

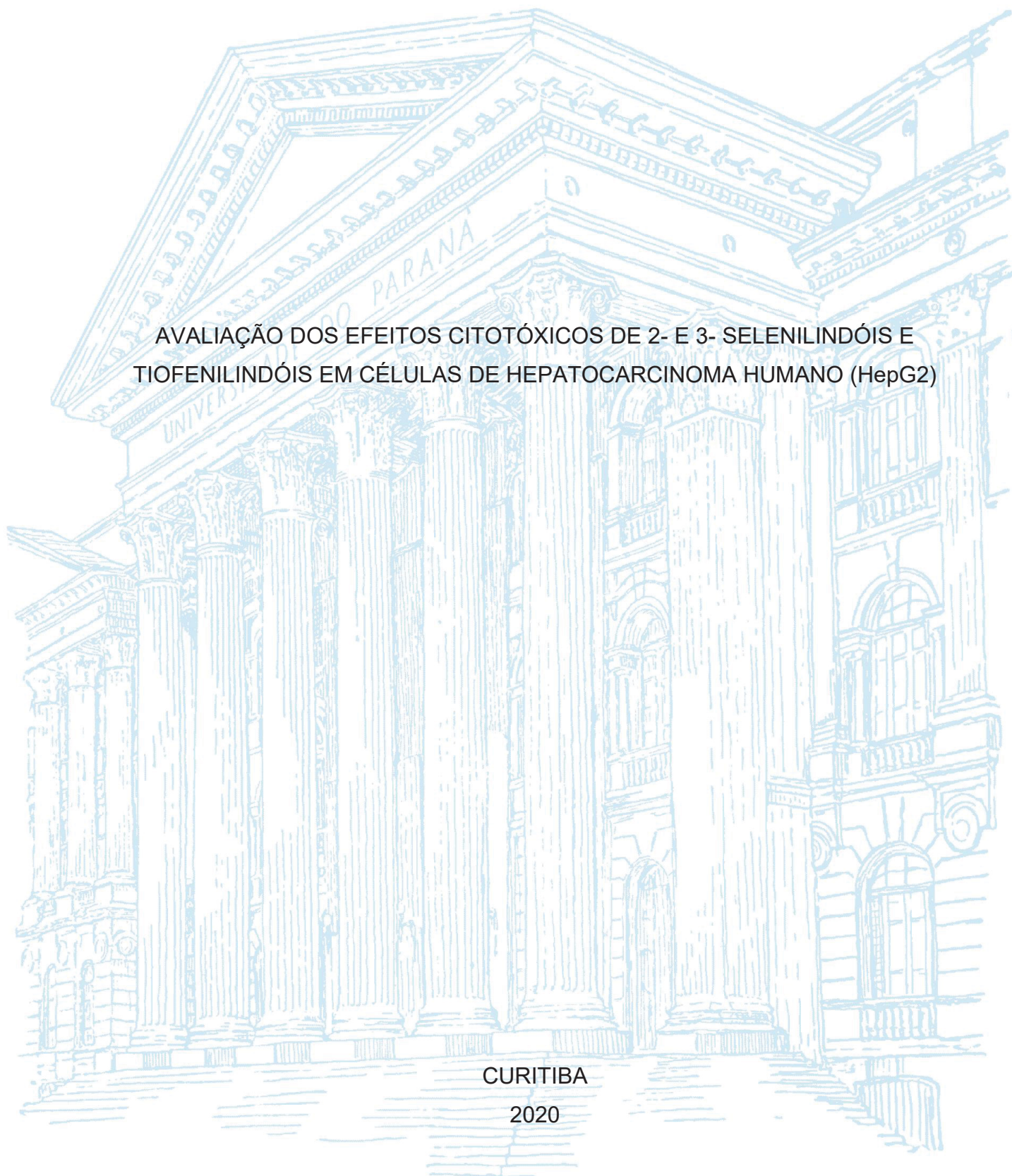
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO SBRANA SERUR DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE 2- E 3- SELENILINDÓIS E
TIOFENILINDÓIS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

CURITIBA

2020



EDUARDO SBRANA SERUR DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE 2- E 3- SELENILINDÓIS E
TIOFENILINDÓIS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noleto

Coorientadora: Profa. Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Santos, Eduardo Sbrana Serur dos.

Avaliação dos efeitos citotóxicos de 2- e 3- selenilindóis e tiofenilindóis em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). / Eduardo Sbrana Serur dos Santos. – Curitiba, 2020.

102 f. : il.

Orientadora: Guilhermina Rodrigues Noletto.

Coorientadora: Sílvia Maria Suter Correia Cadena.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Câncer. 2. Toxicidade. 3. Fígado - Tumores. 4. Células cancerosas. 5. Fígado – Câncer. I. Título. II. Noletto, Guilhermina Rodrigues. III. Cadena, Sílvia Maria Suter Correia. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (22. ed.) 616.994



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EDUARDO SBRANA SERUR DOS SANTOS** intitulada: **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE 2- E 3- SELENILINDÓIS E TIOFENILINDÓIS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)**, sob orientação da Profa. Dra. GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica

28/08/2020 19:10:02.0

GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/08/2020 18:23:35.0

KARINA BETTEGA FELIPE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/08/2020 18:45:20.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional e pela bênção e privilégio da vida. Por constantemente me mostrar a importância de meus caminhos e da minha existência.

Aos meus pais Adalberto e Leila, por sempre acreditarem e investirem na minha educação. Espero poder orgulhá-los e um dia retribuir ao menos parte do que vocês fizeram por mim.

À Universidade Federal do Paraná, por ter sido o meu ambiente de crescimento e formação desde a graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) por me proporcionar a oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores inspiradores que tive o privilégio de ter e que exercem a profissão com muito amor e dedicação, os quais sem dúvidas levo como grandes exemplos. São muitos para citar aqui, mas todos contribuíram para que eu valorizasse ainda mais a importância da docência e acreditasse no poder transformador que ela pode ter. Isto é educação: transformar pessoas. Para mim, nada é tão bonito quanto isto.

À minha orientadora Guilhermina, pela confiança que depositou em mim ao me aceitar como aluno e durante todo o decorrer do trabalho. Por todos os puxões de orelha muito válidos e pela sua postura de prontidão que eu realmente admiro muito.

À professora Sílvia, minha coorientadora, pelo seu exemplo de humildade tão encantador, pelo apoio na época em que eu ainda estava procurando por uma vaga no laboratório, e pela ajuda e dicas valiosas durante os experimentos de mestrado.

Às professoras Maria Eliane, Sheila e Glaucia, pelas suas imensas contribuições ao grupo. Admiro cada uma de uma maneira singular, e para mim é um grande orgulho poder ter feito parte da história do laboratório.

Às técnicas Jainy e Bete, pela amizade e pelo trabalho tão fundamental desempenhado pelas duas. O trabalho de vocês é o alicerce de todas as atividades do laboratório, e sem vocês nada seria possível. Ao Arquimedes também pela ajuda prestada ao laboratório.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultivo Celular e Oxidações Biológicas. Agradeço imensamente ao André pela parceria e toda a ajuda em experimentos em tantas etapas do projeto. À Juliana Kulik e Dainesy, pela amizade

e pelo cuidado que sempre tiveram comigo. À Marília, por me ensinar a utilizar o oxígrafo e à Bianca, por me ajudar com o experimento de morfologia. Eu facilmente escreveria muito mais a respeito de cada um, mas fica ao menos meu pequeno registro de muito obrigado também a vocês: Ester, Lisley, Luiz Carlos, Huly, Juliana Carvalho, Henrique, Ana Paula, Viktor, Diego, Elizabeth, Ana Luiza, Elaine, Carolina, Rafaela e Mariane. Vocês todos certamente tornaram a experiência de mestrado muito mais agradável e gratificante.

Ao Philippe, Gustavo, Yeda, Tatiana, Alinne, Sarah, Shayla, Isabela e demais colegas de Departamento e vida acadêmica pelos momentos vivenciados juntos.

À minha família: minha origem, minhas raízes, a base de tudo e de quem eu sou. Nossas antigas e futuras gerações são um motivo de orgulho profundo meu. Aos meus amigos para a vida: Luiz Eduardo, Anna Paula, Taissa, Ludmilla, Raíssa, Tatiane, Alencar, Pedro, Laizza, Maho e tantas, mas tantas outras pessoas incríveis que tive o privilégio de conhecer. Recitando Carl Sagan, diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com vocês.

Ao Thiago: você ter cruzado o meu caminho foi o que de mais especial poderia me acontecer. Você mudou tudo e contribuiu tanto para que eu pudesse ser quem eu sou hoje. Não sei se um dia alguém fará eu me sentir como você, sem esforço algum, conseguiu. Independentemente do caminho que nossas vidas sigam, você me marcou para sempre e sempre serei grato a você.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a manutenção do meu bem-estar e saúde mental neste período. Que renovaram a luz em minha vida, e que me ajudaram a encarar o sofrimento de frente e seguir com esperança.

Aos alunos da disciplina de Bioquímica Celular e Animal do 2º semestre de 2018 do curso de Enfermagem, que foram minha primeira turma de Estágio em Docência. Vocês são fantásticos e guardarei vocês com muito carinho.

Aos funcionários da cantina e do RU, especialmente Yane, Jessica, Flavia, Marcia e dona Silvia, por sempre deixarem o meu dia mais feliz com um sorriso, algumas palavras gentis e uma conversa descontraída, ou por sempre lembrarem de guardar um pão de batata para mim. São nas atitudes mais simples que nos sentimos especiais pelos outros, e vocês certamente fizeram isto por mim.

Aos porteiros do setor de Ciências Biológicas e todas as meninas da equipe de limpeza. Mesmo que o trabalho de vocês infelizmente não seja tão valorizado quanto deveria, certamente é o que move e faz o setor funcionar.

Ao secretário da pós Thiago Vello pelo auxílio nas mais diversas situações.

Ao professor Daniel Rampon e o doutorando Eduardo Quadros do Departamento de Química pela síntese e fornecimento dos compostos utilizados neste trabalho.

Ao professor Glaucio Valdameri e as alunas Isadora Zanzarini e Ingrid Zattoni pelo auxílio na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

À professora Karina Bettega do Departamento de Análises Clínicas e à professora Daniela Leme do Departamento de Genética por gentilmente cederem as células MCF-7 e HepG2 para a realização deste trabalho.

À banca, professoras Karina Bettega e Sheila Winnischofer, por terem aceito o convite e se disposto a avaliar este trabalho. À professora Sheila, também pela correção do projeto.

A todos aqueles que dedicaram e dedicam suas vidas à ciência e à investigação da vida em todas as suas facetas, belezas, desafios e complexidades.

À CAPES, ao CNPq e demais agências de fomento pelo apoio financeiro.

Não há despertar de consciência sem dor.
As pessoas farão de tudo, chegando aos limites do absurdo, para evitar enfrentar a sua própria alma. Ninguém se torna iluminado por imaginar figuras de luz, mas sim por tornar consciente a escuridão.

