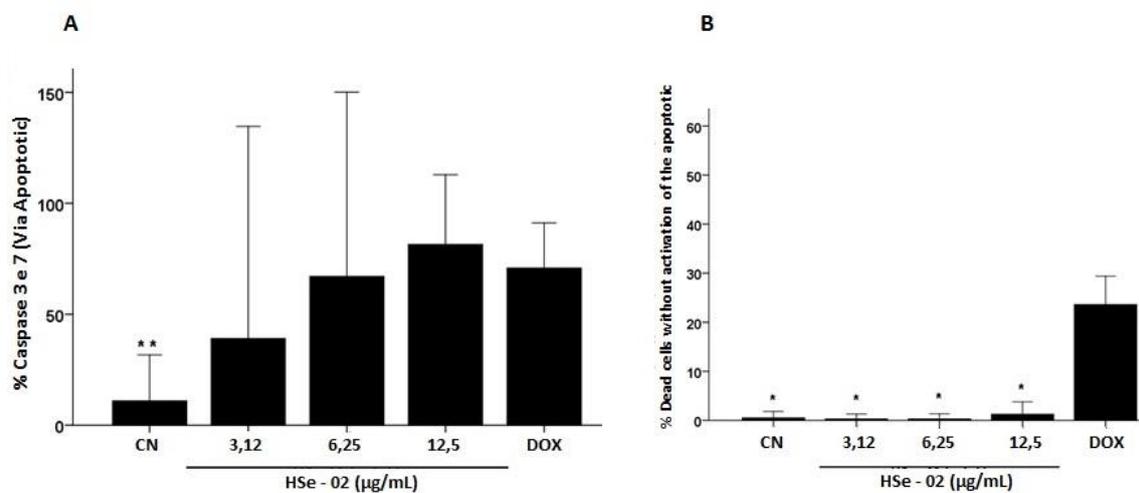


Figure 5. A) Assessment of expression of caspases 3 and 7 by flow cytometry. HL-60 cells were incubated with different concentrations of selenium-based compound for 24 hours. **B)** Percentage of tumor cells HL-60 killed without activation of apoptotic pathway. Cells were exposed to different concentrations of Hlf-02 for 24 hours. Data are mean \pm SEM and were compared to positive control by ANOVA followed by the post hoc Tukey test. ** $p < 0.01$. DOX - Doxorubicin (0.78 $\mu\text{g/mL}$).

TABLE

Table 1. Mean (\bar{X}) and standard error of the mean (SEM) of cytotoxic activity of selenium organic compound HSe-02 in tumor cell line (HL-60) and non-tumor cells (PBMC) compared to doxorubicin.

Compound	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
	HL-60	PBMC
	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$
HSe-02	$3.42 \pm 0.14^{\text{aA}}$	$238.80 \pm 1.40^{\text{B}}$
Doxorubicin	$0.52 \pm 0.13^{\text{b}}$	NT

Different lowercase letters within the same column indicate significant difference between compounds ($p < 0.05$). Capital letters within the same line indicate significant difference between cell lines ($p < 0.05$). IC₅₀ = concentration that inhibits 50% of cell growth. NT = Not tested.

APÊNDICE

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO COMPOSTO ESTUDADO

(HSe-02)

Rendimento: 70 %. Sólido branco com p.f. 192-193 °C.

Massa molar: 363,23 g/mol.

RMN ^1H – (200 MHz, CDCl_3 , δ): 8,82 (s, 1H, NH); 8,19 (d, 2H, H-10 e H-10'); 7,94 (d, 2H, H-3 e H-3'); 7,73 à 7,66 (m, 3H, H-5 à H-9 e H-9'); 7,52 (t, 2H, H-4 e H-4'); 3,80 (s, H-8, 2H).

RMN ^{13}C – (50 MHz, CDCl_3 , δ): 197,59 (C-1); 137,66 (C-2); 129,38 (C-3 e C-3'); 127,7 (C-4 e C-4'); 135,16 (C-5); 28,02 (C-6); 168,83 (C-7); 143,91 (C-8); 119,22 (C-9 e C-9'); 125,2 (C-10 e C-10'); 143,66 (C-11).

IV (KBr, cm^{-1}): 3261 (N-H); 3207 à 3067 (=C-H, Ar); 1670 (-Se-CO e -N-CO sobrepostos); 1564 e 1404 (C=C, Ar); 1510 e 1342 (NO_2); 852 (=C-H, Ar).


INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:
				2/3
Título do Documento:		Depósito de Pedido de Patente	Código:	Versão:
				FQ001
			Processamento:	DIRPA-PQ006

6. Inventor (72):
 Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Manoel Adrião Gomes Filho

6.2 Qualificação: Professor

6.3 CPF: 127.156.204-97

6.4 Endereço Completo: Rua Irmã David n 154, apt 3002, Casa Porte, Recife

6.5 CEP: 52061-070

6.6 Telefone: (81) 33206344

6.7 FAX:

6.8 E-mail: manoadriao@yahoo.com.br

 continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:
 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

 continua em folha anexa

10. Listagem de seqüências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001
				Procedimento:	DIRPA-PQ006
				Versão:	2

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	4
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	11
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	3
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	8
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de seqüências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Lista de Depositante (71) e Lista de Inventores (72)	5

12. Total de folhas anexadas: 34 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Recife, 11 de Março de 2015

Local e Data

Prof. Dr. Pabylon G. Cabana
Assinatura e Carimbo
NIT / UFRPE

LISTA DE INVENTORES PARTICIPANTES DA PATENTE DE INVENÇÃO

NOME	Manoel Adrião Gomes Filho
E-MAIL	manoeladriao@yahoo.com.br
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal Rural de Pernambuco
FORMAÇÃO	Médico Veterinário. Doutor em Fisiologia

NOME	Ellen Cordeiro Bento da Silva
E-MAIL	silva.ecb@gmail.com
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal Rural de Pernambuco
FORMAÇÃO	Médica Veterinária. Doutora em Biotecnologia

NOME	Diego de Sousa Dantas
E-MAIL	diegodantas1@gmail.com
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal Rural de Pernambuco
FORMAÇÃO	Fisioterapeuta. Doutorando em Biotecnologia

NOME	Petrônio Filgueiras de Athayde Filho
E-MAIL	Athayde-filho@quimica.ufpb.br
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal da Paraíba
FORMAÇÃO	Licenciatura em Química. Doutor em Química (Química Orgânica)

NOME	Bruno Freitas Lira
E-MAIL	brunofrlira@hotmail.com
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal da Paraíba
FORMAÇÃO	Licenciatura em Química. Doutor em Química (Química Orgânica)

NOME	Helivaldo Diógenes da Silva Souza
E-MAIL	Helivaldog3@gmail.com
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal da Paraíba
FORMAÇÃO	Bacharelado em Química. Mestre em Química (Química Orgânica)

NOME	Roxana Pereira de Sousa
E-MAIL	roxana.fp@gmail.com
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal da Paraíba
FORMAÇÃO	Graduanda em Engenharia Química

NOME	Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz
E-MAIL	ericka.ffq@hotmail.com
INSTITUIÇÃO	Universidade Federal Rural de Pernambuco
FORMAÇÃO	Bacharel em Ciências Biológicas