Carl Jung

RESUMO

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças de extrema complexidade, sendo responsável por milhões de mortes em todo o mundo anualmente. Apesar da disponibilidade de opções terapêuticas, a pesquisa por novos tratamentos substitutos ou complementares ainda é necessária. Neste sentido, diferentes compostos sintéticos, como compostos de organosselênio, de organo enxofre e compostos indólicos são estudados quanto ao seu potencial antitumoral e muitos têm demonstrado resultados promissores. Embora os selenilindóis e tiofenilindóis tenham sido descritos como protetores em doenças como a depressão e aterosclerose, eles não foram estudados no contexto tumoral até o presente momento. Assim, o presente projeto destinou-se a avaliar a potencial atividade citotóxica de quinze compostos das classes dos 2- e 3- selenilindóis e tiofenilindóis em um modelo celular tumoral. Através de um *screening* de avaliação de viabilidade celular, selecionou-se como modelo celular as células de hepatocarcinoma celular HepG2 e como compostos com maior potencial citotóxico os dois derivados trifluormetilados. A citotoxicidade destes compostos foi confirmada em ensaios adicionais, incluindo para a exposição de 48 horas um aumento de até 95% na liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), a evidência de morte celular através de citometria de fluxo (~57% de células marcadas com anexina V e/ou iodeto de propídeo), um aumento superior a duas vezes dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares e a depleção de mais de dois terços dos níveis intracelulares de ATP. Adicionalmente, para o tempo de 24 horas também foi observado que os compostos-teste estimularam a liberação de LDH em 60%, além de induzirem alterações morfológicas características de morte celular, a fragmentação do DNA em 21%, a distribuição de até 56% das células nas fases G₂/M, e promoverem um aumento na respiração basal concomitantemente a um aumento dos níveis de lactato no meio de cultura em até 50% e 26%, respectivamente. Os resultados destacam diferentes efeitos promovidos pelos derivados trifluormetilados de selenilindóis e tiofenilindóis em um modelo *in vitro* de hepatocarcinoma e encorajam estudos posteriores visando aprofundar o conhecimento sobre o mecanismo de ação anticâncer destes compostos.

Palavras-chave: Câncer. Organosselênio. Organo enxofre. Compostos indólicos. Selenilindóis. Tiofenilindóis. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is a group of more than 100 extraordinarily complex diseases, which is responsible for millions of deaths worldwide every year. Despite the therapeutic options available, the research for novel substitute or complementary treatments is still required. In this sense, different synthetic compounds, such as organoselenium, organosulfur and indolic compounds, are studied regarding their antitumoral effects and many have displayed promising results. Although selenylindoles and thiophenylindoles have been previously described as having antidepressant and antiatherogenic effects, they were not studied in the tumor context thus far. Therefore, this project intended to evaluate the potential cytotoxic activity of fifteen 2- and 3-selenylindoles and thiophenylindoles compounds in a tumor cell model. The hepatocarcinoma HepG2 cells and the two trifluoromethylated derivatives were chosen as the cell model and the compounds with the highest cytotoxic potential, respectively, using a cell viability assay screening. The cytotoxicity of these compounds was confirmed in additional assays, including an increase of up to 95% in the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme release, the induction of cell death evaluated by flow cytometry (~57% of cells stained with annexin V and/or propidium iodide), an over 2-fold increase in intracellular reactive oxygen species levels and up to a 3-fold decrease in intracellular ATP levels after 48h. Moreover, it was also observed that the test compounds stimulated LDH release in 60% after 24h, while also promoted typical death-related changes in cell morphology, induced 21% of DNA fragmentation and up to 56% of cells at the G₂/M phases of the cell cycle, and stimulated the basal respiration and increased the lactate levels on the culture medium in up to 50% and 26%, respectively. The results highlight different effects promoted by the trifluoromethylated selenylindoles and thiophenylindoles in an *in vitro* hepatocarcinoma model and encourage further studies aiming to expand the knowledge of their anticancer mechanisms.

Keywords: Cancer. Organoselenium. Organosulfur. Indole compounds. Selenylindoles. Thiophenylindoles. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

FIGURA 1	–	FLUXOGRAMA DE ESTRATÉGIA DE TRABALHO EXPERIMENTAL	20
FIGURA 2	–	DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA	22
FIGURA 3	–	AS MARCAS REGISTRADAS DO CÂNCER	25
QUADRO 1	–	EXEMPLOS DE QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS UTILIZADOS NA CLÍNICA	33
FIGURA 4	–	ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO EBSELEN	37
QUADRO 2	–	EXEMPLOS DA VARIEDADE DE CLASSES DE COMPOSTOS DE SELÊNIO COM ATIVIDADES CITOTÓXICAS E ANTITUMORAIS DESCRITAS	39
FIGURA 5	–	EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-30 A EQ-34 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS MCF-7	47
FIGURA 6	–	EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-35 A EQ-39 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS MCF-7	48
FIGURA 7	–	EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-40 A EQ-44 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS MCF-7	49
FIGURA 8	–	EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-30 A EQ-34 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HepG2	52
FIGURA 9	–	EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-35 A EQ-39 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HepG2	53
FIGURA 10	–	EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-40 A EQ-44 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HepG2	54
FIGURA 11	–	VISÃO GERAL DOS EFEITOS DOS DERIVADOS TRIFLUORMETILADOS SOBRE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA	88

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1	–	CHEMICAL STRUCTURES OF THE 2- AND 3-SELENYLINDOLES AND THIOPHENYLINDOLES EVALUATED IN THE STUDY	65
FIGURE 2	–	EFFECTS OF EQ-34 AND EQ-41 ON THE CELL VIABILITY OF HEPATOCARCINOMA CELLS	66
FIGURE 3	–	INFLUENCE OF EQ-34 AND EQ-41 ON THE RELEASE OF LDH BY HEPATOCARCINOMA CELLS	67
FIGURE 4	–	MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HepG2 CELLS INCUBATED WITH EQ-34 AND EQ-41 AND STAINED WITH HEMATOXYLIN AND EOSIN	68
FIGURE 5	–	CELL DEATH EVALUATION BY ANNEXIN V AND PROPIDIUM IODIDE STAINING ASSAY	69
FIGURE 6	–	ROS LEVELS IN HEPATOCARCINOMA CELLS FOLLOWING INCUBATION WITH EQ-34 AND EQ-41	70
FIGURE 7	–	EFFECTS OF EQ-34 AND EQ-41 ON THE CELL CYCLE DISTRIBUTION OF HepG2 CELLS AND DNA FRAGMENTATION LEVELS	71
FIGURE 8	–	EFFECTS OF EQ-34 AND EQ-41 ON THE RESPIRATION OF HepG2 CELLS	72
FIGURE 9	–	LACTATE AND PYRUVATE LEVELS ON THE SUPERNATANT OF HepG2 CELLS INCUBATED WITH EQ-34 AND EQ-41	73
FIGURE 10	–	INTRACELLULAR ATP LEVELS OF HEPATOCARCINOMA CELLS INCUBATED WITH EQ-34 AND EQ-41	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES PRELIMINARES DE CC ₅₀ (μM) DOS COMPOSTOS EQ-34 E EQ-41 NAS LINHAGENS MCF-7 E HepG2 NOS TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE 48 E 72 H	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2HG	–	2-hidroxiglutarato
3D CRT	–	Radioterapia conformacional tridimensional
3PG	–	3-fosfoglicerato
ABVD	–	Regime quimioterápico composto por doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina
ADP	–	Adenosina difosfato
APC	–	Proteína polipose coli adenomatosa
ARF	–	Fator de ribosilação do ADP
ARID1A	–	Proteína domínio 1A de interação rica em adenina e timina
ATP	–	Adenosina trifosfato
CC ₅₀	–	Concentração citotóxica que promove a redução da viabilidade celular em 50%
CoA	–	Coenzima A
CTLA-4	–	Proteína associada ao linfócito T citotóxico 4
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
dTMP	–	Timidina monofosfato
EGFR	–	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERO	–	Espécies reativas de oxigênio
GLUTs	–	Transportadores de glucose
GSH	–	Glutationa na forma reduzida
GPx	–	Glutationa peroxidases
HIF-1 α	–	Fator induzível por hipóxia 1 α
H ⁺	–	Íons hidrogênio
HPV	–	Papilomavírus humano
IARC	–	Agência Internacional de Pesquisa no Câncer
IC ₅₀	–	Concentração inibitória que promove a redução de uma atividade biológica em 50%
IDH1	–	Isoforma 1 da enzima isocitrato desidrogenase
IDH2	–	Isoforma 2 da enzima isocitrato desidrogenase
IMRT	–	Radioterapia de intensidade modulada
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer

KDM	–	Histona lisina demetilases
LDH	–	Lactato desidrogenase
LDH-A	–	Isoforma A da enzima lactato desidrogenase
LPS	–	Lipopolissacarídeo
Mcl-1	–	Proteína de sequência 1 de leucemia de células mieloides
MCTs	–	Transportadores de monocarboxilatos
mTOR	–	Proteína alvo de mamíferos da rapamicina
MTT	–	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	–	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NF1	–	Neurofibromina 1
NF- κ B	–	Fator nuclear kappa B
P-gp	–	Glicoproteína P
PD-1	–	Proteína de morte programada 1
PD-L1	–	Ligante da proteína de morte programada 1
PDGFR- β	–	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas beta
PHGDH	–	Fosfoglicerato desidrogenase
PI	–	Iodeto de propídeo
PIK3CA	–	Fosfatidilinositol-3-quinase, subunidade alfa catalítica
PKM2	–	Isoforma M2 da enzima piruvato quinase
Pt	–	Platina
PTEN	–	Proteína fosfatase homóloga à tensina
RB1	–	Proteína do retinoblastoma 1
RET	–	Receptor do fator neurotrófico derivado de linhagem celular da glia
Se	–	Selênio
Sec	–	Selenocisteína
TET2	–	Proteína Tet metilcitosina dioxigenase 2
UV	–	Ultravioleta
VEGFR	–	Receptores de fator de crescimento vascular endotelial
WHO	–	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 CÂNCER	21
2.1.1 Definições gerais e epidemiologia	21
2.1.2 Características do câncer	23
2.1.3 Alterações metabólicas no câncer	25
2.1.4 Principais opções atuais de tratamento	30
2.2 COMPOSTOS DE SELÊNIO E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	34
2.2.1 Selênio e classes de compostos de selênio	35
2.2.2 Atividades biológicas de compostos de organosselênio	36
2.2.3 Atividades citotóxicas e antitumorais de compostos de organosselênio	37
2.3 ATIVIDADES CITOTÓXICAS E ANTITUMORAIS DE COMPOSTOS DE ORGANOENXOFRE	42
2.4 ATIVIDADES CITOTÓXICAS E ANTITUMORAIS DE COMPOSTOS CONTENDO A FRAÇÃO INDOL	43
3 RESULTADOS NÃO INCLUÍDOS NO ARTIGO	45
4 ARTIGO CIENTÍFICO	56
5 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) define câncer como “um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos” (INCA, 2020). Para o ano de 2040, a Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (IARC) prevê que ocorra um aumento considerável na incidência e na mortalidade dos casos destas doenças, com cerca de 29,5 milhões de novos diagnósticos (um aumento de aproximadamente 63% dos casos), ocasionando 16,4 milhões de mortes no mundo (IARC, 2020).

Estatisticamente, constata-se que a mortalidade ajustada por idade de muitos tipos de câncer permaneceu constante ou decresceu muito pouco ao longo dos anos. Desta maneira, apesar das terapias atualmente disponíveis para o tratamento do câncer (com destaque para a cirurgia, radioterapia e quimioterapia), sugere-se que o potencial máximo de cura utilizando terapias tradicionais em relação às malignidades de alto grau foi atingido, e um considerável progresso só poderá ser alcançado a partir do desenvolvimento de novos tratamentos (WEINBERG, 2014).

Neste contexto, diferentes compostos de origem natural ou sintética têm sido desenvolvidos e estudados quanto ao seu potencial no tratamento do câncer (SHARIFI-RAD et al., 2019). Dentre os compostos alvos de investigação como possíveis agentes terapêuticos, incluem-se os compostos de organosselênio e de organoenxofre.

Em um estudo de Banerjee e colaboradores (2018), por exemplo, os efeitos citotóxicos de selenocianatos e tiocianatos foram avaliados em linhagens de câncer de mama, e os autores observaram que os selenocianatos foram capazes de promover efeitos antiproliferativos, de indução de apoptose, inibição de migração e alteração na progressão do ciclo celular no modelo celular utilizado. Estas mesmas classes de compostos também se destacaram como promissoras em um estudo que avaliou a citotoxicidade de 27 compostos com diferentes anéis heterocíclicos contendo selênio e enxofre em células de câncer de mama MCF-7 e próstata PC-3 (ALCOLEA et al., 2016a), enquanto selenoureias e tioureias demonstraram atividade citotóxica e de indução de morte celular por apoptose em diferentes linhagens celulares, como de melanoma, câncer de pulmão, próstata, colorretal e pancreático (ALCOLEA et al., 2016b).

Além destas linhagens, as células de hepatocarcinoma HepG2 também foram objeto de estudo da toxicidade de compostos de organosselênio e de organo enxofre. Shi e colaboradores (2012) demonstraram uma redução significativa na viabilidade destas células quando incubadas com derivados benzotiazóis-2-tióis em concentrações na ordem de nanomolar. Shaaban e colaboradores (2019), por sua vez, observaram efeitos sobre a viabilidade utilizando baixas concentrações de múltiplos compostos de organosselênio, que apresentaram altos valores de índice de seletividade, isto é, de baixa toxicidade para células não tumorais e alta toxicidade para células tumorais. Assim, compostos de organosselênio e organo enxofre têm despertado a atenção da comunidade científica quanto ao seu potencial anticâncer.

1.1 JUSTIFICATIVA

A disponibilidade limitada de tratamentos para muitos tipos de câncer, a quantidade de efeitos adversos associados com a radioterapia e os agentes quimioterápicos convencionais, assim como as características das células tumorais que dispõem de inúmeros mecanismos de resistência a estas opções terapêuticas (GEGECHKORI; HAINES; LIN, 2017; WANG; ZHANG; CHEN, 2019), tornam urgente o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam efetivos e apresentem menos efeitos colaterais. Os compostos de organosselênio e de organo enxofre englobam uma variedade de substâncias, muitas das quais tiveram suas atividades citotóxicas e antitumorais descritas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (MORIARTY; NAITHANI; SURVE, 2007; GANDIN et al., 2018; CHEN et al., 2020) e apresentam, portanto, um significativo potencial terapêutico.

Métodos de síntese mais rápidos, econômicos e sustentáveis vêm sendo desenvolvidos na área de síntese orgânica (LUZ et al., 2019). Neste contexto, muitos compostos de organosselênio e de organo enxofre, como os pertencentes às classes dos 2- e 3- selenilindóis e tiofenilindóis, foram sintetizados e algumas de suas atividades biológicas estudadas (CASARIL et al., 2017a; CASARIL et al., 2017b; VIEIRA et al., 2017; LUZ et al., 2019). Entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura explorando os potenciais efeitos citotóxicos e/ou antitumorais destes compostos.

Diferentes abordagens são consideradas na busca por novos tratamentos contra o câncer, com destaque para aquelas que exploram as particularidades das células tumorais, incluindo terapias direcionadas para o metabolismo diferencial apresentado por elas (YOSHIDA, 2015; LI et al., 2016; LUENGO; GUI; VANDER HEIDEN, 2017), ou que visem a indução de estresse oxidativo, explorando o fato de que as células tumorais geralmente apresentam níveis mais elevados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011). Além disto, compostos que interferem na progressão do ciclo celular também surgem como importantes opções terapêuticas, tanto na monoterapia quanto na combinação de diferentes agentes (BAI; LI; ZHANG, 2017).

Desta maneira, considerando que efeitos citotóxicos variados englobam a ação das drogas com atividade anticâncer, torna-se necessária a investigação prévia dos efeitos gerais associados com a citotoxicidade promovida por estas substâncias, visando resultados que direcionem para estudos futuros dos mecanismos moleculares de uma possível atividade antitumoral.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos citotóxicos de compostos da classe dos 2- e 3- selenilindóis e tiofenilindóis em células de câncer de mama MCF-7 e de hepatocarcinoma HepG2.

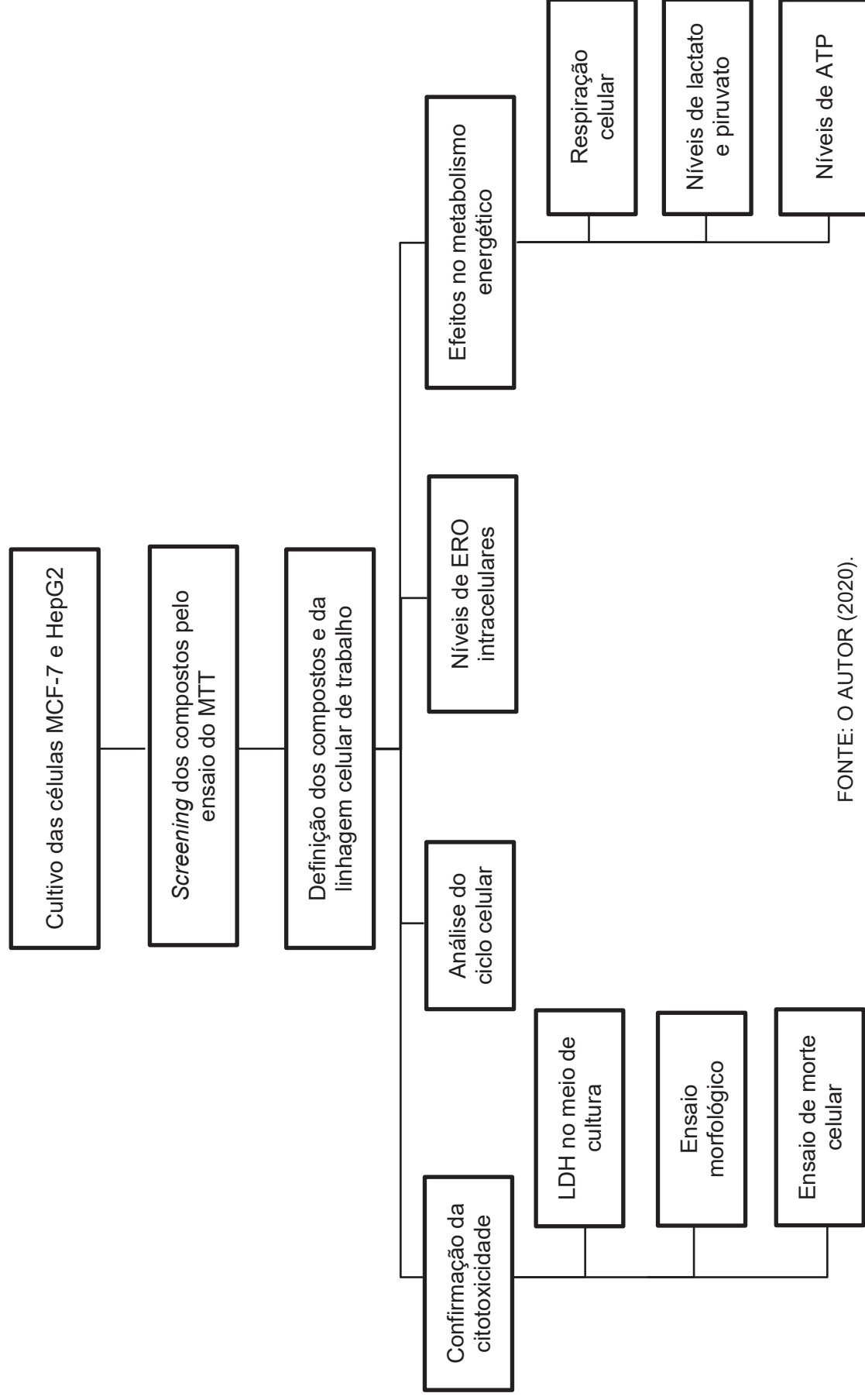
1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar, dentre um conjunto de 15 compostos, os mais citotóxicos, através de ensaios de viabilidade celular, bem como definir qual linhagem é mais sensível, que será utilizada para alcançar os objetivos subsequentes;
- ✓ Avaliar se os compostos selecionados são capazes de interferir na progressão do ciclo celular e confirmar se podem induzir a morte celular;
- ✓ Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares após a exposição aos compostos-teste;

- ✓ Investigar os efeitos dos compostos selecionados sobre o metabolismo energético celular.

O cumprimento dos objetivos descritos foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado a seguir na Figura 1.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE ESTRATÉGIA DE TRABALHO EXPERIMENTAL



FONTE: O AUTOR (2020).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

2.1.1 Definições gerais e epidemiologia

Câncer, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), é a denominação dada a um grande grupo de doenças que podem afetar basicamente qualquer órgão ou tecido do organismo, em que células crescem de maneira descontrolada, podendo invadir outras partes do corpo (em um processo conhecido como “metástase”) (WHO, 2020a). Diferentes denominações são atribuídas para os tipos de câncer dependendo do tecido do qual ele se origina. Como exemplo, se são originados de tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Caso a origem seja a partir de tecidos conjuntivos, como ossos, músculos e cartilagens, é dada a denominação de sarcomas (INCA, 2020).

A mais recente estimativa mundial aponta que somente no ano de 2018 ocorreram no mundo aproximadamente 18,1 milhões de novos casos de câncer, levando cerca de 9,6 milhões de pessoas a óbito. Como consequência, o câncer constitui uma das principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos) em mais da metade dos países (BRAY et al., 2018) e a segunda principal causa de morte mundial (FITZMAURICE et al., 2017), o que representou um custo estimado em aproximadamente US\$ 1,16 trilhões de dólares somente no ano de 2010 (STEWART; WILD, 2014).

No caso específico do Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) projetou para o triênio de 2020-2022 aproximadamente 625 mil novos casos de câncer (ou 450 mil, desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma) no país por ano. Dentre estes, o mais incidente será o câncer de pele não melanoma (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil), conforme representado na Figura 2, que evidencia a estimativa dos tipos de câncer mais incidentes para os dois sexos no ano de 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	18.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019).

A prevenção primária do câncer, que envolve os fatores de risco modificáveis, é a maneira mais eficaz de combate contra a doença (VINEIS; WILD, 2014). Estima-se, como exemplo, que na Europa até cerca de metade dos casos de câncer sejam preveníveis (SCHÜZ et al., 2015), e que na Austrália aproximadamente 38% do total de casos de câncer estejam diretamente relacionados com estes fatores modificáveis (WILSON et al., 2018).

Os fatores de risco envolvem tanto a exposição a agentes físicos, químicos e biológicos, como os estilos de vida e comportamentos modificáveis de uma população (SCHÜZ; ESPINA; WILD, 2019). A WHO lista como os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer o uso e exposição ao tabaco, o sedentarismo, a dieta inadequada, o sobrepeso e/ou obesidade, o uso de álcool, infecções (de agentes como *Helicobacter pylori*, papilomavírus humano ou HPV, vírus Epstein-Barr, e os vírus da hepatite B e C), além da exposição à poluição ambiental, a carcinógenos ocupacionais e à radiação (WHO, 2020b).

A incidência e mortalidade do câncer entre diferentes países, bem como dentro de um mesmo país, varia consideravelmente considerando os perfis socioeconômicos (VINEIS; WILD, 2014). Isto reflete diretamente na proporção desigual dos tipos de tumores mais comuns entre populações distintas. Como exemplo, países que se encontram atualmente em transição econômica exibem tipos de tumores que são mais frequentes em países altamente desenvolvidos, como o câncer de mama, próstata, pulmão e colorretal. Em contraste, países de baixo ou médio desenvolvimento apresentam em maior proporção outros tipos de câncer que

não são tão frequentes em países de alta renda, como o câncer cervical e câncer de fígado (STEWART et al., 2016).

2.1.2 Características do câncer

Em termos bioquímicos, o câncer pode ser considerado o resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que afetam vias celulares responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e morte celular. As alterações genéticas podem ocorrer tanto em regiões codificantes do DNA como em elementos regulatórios, sendo geralmente mutações localizadas, e adicionalmente podem também envolver amplificações, deleções e translocações. As modificações epigenéticas, por sua vez, incluem a metilação aberrante do DNA, as modificações pós-traducionais em histonas e mudanças na composição e/ou organização da cromatina. Como resultado, as células tumorais apresentam desregulações na expressão gênica, que podem ser tanto do tipo “ganho de função” quando envolvem oncogenes, como do tipo “perda de função” quando envolvem genes supressores tumorais (BAYLIN; JONES, 2016; TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019; TEH; FEARON, 2020).

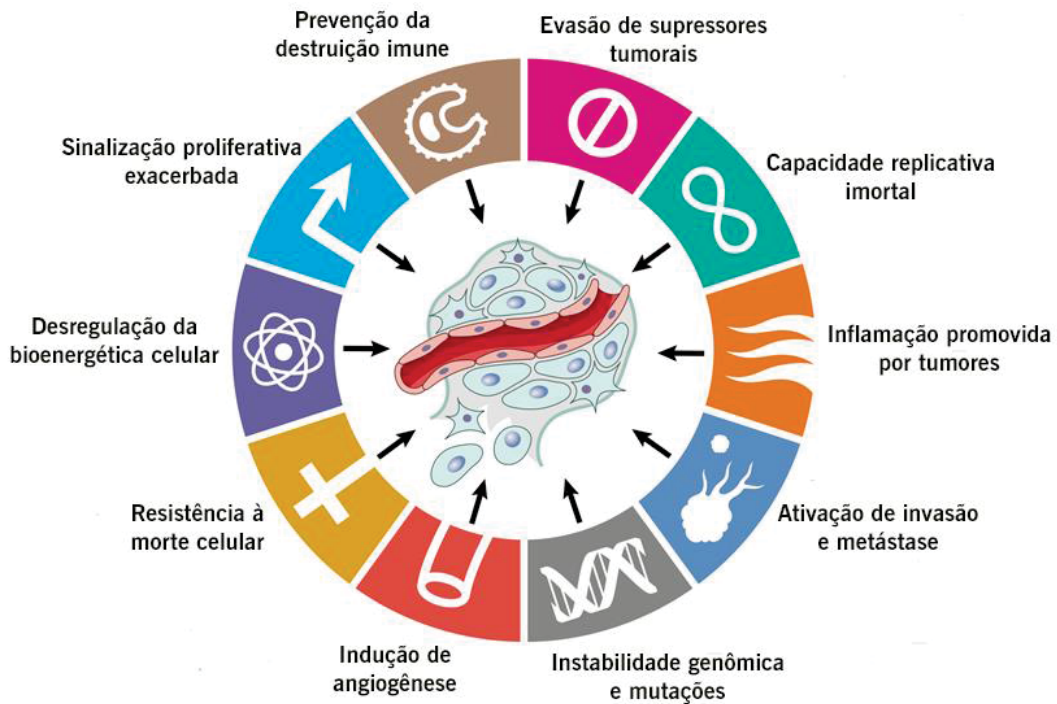
As alterações genéticas podem ser induzidas por diversos fatores, como o envelhecimento, agentes mutagênicos (ex: acetaldeído, aflatoxinas, benzo[a]pireno), radiação, luz ultravioleta (UV) e espécies reativas de oxigênio, sendo que o envelhecimento é o principal fator, uma vez que todos os indivíduos acumulam mutações somáticas ao longo da vida. De maneira similar, o envelhecimento também contribui para o acúmulo de alterações epigenéticas, assim como outros fatores ambientais e fisiológicos, como a inflamação crônica (BAYLIN; JONES, 2016; TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019). Considerando que a tumorigênese e a transformação maligna são processos que envolvem múltiplas etapas sequenciais, evoluindo de um estado hiperproliferativo inicial para tumores benignos e malignos à medida em que ocorre um aumento progressivo da instabilidade genética e epigenética celular, algumas alterações já estão presentes em células normais ou pré-cancerígenas muito antes do desenvolvimento do câncer em si (ALBERTS et al., 2015; PUISIEUX et al., 2018; TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019).

Os dados mais recentes apontam para mutações nas regiões codificantes de 719 diferentes genes (SONDKA et al., 2018) e para pelo menos 193 mutações em regiões não codificantes do DNA responsáveis pelo controle da expressão gênica (ZHANG et al., 2018a) como potencialmente implicadas no desenvolvimento do câncer. Dentre os múltiplos genes envolvidos, podem ser citados como alguns dos mais recorrentes em diversos tipos de câncer: os oncogenes que codificam as proteínas RAS, PIK3CA, EGFR, RAF, β -catenina, IDH1 e MYC, e os genes supressores tumorais que codificam as proteínas p53, p16^{Ink4a}, ARF, RB1, PTEN, APC, NF1 e ARID1A (TEH; FEARON, 2020).

Coletivamente, o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas resulta em mudanças fenotípicas que caracterizam o estado altamente proliferativo da célula tumoral. Hanahan e Weinberg (2011) listam dez características, conhecidas como “marcas registradas” do câncer, que definem os principais fenótipos que são comumente apresentados ou podem vir a ser apresentados pelas células tumorais, e que estão representados na Figura 3. São estas: a sinalização proliferativa exacerbada, a evasão de supressores tumorais, a resistência à morte celular, a capacidade replicativa imortal, a indução de angiogênese, a ativação de invasão e metástase (as seis marcas registradas clássicas, descritas desde o ano 2000), a instabilidade genômica e alta taxa de mutações, a inflamação associada ao tumor, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imune (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Atualmente, grande importância tem sido dada ao microambiente tumoral, isto é, aos elementos celulares (incluindo fibroblastos, miofibroblastos, células-tronco mesenquimais, adipócitos, células endoteliais, linfócitos infiltrantes e macrófagos residentes) e não celulares (componentes da matriz extracelular e fatores solúveis, como citocinas e fatores de crescimento) que compõem o ambiente imediato em que as células tumorais estão localizadas (OUDIN; WEAVER, 2016). A composição do microambiente tumoral tem papel fundamental em diversos aspectos da biologia da célula tumoral, incluindo: o crescimento tumoral, a indução de angiogênese, interações com o sistema imune, a invasão e formação de metástases e a resposta e/ou resistência ao tratamento, em que cada um dos elementos do microambiente tumoral desempenha uma função específica (ANARI; RAMAMURTHY; ZIBELMAN, 2018).

FIGURA 3 – AS MARCAS REGISTRADAS DO CÂNCER



FONTE: Modificado de HANAHAN; WEIBERG (2011) e KUMAR; ABBAS; ASTER (2017), com autorização de uso pelo Elsevier and Copyright Clearance Center (número de licença 4797190803421) e Elsevier Rights and Permissions (ESL) (ID de submissão 996747).

A metástase, ou seja, o processo de múltiplas etapas envolvendo a disseminação de células cancerígenas de tumores primários e o estabelecimento subsequente de novas colônias tumorais em tecidos distantes, é uma das características mais relevantes que pode ser adquirida por células tumorais e que merece destaque em particular. Isto porque, apesar dos avanços na compreensão, no diagnóstico e no tratamento do câncer, a maior parte (cerca de 90%) das mortes associadas com o câncer está relacionada com o processo de metástase e não ao tumor primário (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

2.1.3 Alterações metabólicas no câncer

Conforme descrito no item anterior, a desregulação do metabolismo é uma das características do câncer, e para que possam manter o estado altamente proliferativo, as células tumorais devem ativar e controlar diversas vias metabólicas. Estas vias metabólicas utilizam os nutrientes disponíveis para gerar precursores

metabólicos para vias anabólicas, satisfazer a demanda de energia celular e manter o equilíbrio redox da célula. Os aminoácidos, o acetil-CoA, e as purinas e pirimidinas devem ser sintetizados *de novo* a partir de diferentes nutrientes, de modo a atender as necessidades específicas da célula tumoral (VAZQUEZ et al., 2016).

Do ponto de vista terapêutico, o metabolismo diferencial das células tumorais oferece estratégias diversificadas de tratamento (LUENGO; GUI; VANDER HEIDEN, 2017). Entretanto, a via metabólica alterada e, conseqüentemente, a possível estratégia terapêutica, depende de cada tipo de tumor. Em alguns casos, as alterações metabólicas são fundamentais nos passos iniciais da tumorigênese, período no qual o tumor nascente está mais sujeito a limitações nutricionais. Em contrapartida, em outras situações o metabolismo alterado pode ser dispensável para o desenvolvimento dos tumores primários, mas essencial para o processo de metástase (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016).

2.1.3.1 O efeito Warburg

Dentre as principais alterações no metabolismo das células tumorais, destaca-se o conhecido “efeito Warburg”, inicialmente observado pelo cientista Otto Warburg e seus colaboradores em 1924. Os pesquisadores verificaram que células tumorais, assim como outras células altamente proliferativas, consomem muito mais glicose do que as demais células, mesmo na presença de oxigênio e mitocôndrias funcionais. A produção de altos níveis de piruvato e lactato mesmo na presença de oxigênio é conhecida como glicólise aeróbica (LIBERTI; LOCASELE, 2016; LEBELO; JOUBERT; VISAGIE, 2019).

Embora o efeito Warburg possa inicialmente parecer contraprodutivo por favorecer um mecanismo menos eficiente de produção de energia no que se refere à quantidade de ATP produzida em comparação ao processo de fosforilação oxidativa, ele decorre de uma complexa reprogramação metabólica que favorece a manutenção do estado proliferativo em células tumorais (LI et al., 2016).

Alguns dos possíveis efeitos benéficos do efeito Warburg para a célula tumoral incluem: (1) a possibilidade de uma rápida produção de ATP, mesmo que em quantidade muito menor por molécula de glicose; (2) o desvio do excesso de carbono para vias anabólicas de síntese de nucleotídeos, lipídeos e proteínas,

essenciais para sustentar o crescimento descontrolado; (3) a acidificação do meio extracelular através do transporte de lactato (via transportadores de monocarboxilatos ou MCTs) e íons H^+ , promovendo um microambiente tumoral favorável à tumorigênese, invasividade e resistência a drogas; (4) a modulação dos níveis redox celulares (LIBERTI; LOCASELE, 2016; LEBELO; JOUBERT; VISAGIE, 2019).

As altas taxas glicolíticas apresentadas pelas células tumorais são garantidas pela ativação de inúmeros fatores de transcrição, como o oncogene c-Myc, o NF- κ B e o fator induzível de hipóxia 1α (HIF- 1α), e pela repressão do supressor tumoral p53, que regulam a expressão de múltiplas enzimas metabólicas (DE LA CRUZ-LÓPEZ et al., 2019), além de contribuírem para o aumento da expressão de transportadores de glucose (GLUTs) (ZAAL; BERKERS, 2018). Como resultado, a concentração de lactato gerada por células tumorais pode ser até 40 vezes maior do que a produzida por células normais (SAN-MILLÁN; BROOKS, 2017).

Os vários papéis do lactato são extensivamente revisados na literatura. Este metabólito é capaz de promover o aumento da expressão de uma série de receptores, ativar a transcrição de centenas de genes e estimular a liberação de citocinas inflamatórias, contribuindo para os processos de angiogênese, motilidade e crescimento tumoral, bem como para a evasão do sistema imune, que é favorecida pelo ambiente de acidose extracelular (HIRSCHHAUESER; SATTLER; MUELLER-KLIESER, 2011; DHUP et al., 2012; COLEGIO et al., 2014; SAN-MILLÁN; BROOKS, 2017). Além disto, a redução no pH do microambiente tumoral em decorrência do aumento da concentração deste metabólito contribui com a fisiologia dos processos de liberação e captação de exossomos (microvesículas contendo assinaturas funcionais das células de origem, envolvidas nos processos de carcinogênese e metástase) e de fusão de bolhas apoptóticas liberadas de células tumorais, formando estruturas conhecidas como *blebbishields*, que podem gerar esferas de células-tronco tumorigênicas implicadas na recorrência do câncer e resistência quimioterápica (PAROLINI et al., 2009; JINESH et al., 2013).

Finalmente, o lactato pode também ser utilizado como fonte energética pelas células tumorais, sendo oxidado a piruvato na mitocôndria, provendo autossuficiência à célula tumoral. Como consequência, altos níveis de lactato e da expressão de isoformas específicas da enzima lactato desidrogenase (LDH) estão associados com

um prognóstico menos favorável em diversos tipos de câncer (DE LA CRUZ-LÓPEZ et al., 2019; GOODWIN et al., 2019). Estas observações experimentais ressaltam a importância do lactato como um metabólito crítico para diversas funções desempenhadas pelas células tumorais.

2.1.3.2 Outras alterações no metabolismo

Ainda que muito reste a ser elucidado acerca das vias metabólicas alteradas na célula cancerígena, há atualmente um amplo conhecimento de diversos elementos que caracterizam a reprogramação metabólica no câncer. Esta reprogramação requer regulação a nível transcricional mediada por oncogenes e genes supressores tumorais mutados, e não controla apenas as necessidades nutricionais celulares, mas tem papel em processos tumorais essenciais, como a migração, invasão e metástase (FREZZA et al., 2020). Há na literatura extensas revisões referentes ao assunto e às potenciais abordagens terapêuticas que exploram o metabolismo tumoral (VAZQUEZ et al., 2016; LUENGO; GUI; VANDER HEIDEN, 2017; SUN et al., 2018). No presente tópico, serão abordados aspectos da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e da glutaminólise.

Como consequência da glicólise aeróbica, há uma maior disponibilidade de diferentes intermediários glicolíticos, como o piruvato, que pode originar acetil-CoA e, indiretamente, os aminoácidos aspartato e asparagina. Além disto, a glucose-6-fosfato em excesso pode ser desviada para a via das pentoses fosfato, fundamental para a síntese de nucleotídeos e geração de NADPH. O acúmulo de 3-fosfoglicerato (3PG), por sua vez, garante a síntese de serina através da ação inicial da enzima fosfoglicerato desidrogenase (PHGDH), aminoácido que pode ser utilizado na biossíntese de timidina monofosfato (dTMP) e purinas (VAZQUEZ et al., 2016).

Células tumorais possuem diferentes isoformas de algumas importantes enzimas glicolíticas. Em destaque, a isoforma M2 da enzima piruvato quinase (PKM2) é altamente expressa em diversos tipos tumorais, porém diferencialmente regulada. Como consequência, também apresenta menor atividade, o que permite que intermediários glicolíticos sejam desviados para outras vias metabólicas críticas para a sobrevivência da célula neoplásica (DAYTON; JACKS; VANDER HEIDEN, 2016). Outras isoformas preferencialmente expressas no câncer incluem a hexoquinase 2,

que também apresenta maior atividade em alguns tumores (MATHUPALA; KO; PEDERSEN, 2009), e a isoforma A da lactato desidrogenase (LDH-A) (FENG et al., 2018), que é superexpressa em diversos tipos de câncer, e foi o primeiro alvo descrito do oncogene Myc (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016).

No que se refere ao ciclo do ácido cítrico, mutações nas isoformas 1 e 2 da enzima isocitrato desidrogenase (IDH1 e IDH2) também são frequentemente encontradas em cânceres como o glioma e a leucemia mieloide aguda, e ocasionam um acúmulo de 2-hidroxiglutarato (2HG), produzido a partir da conversão de α -cetoglutarato em 2HG com o consumo de NADPH. O 2HG é um importante oncometabólito que, dentre outras funções, é capaz de atuar como um modulador epigenético pró-tumoral, através da inibição de enzimas histona lisina demetilases (KDM) e 5-metil citosina hidroxilase (TET2), dependentes de α -cetoglutarato. Como resultado, vias de sinalização oncogênicas como da proteína alvo de mamíferos da rapamicina (mTOR) são ativadas, favorecendo o metabolismo tumoral (CARBONNEAU et al., 2016; CLARK; YEN; MELLINGHOFF, 2016).

Em alguns tumores, as enzimas mitocondriais succinato desidrogenase e fumarase (consideradas supressoras tumorais) também têm sua função comprometida, resultando no acúmulo de succinato e fumarato. Estes dois metabólitos são capazes de inibir a atividade enzimática de dioxigenases dependentes de α -cetoglutarato, responsáveis pela hidroxilação de HIF-1 α . Consequentemente, o fator de transcrição HIF-1 α pode ser ativado mesmo em condições de normóxia, resultando em um estado identificado como pseudohipóxia, favorável à angiogênese (VAZQUEZ et al., 2016). A ativação de HIF-1 α também contribui para o aumento de expressão de genes que estimulam a glicólise, ao passo em que inibe indiretamente a piruvato desidrogenase (GOLIAS et al., 2016).

A glutaminólise também se destaca como uma das principais vias anapleróticas responsáveis por manter a atividade do ciclo do ácido cítrico, através da produção de α -cetoglutarato a partir de glutamina. O glutamato gerado a partir da glutamina também pode ser convertido à glutationa (GSH) e contribuir para o balanço redox, ou ser destinado para a síntese dos aminoácidos aspartato e prolina (ZAAL; BERKERS, 2018). Tendo em vista que a glutamina é o segundo principal nutriente consumido por células tumorais, a expressão de glutamina sintase, enzima responsável por sua síntese, parece ser crucial para a manutenção de alguns tipos

de tumores, como o carcinoma hepatocelular. Para alguns tipos de câncer, a dependência da glutamina é tão grande que esta característica passou a ser conhecida como “vício em glutamina” (VAZQUEZ et al., 2016; STILL; YUNEVA, 2017; ZAAL; BERKERS, 2018).

2.1.4 Tratamento

A escolha e o sucesso do tratamento para um determinado tipo de câncer dependem, primeiramente, do diagnóstico correto e idealmente precoce da doença. Tumores de grau intermediário, que têm o potencial de se tornarem metastáticos com o decorrer do tempo, devem ter seu subtipo corretamente discriminado por meio de análise histopatológica e, em alguns casos, a análise de marcadores moleculares, para o sucesso da intervenção terapêutica. Entretanto, a identificação precisa de quais tumores de fato constituem risco à vida do paciente é um grande desafio na clínica. Neste contexto, novas tecnologias, como análises de expressão gênica e bioinformática, podem ser empregadas para tal finalidade, visando a realização de terapias individualizadas para cada paciente, porém seu uso ainda ocorre de maneira muito limitada (WEINBERG, 2014).

Dentre as principais opções de tratamento, atualmente as três mais utilizadas (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) ainda são as mesmas desenvolvidas no século passado, e consolidadas na década de 70. Este uso continuado se justifica pelo fato de que estas estratégias terapêuticas são eficazes em erradicar certos tipos de tumores, embora tenham sido desenvolvidas em uma época em que não havia conhecimento detalhado acerca dos mecanismos genéticos e bioquímicos da carcinogênese e da biologia da célula tumoral. Entretanto, o potencial máximo destas terapias tradicionais na cura de malignidades parece ter sido atingido, e um progresso futuro depende apenas do desenvolvimento de novas terapias (WEINBERG, 2014).

2.1.4.1 Cirurgia e radioterapia

A cirurgia é o tratamento primário mais utilizado na terapia anticâncer no caso de tumores sólidos. Estima-se que mais de 80% dos casos de câncer requerem

cirurgia e, com frequência, mais de uma. Muitas vezes, a ressecção cirúrgica por si só é capaz de garantir o controle local do tumor primário para os tipos de tumores sólidos mais comuns, como o de mama e cólon, porém o potencial curativo é consideravelmente aumentado quando há combinação com outra estratégia terapêutica. Além disto, sua eficácia é maior quando realizada apenas em cânceres em estágios iniciais ou localizados (BENJAMIN, 2014; DARE et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015), e caso as células cancerígenas não sejam completamente removidas, a presença de uma única célula pode formar um novo tumor e se espalhar para outras partes do organismo (WANG; LEI; HAN, 2018).

Apesar de ser o tipo de terapia mais acessível e de menor custo, a acessibilidade em países de baixa renda ainda é falha, e estima-se que 2 bilhões de pessoas não tenham acesso a nenhum tipo de cirurgia básica, incluindo cirurgia para o câncer (FUNK et al., 2010). Além da finalidade curativa, a cirurgia também pode ter finalidades preventiva, diagnóstica, paliativa e reconstrutiva no contexto do câncer (SULLIVAN et al., 2015).

A radioterapia, por sua vez, estabeleceu-se no final do século 19 com a descoberta dos raios X por Becquerel e Rontgen, e desde então se consolidou como a base do tratamento de tumores sólidos em conjunto com a cirurgia. Atualmente, é utilizada como tratamento adjuvante de tumores localizados, bem como no controle local e alívio dos sintomas de cânceres mais avançados, incluindo o câncer de mama, próstata, cérvix, cabeça e pescoço, pulmão, cérebro e sarcomas. Apesar da necessidade de investimento em instalações e equipamentos, a radioterapia ainda assim constitui uma das terapias de maior custo-benefício (ARRUEBO et al., 2011; JAFFRAY; GOSPODAROWICZ, 2015).

Considerando que a radiação afeta tanto tecidos normais como tumorais, é fundamental que a dose administrada seja meticulosamente calculada. Novas tecnologias, como a radioterapia conformacional tridimensional (3D CRT) e radioterapia de intensidade modulada (IMRT) foram desenvolvidas com este propósito, permitindo o uso de altas doses de radiação de maneira mais precisa e uma maior probabilidade de erradicação tumoral, especialmente naquelas áreas em que o tecido adjacente é particularmente suscetível e tem baixa tolerância à radiação (JAFFRAY; GOSPODAROWICZ, 2015).

2.1.4.2 Quimioterapia antineoplásica

Com relação à quimioterapia antineoplásica, o primeiro agente quimioterápico data de 1943, quando o gás mostarda (cujos efeitos na Primeira e Segunda Guerras Mundiais haviam sido observados) foi empregado no tratamento de linfomas. Desde então, muitas outras drogas passaram a ser desenvolvidas, como os agentes alquilantes ciclofosfamida e clorambucila, e os antagonistas de folato aminopterina e metotrexato (ARRUEBO et al., 2011). Atualmente, há uma variedade de agentes quimioterápicos disponíveis pertencentes a diferentes classes, incluindo: agentes alquilantes, antimetabólicos e análogos do ácido fólico, purinas e pirimidinas, produtos naturais, hormônios e antagonistas de hormônios, além de uma série de agentes direcionados a alvos moleculares específicos, como resultados de estudos bioquímicos envolvendo o *design* de moléculas altamente específicas para alvos proteicos (CHABNER et al., 2011; WEINBERG, 2014).

Alguns exemplos de quimioterápicos antineoplásicos utilizados na clínica estão listados a seguir no Quadro 1, que demonstra a variedade de classes químicas destes compostos, de seus mecanismos de ação e seus usos clínicos.

São utilizados com frequência protocolos com associações de diferentes agentes quimioterápicos, que geralmente combinam fármacos que possuem diferentes mecanismos de ação, com a finalidade de maximizar a resposta terapêutica através de ações complementares e sinérgicas. Um exemplo de regime terapêutico envolvendo a associação de quimioterápicos antineoplásicos é o regime de acrônimo ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina), utilizado no tratamento do linfoma de Hodgkin, que combina um intercalante do DNA, um agente indutor de quebra do DNA, um antagonista de microtúbulos e um agente alquilante (WEINBERG, 2014).

Para o tratamento do carcinoma hepatocelular, por exemplo, são utilizados como quimioterápicos por via oral o sorafenibe, lenvatinibe, regorafenibe e outros medicamentos que são, em sua maioria, inibidores de múltiplas enzimas quinases associadas com vias de sinalização celular implicadas na proliferação tumoral e angiogênese, como o B-Raf, C-Raf, os receptores de fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR), o receptor do fator neurotrófico derivado de linhagem celular da glia (RET) e o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas beta (PDGFR- β) (YAMAMOTO; KONDO, 2018).

QUADRO 1 – EXEMPLOS DE QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS UTILIZADOS NA CLÍNICA

Nome	Classe	Mecanismo de ação	Exemplos de usos clínicos
Cisplatina	Complexo de coordenação de Pt	Agente alquilante do DNA	Câncer testicular, de ovário, bexiga, cabeça e pescoço e outros
Doxorrubicina	Antibiótico	Agente intercalante, inibe a topoisomerase	Sarcomas, leucemia aguda, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de mama, tireóide, pulmão e estômago, neuroblastoma e outros
Vinblastina	Alcaloide da vinca	Inibição da formação de microtúbulos	Doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer testicular
6-mercaptopurina	Análogo de purinas	Inibição da biossíntese de purinas	Leucemia linfocítica aguda, leucemia mielogênica, linfoma não Hodgkin de pequenas células
Metotrexato	Análogo do ácido fólico	Inibição da formação de tetrahydrofolato	Leucemia linfocítica aguda, câncer de mama, câncer de bexiga, linfomas
Ciclofosfamida	Derivado do gás mostarda	Agente alquilante do DNA	Leucemia linfocítica aguda e crônica, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplo, neuroblastoma, câncer de mama, ovário, pulmão, cérvix e testicular, tumor de Wilms
Temozolomida	Triazeno	Agente alquilante do DNA	Gliomas malignos
Hidroxiureia	Ureia substituída	Inibição da formação de desoxirribonucleotídeos	Leucemia mielogênica crônica, policitemia vera e trombocitemia essencial
Irinotecano	Camptotecina	Inibição da topoisomerase	Carcinoma colorretal
Tamoxifeno	Antagonista hormonal	Ação antiestrogênica	Câncer de mama
Bortezomibe	Análogo de peptídeo	Inibição do proteossoma	Mieloma múltiplo
L-asparaginase	Enzima	Inibição da síntese proteica	Leucemia linfocítica aguda
Everolimus	Derivado da rapamicina	Inibição de mTOR	Câncer renal
Imatinibe	Inibidor enzimático	Inibição de BCR-ABL	Leucemia mieloide crônica
Sorafenibe	Inibidor enzimático	Inibição de múltiplas tirosina quinases	Câncer hepatocelular, câncer renal
Olaparibe	Inibidor enzimático	Inibição da poli(ADP-ribose) polimerase	Câncer de mama e ovário
Trióxido de arsênio	Composto inorgânico	Indutor de diferenciação	Leucemia pró-mielocítica aguda

FONTES: Modificado de CHABNER et al. (2011); WEINBERG (2014); APPERLEY (2015); ASHWORTH; LORD (2018).

Apesar da incontestável importância das terapias mencionadas, a radioterapia e a quimioterapia estão associadas com efeitos colaterais indesejados, incluindo: mucosite oral, toxicidade gastrointestinal, náusea e vômitos, alopecia, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, dano ao sistema hematopoiético, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros (ZHANG et al., 2018b; WATANABE et al., 2019). Além disto, a possível presença de células-tronco tumorais associadas à massa neoplásica (que são mais resistentes a terapias como a radiação e estão relacionadas à reincidência tumoral), e o fato das células tumorais serem

frequentemente capazes de desenvolver resistência aos tratamentos por diversos mecanismos, como o efluxo, a captação reduzida e a inativação de fármacos ou a indução de reparo e senescência (GILLET; GOTTESMAN, 2010; WILLERS et al., 2013; AL-DIMASSI; ABOU-ANTOUN; EL-SIBAI, 2014; NIKOLAOU et al., 2018; WANG, ZHANG; CHEN, 2019), reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas opções terapêuticas, que também apresentem menor toxicidade.

Além das terapias descritas, a imunoterapia também se destaca como um dos campos recentes mais promissores no tratamento anticâncer. A principal classe de medicamentos deste campo é conhecida como inibidores do *checkpoint* imune (um exemplo é o ipilimumabe), que são anticorpos que visam o reestabelecimento da resposta imune antitumoral através da interrupção de vias de sinalização coinibitórias. Dentre os principais alvos destes fármacos, incluem-se: a inibição da proteína associada ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4), da proteína morte programada 1 (PD-1) e do ligante da proteína de morte programada 1 (PD-L1), necessárias para a interação das células T citotóxicas com células apresentadoras de antígenos ou células tumorais e sua subsequente ativação (ABRIL-RODRIGUEZ; RIBAS, 2017; DARVIN et al., 2018; WILKY, 2019). Entretanto, a imunoterapia também está associada com efeitos adversos graves envolvendo manifestações inflamatórias e autoimunes, incluindo dermatite, enterocolite, endocrinopatias, hepatite autoimune, pneumonite e artrite. A manifestação de efeitos adversos pode acometer até 80% dos pacientes (ABDEL-WAHAB; ALSHAWA; SUAREZ-ALMAZOR, 2017). Como desvantagem adicional, estes medicamentos são de alto custo e de baixa acessibilidade (VERMA et al., 2018).

2.2 COMPOSTOS DE SELÊNIO E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Considerando o exposto, o cenário atual exige investigações constantes no sentido de desenvolver novos fármacos que possam ser utilizadas para o tratamento do câncer. Neste contexto, recentemente os compostos de organosselênio se destacam como amplamente explorados quanto ao seu potencial no tratamento anticâncer (FERNANDES; GANDIN, 2015; GANDIN et al., 2018; CHEN et al., 2020).

2.2.1 Selênio e classes de compostos de selênio

O selênio (Se) é um micronutriente essencial para o organismo, obtido através da alimentação nas formas de selenocisteína, selenometionina, selenito e/ou selenato, e presente tanto em alimentos de origem animal, incluindo carnes, frutos do mar e laticínios, como de origem vegetal, incluindo cereais, grãos, frutas e vegetais. A ingestão média recomendada de Se para um indivíduo adulto é de 55 microgramas/dia, embora varie de acordo com a faixa etária e condição do indivíduo (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000; SUNDE, 2014).

Dentre as múltiplas funções fisiológicas envolvendo o selênio, destacam-se: papéis na manutenção redox, na citoproteção, no metabolismo do cálcio e metabolismo hormonal (particularmente de hormônios tireoidianos) (BARTOLINI et al., 2017). Estas importantes funções estão associadas à presença do selênio em proteínas na forma de aminoácidos, especialmente na forma de selenocisteína (Sec), também conhecida como o “21º aminoácido”. A presença de Sec no sítio ativo proteico, em comparação com o análogo cisteína, confere importantes vantagens funcionais, como a taxa mais elevada de reações com eletrófilos, devido à grande nucleofilicidade da Sec. Desta maneira, quando presente em proteínas, o aminoácido selenocisteína quase sempre desempenha funções catalíticas (LU; HOLMGREN, 2009; ARNÉR, 2010; SUNDE, 2014).

Coletivamente, as proteínas que possuem selenocisteína em seu sítio ativo são conhecidas como selenoproteínas, e pelo menos 25 destas já foram descritas no genoma humano, incluindo as isoformas das enzimas glutathione peroxidases (GPx), das iodotironina deiodinases, das tioredoxina redutases, e a selenoproteína P (proteína envolvida no transporte de Se) (STEINBRENNER; SPECKMANN; KLOTZ, 2016).

Apesar das importantes funções do selênio na fisiologia celular, seu papel em algumas doenças, como o câncer, ainda está pouco esclarecido, e não se sabe se este elemento possui efeito preventivo (SUNDE, 2014). Alguns estudos demonstram que o baixo consumo de Se está associado com o aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer, como o carcinoma hepatocelular, câncer de bexiga e do trato biliar, porém estudos envolvendo sua suplementação são discrepantes (MÉPLAN; HESKETH, 2013; HUGHES et al., 2016). Assim, não há evidências concretas de efeitos benéficos da suplementação de Se ou que suportem

sua maior inclusão na dieta para prevenção do câncer em humanos (VINCETI et al., 2020).

Independentemente dos efeitos benéficos da suplementação ou do potencial preventivo do selênio na dieta, compostos contendo Se também têm sido investigados quanto a seus efeitos biológicos. Os compostos de selênio podem ser divididos em duas grandes classes principais: compostos inorgânicos de Se (incluindo principalmente o dióxido de selênio, selenito de sódio e selenato de sódio), e os compostos orgânicos contendo Se (também conhecidos como compostos de organosselênio), que englobam a maior variedade de compostos contendo este mineral (BARTOLINI et al., 2017).

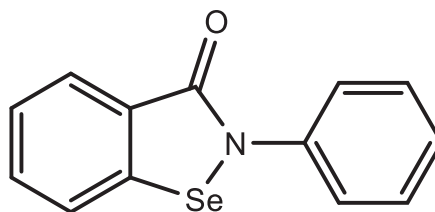
2.2.2 Atividades biológicas de compostos de organosselênio

Os compostos de organosselênio possuem uma variedade de atividades biológicas já descritas na literatura, incluindo as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antidepressiva, ansiolítica, hepatoprotetora, gastroprotetora, renoprotetora, cardioprotetora, de mimetização da insulina, neuroprotetora e quimiopreventiva (NOGUEIRA; ROCHA, 2012).

Os compostos 3-selenilindóis tiveram suas atividades biológicas exploradas em diferentes contextos, incluindo: sua alta taxa de reatividade com diferentes agentes oxidantes, resultando na proteção contra danos oxidativos e nitrosativos em proteínas da matriz extracelular associados com o processo de aterogênese (CASARIL et al., 2017a), bem como a promoção de efeitos antidepressivos, redução da neuroinflamação e do estresse oxidativo em um modelo animal de depressão induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos (CASARIL et al., 2017b).

Contudo, a atividade mais conhecida dos compostos de organosselênio relaciona-se com sua propriedade antioxidante e capacidade de mimetizar a enzima glutathione peroxidase (GPx), primeiramente descrita em 1984 para o composto Ebselen (Figura 4) (MÜLLER et al., 1984). Além da atividade similar à GPx, alguns compostos de selênio também apresentam atividades similares à tioredoxina redutase, dehidroascorbato redutase e tioltransferase (NOGUEIRA; ROCHA, 2012).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO EBSELEN



FONTE: MÜLLER et al. (1984).

Uma das maiores controvérsias no que diz respeito aos compostos de organosselênio, entretanto, reside no fato de que estas moléculas podem desempenhar tanto efeitos antioxidantes como pró-oxidantes. Este duplo papel parece depender das condições experimentais, e principalmente da concentração empregada do composto (FERNANDES; GANDIN, 2015; COLLERY, 2018; TAN et al., 2019). A produção de superóxido por compostos de selênio pode ser induzida, por exemplo, através da oxidação da GSH ou outras moléculas contendo grupamentos tióis. A oxidação destes grupamentos críticos também pode resultar na disfunção de proteínas sem a produção de ERO (PLANO et al., 2010; WALLENBERG et al., 2014). O próprio Ebselen, classicamente descrito como um antioxidante e mimético da atividade da GPx, em concentrações mais elevadas (40 a 100 μM) induz a produção de espécies reativas de oxigênio e ativa a via intrínseca da apoptose em linhagens de mieloma múltiplo (ZHANG et al., 2014). Desta maneira, são necessárias investigações mais aprofundadas que auxiliem a esclarecer esta dualidade.

Tendo em vista que células tumorais geralmente possuem níveis mais elevados de ERO em comparação com células pouco proliferativas, estratégias terapêuticas que visem o aumento de ERO nas células cancerígenas até níveis tóxicos suficientes para ativar vias de morte celular exploram esta característica como benefício terapêutico (GALADARI et al., 2017). Assim, compostos de Se capazes de induzir a produção de ERO são particularmente promissores como potenciais agentes antitumorais.

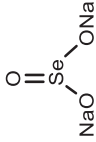
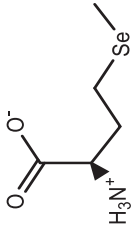
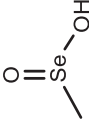
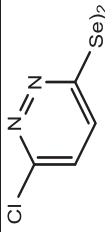
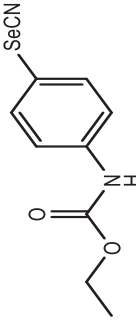
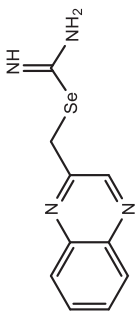
2.2.3 Atividades citotóxicas e antitumorais de compostos de organosselênio

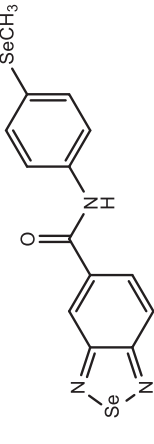
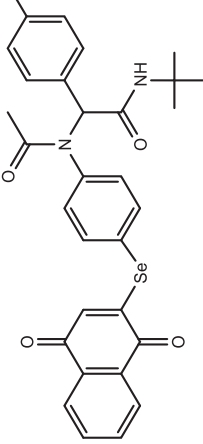
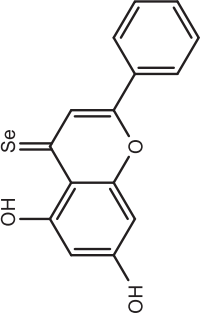
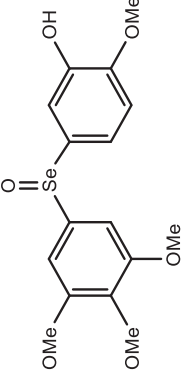
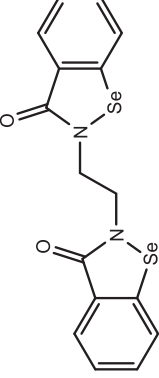
Classes muito diversas de compostos de selênio, incluindo tanto compostos inorgânicos como compostos de organosselênio, tiveram suas atividades citotóxicas

e antitumorais descritas em modelos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, além do Ebselen, pouquíssimos compostos de Se ultrapassaram os ensaios pré-clínicos e avançaram para testes clínicos, sendo um exemplo o Ethaselen, recentemente avaliado em combinação com a cisplatina (BARTOLINI et al., 2017).

No Quadro 2 abaixo, algumas destas classes de compostos de selênio já investigadas são demonstradas, com o exemplo de uma estrutura química da classe correspondente e os modelos nos quais seus efeitos citotóxicos e/ou antitumorais foram observados.

QUADRO 2 – EXEMPLOS DA VARIEDADE DE CLASSES DE COMPOSTOS DE SELÊNIO COM ATIVIDADES CITOTÓXICAS E ANTITUMORAIS DESCRITAS

Classes de compostos	Exemplo de estrutura	Modelos	Referências
Compostos inorgânicos de Se		Câncer cervical, de próstata e colorretal	Rudolf et al. (2004), Freitas et al. (2011) e Luo et al. (2013)
Aminoácidos contendo Se		Câncer de mama, pulmão e melanoma	Redman et al. (1998), Chen; Wong (2008), Poerschke; Franklin; Moos (2008), Li et al. (2009) e Fan et al. (2014)
Ácido metilselenínico		Câncer de próstata, mama e pulmão	Li et al. (2007), Jariwalla; Gangapurkar; Nakamura (2009) e Tarrado-Castellarnau et al. (2015)
Diselenidos		Câncer de mama	Kim; Lee; Park (2015)
Isoselenocianatos		Melanoma (principalmente) e outros	Sharma et al. (2008)
Selenocianatos		Câncer de mama, próstata, pulmão, cólon e leucemia linfoblástica	Romano et al. (2015) e Wu et al. (2018)
Selenoureias		Câncer de cólon, câncer de mama e outros	Alcolea et al. (2016b) e Barbosa et al. (2018)

Selenodiazóis		Câncer de mama	Ruberte et al. (2018)
Selenoquinonas		Carcinoma hepatocelular	Shaaban et al. (2016)
Derivados selenocarbonil		Câncer de mama (principalmente) e outros	Martins et al. (2015)
Selenóxidos		Câncer de mama	Xu et al. (2016)
Isoselenazolonas		Câncer de pulmão, de mama e colorretal	Tan et al. (2010), Wang et al. (2012), Dong et al. (2016), Zheng et al. (2016) e Ye et al. (2017)

FONTE: O AUTOR (2020).

O mecanismo molecular da toxicidade dos compostos de organosselênio é variado, sendo dependente da espécie de selênio em questão, da concentração empregada, do tempo de exposição e da origem do tecido tumoral. De maneira geral, compostos de selênio são metabolizados primariamente a seleneto (HSe^-) ou a metilselenol (CH_3Se^-), sendo que este primeiro grupo de compostos usualmente gera toxicidade devido à formação do radical superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, ocasionando alterações na sinalização redox, o que afeta múltiplos processos celulares. Além disto, as ERO podem promover o fenômeno de transição de permeabilidade mitocondrial e a consequente liberação de citocromo C e indução da via intrínseca da apoptose (WALLENBERG; MISRA; BJÖRNSTEDT, 2014). Neste contexto, estudos em diversas linhagens tumorais apontam a mitocôndria como um dos alvos celulares de compostos de selênio (CHEN et al., 2008; FREITAS et al., 2011; GUO et al., 2013), sendo seus efeitos associados com a depleção do potencial de membrana mitocondrial.

Para os compostos de Se primariamente metabolizados a metilselenol (CH_3Se^-), a indução de morte celular também é descrita, mas neste caso está geralmente associada com apoptose mediada por caspases sem o envolvimento da formação de ERO. Danos ao DNA podem ou não ocorrer na presença destes compostos (WALLENBERG; MISRA; BJÖRNSTEDT, 2014). Consistentemente com a indução de apoptose promovida por compostos de organosselênio, alterações morfológicas características de células sofrendo este processo já foram descritas após a incubação com compostos contendo selênio (RIKIISHI, 2007).

Considerando as atividades descritas para muitas das classes de compostos de organosselênio, estas substâncias podem ser exploradas como potenciais adjuvantes na quimioterapia antineoplásica, em combinação com agentes quimioterápicos clássicos. Liu e colaboradores (2015), por exemplo, evidenciaram que um composto pertencente à classe dos selenodiazóis é capaz de aumentar a captação celular e a eficácia terapêutica da doxorubicina em células de hepatocarcinoma (HepG2) através de efeitos moleculares sinérgicos, resultando na indução de apoptose. Spengler e colaboradores (2019), por sua vez, investigaram o potencial de combinação de doze compostos de Se pertencentes a cinco diferentes classes com medicamentos utilizados na clínica sobre a linhagem celular L5178Y (células de linfoma de células T murinas), e verificaram efeitos citotóxicos sinérgicos desempenhados por múltiplos compostos, especialmente em combinação com os

quimioterápicos vincristina e doxorrobucina, em concentrações a partir de 1,25 e 2,5 μM (SPENGLER et al., 2019).

Além das atividades citotóxicas e antitumorais diretas, outros efeitos protetores no contexto do câncer também têm sido alvo de estudos. De particular importância, investigou-se a ação de compostos de Se pertencentes às classes de selenoésteres e selenoanidrido sobre linhagens de linfoma de células T murinas resistentes a múltiplas drogas, e quatro compostos foram capazes de inibir com grande afinidade a atividade de bomba de efluxo da glicoproteína P (P-gp ou ABCB1), em maior intensidade que o medicamento de referência (verapamil). Além disto, estes compostos também desencadearam eventos apoptóticos nas linhagens estudadas. Os autores do estudo destacam a possibilidade de que os efeitos relacionados à reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas promovido pelos compostos de Se possam contribuir para o seu sinergismo com outros agentes quimioterápicos (DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ et al., 2016).

2.3 ATIVIDADES CITOTÓXICAS E ANTITUMORAIS DE COMPOSTOS DE ORGANOENXOFRE

Os compostos de organoenxofre também têm sido explorados quanto ao seu potencial efeito protetor no contexto do câncer. A maior parte dos trabalhos na literatura que suporta esta atividade destaca as atividades citotóxicas e antitumorais de compostos naturais contendo enxofre presentes no alho, com destaque para os sulfetos de alilo (YI; SU, 2013). Os estudos com sulfetos de alilo demonstraram efeitos antiproliferativos, apoptóticos, antiestrogênicos, de inibição do fenótipo de células-tronco, inibição de metástase e modulares de vias de sinalização diversas, em diferentes modelos celulares, incluindo: de leucemia humana (WONG et al., 2010), carcinoma hepatocelular (ICIEK et al., 2012), neuroblastoma, glioblastoma (JURKOWSKA et al., 2017), e cânceres de próstata (ARUNKUMAR et al., 2006), gástrico (SU et al., 2016), mama (ALTONSY; HABIB; ANDREWS, 2012; HAHM; SINGH, 2014; WEI et al., 2017; LI et al., 2018) e cólon (XIA et al., 2019). Além disto, também possuem atividade imunomodulatória recrutadora de neutrófilos (SCHEPETKIN et al., 2019).

O potencial antitumoral para estes compostos também foi verificado em modelos animais de câncer de mama (XIE et al., 2018; XIONG et al., 2018), osteossarcoma (LI et al., 2019), leucemia (SUN et al., 2019), câncer de pulmão (JIANG et al., 2017), e em modelos de câncer gástrico e câncer de cólon (SU et al., 2016; XIA et al., 2019).

A atividade quimioterápica antineoplásica também foi demonstrada para outros compostos naturais contendo enxofre, como das classes dos isotiocianatos e glucosinolatos, além de derivados sintéticos do sulforamato e análogos da brassinina (MORIARTY; NAITHANI; SURVE, 2007). Adicionalmente, para ésteres de sulfonato sintéticos foram demonstrados efeitos antiproliferativos *in vitro* em células MCF-7 (CYR et al., 2007), enquanto derivados de enxofre sintéticos contendo a fração 1,2,4-triazina também foram citotóxicos nesta mesma linhagem e em células MDA-MB-231 (KARCZMARZYK et al., 2015), e derivados tiofeno exerceram efeitos tóxicos em células HepG2 e SMMC-7721 (CAI et al., 2019). Assim, estes trabalhos ressaltam a potencial aplicação no tratamento do câncer de compostos naturais e sintéticos contendo enxofre.

Especificamente para a classe de compostos dos 2-tioindóis, foi descrito há mais de duas décadas o efeito de inibição de receptores do tipo tirosina quinase, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), apresentando valores de IC₅₀ para inibição deste receptor de até 4,2 μ M (THOMPSON et al., 1993; KELLOFF et al., 1996). Entretanto, apesar desta importante informação, não foram encontrados estudos mais aprofundados a respeito do papel do mecanismo destes compostos como possível estratégia terapêutica no contexto do câncer, ou se a presença desta fração em diferentes classes de compostos também confere a atividade de inibição de EGFR.

2.4 ATIVIDADES CITOTÓXICAS E ANTITUMORAIS DE COMPOSTOS CONTENDO A FRAÇÃO INDOL

Além dos compostos de organosselênio e organoenxofre, aqueles contendo a fração indol também têm merecido destaque devido à potencial atividade antitumoral. O indol, ou 1*H*-benzo[b]pirrol, corresponde a uma molécula heterocíclica (bicíclica), planar, com propriedades aromáticas, e com uma estrutura química única que

permite que o mesmo sofra reações de substituição eletrofílica com grande facilidade (devido à deslocalização dos elétrons π), bem como reações de substituição nucleofílica no átomo de nitrogênio, sob condições básicas (devido à acidez conferida pela presença da ligação N-H). Assim, considerando sua grande reatividade química, permite-se a obtenção de uma grande variedade de derivados indólicos, com potenciais atividades biológicas a serem exploradas (WAN et al., 2019).

Esta importante fração é utilizada como modelo para o *design* de muitos compostos sintéticos com ação farmacológica, além de estar também presente em alguns compostos naturais (como a vincristina e vinblastina e seus derivados), e inclui compostos anticâncer com mecanismos de ação diversos com destaque para: indução de apoptose através da inibição da proteína Mcl-1 (pertencente à família de proteínas antiapoptóticas Bcl-2), modulação epigenética através da inibição de enzimas histona deacetilases, inibição de enzimas DNA topoisomerases, inibição de enzimas tirosina quinases, e inibição da polimerização da tubulina (LEONI et al., 2015; DADASHPOUR; EMAMI, 2018; WAN et al., 2019).

Os efeitos citotóxicos e/ou antitumorais de compostos indólicos foram recentemente investigados em diferentes linhagens celulares e modelos animais de câncer de mama (SIDHU et al., 2016), câncer cervical (PRAKASH et al., 2017), câncer de pulmão (RATH et al., 2018), melanoma (QUIRIT et al., 2017), glioblastoma (SHERER et al., 2017), câncer de cólon (KANEHARA et al., 2019), leucemia (BOMMAGANI et al., 2017) e carcinoma hepatocelular (LEE et al., 2018).

Com destaque, o efeito de inibição da polimerização da tubulina foi descrito, além de muitos outros compostos indólicos, para os 2-fenilindóis, compostos que possuem tanto a fração indólica como a fração 2-fenil (PATIL et al., 2016). Esta mesma classe de compostos também apresentou atividade antiproliferativa, pró-apoptótica e efeitos antiestrogênicos em células de câncer de mama MCF-7 (KELLY et al., 2016), sendo que os efeitos antiestrogênicos e de inibição de crescimento também foram previamente descritos para 2-fenilindóis contendo cadeias laterais de enxofre (BIBERGER; VON ANGERER, 1996). Em células de melanoma murino B16F10, de câncer de pulmão humano A549 e câncer de mama MDA-MB-231, para os 2-fenilindóis também foram demonstrados efeitos citotóxicos promissores (GAIKWAD et al., 2019). Salienta-se, desta maneira, que representam uma classe de compostos com grande potencial anticâncer a ser explorado.

3 RESULTADOS NÃO INCLUÍDOS NO ARTIGO

Conforme descrito nos objetivos, na primeira etapa deste estudo foi realizado um *screening* de 15 compostos, pertencentes às classes dos 2- e 3- selenilindóis e tiofenilindóis, contendo diferentes substituintes químicos, com a finalidade de determinar quais os compostos mais promissores em promover a redução da viabilidade de células tumorais, avaliada através do ensaio do MTT. Os compostos foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel da Silveira Rampon, e gentilmente disponibilizados para o estudo. As estruturas químicas destes compostos estão representadas na Figura 1 do Artigo, na próxima seção desta dissertação.

Optou-se pela utilização das linhagens tumorais de câncer de mama MCF-7 e de carcinoma hepatocelular HepG2 como modelos celulares para esta avaliação inicial, devido à predominância de trabalhos na literatura descrevendo múltiplos efeitos citotóxicos de compostos de organosselênio e organo enxofre nestas linhagens (ALTONSY; HABIB; ANDREWS, 2012; ICIEK et al., 2012; SHI et al., 2012; LIU et al., 2015; ROSEBLADE; UNG; BEBAWY, 2017; BARBOSA et al., 2018; LI et al., 2018; SHAABAN et al., 2019).

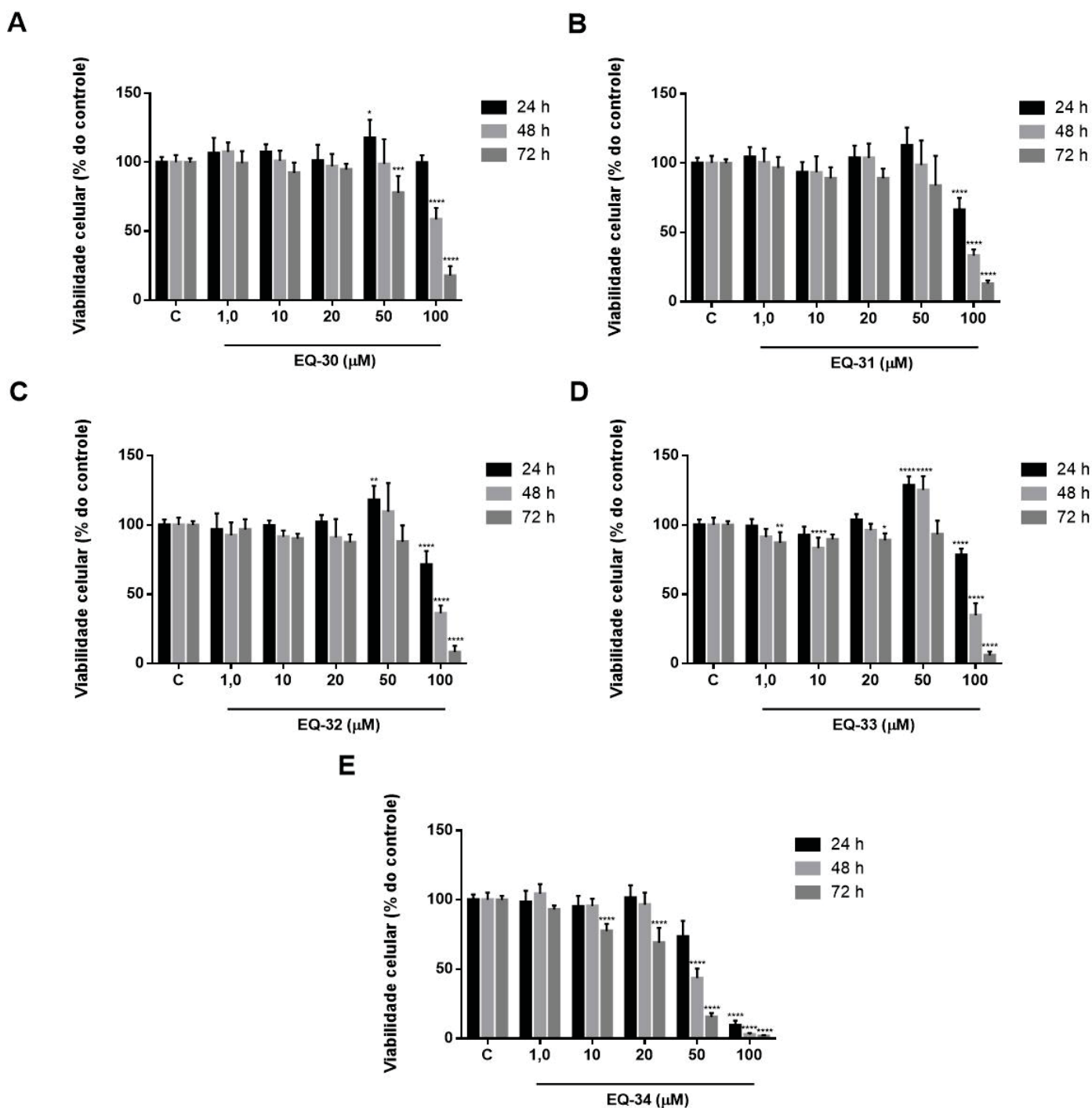
Os compostos analisados foram nomeados de EQ-30 a EQ-44, em que o grupo de substâncias de EQ-30 a EQ-37 compreende os selenilindóis, enquanto o grupo de compostos de EQ-38 a EQ-44 inclui os tiofenilindóis. O efeito na viabilidade foi avaliado através do ensaio do MTT nas duas linhagens, em cinco concentrações dos compostos (1,0, 10, 20, 50 e 100 μ M), nos tempos de incubação de 24, 48 e 72h.

Nas figuras de 5 a 7 estão representados os resultados dos ensaios com as células MCF-7 incubadas com EQ-30 a EQ-44. Todos os compostos, na maior concentração (100 μ M), promoveram uma redução significativa na viabilidade celular após a incubação de 72h. Entretanto, diferentes concentrações e tempos de incubação resultaram em efeitos distintos. Curiosamente, alguns compostos (como por exemplo, o EQ-33) promoveram um aparente aumento da viabilidade celular em maiores concentrações (em destaque a de 50 μ M) nos tempos de incubação de 24 e 48h, o que pode refletir tanto um estímulo na capacidade de proliferação das células MCF-7 nestas condições, quanto um aumento na atividade metabólica celular.

Outros compostos, por sua vez, como EQ-37 a EQ-39, reduziram a viabilidade celular desde a menor concentração (1,0 μM) e menor tempo de incubação (24h). Entretanto, estes compostos não tiveram perfis dose-resposta apropriados que permitissem o cálculo de valores de CC_{50} (concentração citotóxica que promove uma redução da viabilidade celular em 50%) confiáveis. Além disto, a redução promovida na viabilidade celular nas concentrações mais elevadas foi menos acentuada do que aquela obtida por outros compostos, que tiveram efeitos mais exacerbados nas concentrações de 20 a 100 μM , e apresentam, portanto, maior potencial citotóxico.

Assim, foram identificados os compostos EQ-34 e EQ-41, os respectivos selenilindol e tiofenilindol trifluormetilados (3-(3-trifluormetil)fenilselenil-1*H*-indol e 3-(3-trifluormetil)feniltio-1*H*-indol), como os de maior potencial citotóxico na linhagem de câncer de mama MCF-7. Na maior concentração (100 μM), os compostos EQ-34 e EQ-41 reduziram, quase completamente, a viabilidade celular. Para o tempo de incubação de 72h, EQ-34 e EQ-41 em concentrações intermediárias (de 20 e 50 μM) reduziram a viabilidade celular em ~31% e 85% e ~12% e 63%, respectivamente. Os valores preliminares obtidos de CC_{50} para estes compostos nos tempos de 48 e 72 horas são apresentados na Tabela 1.

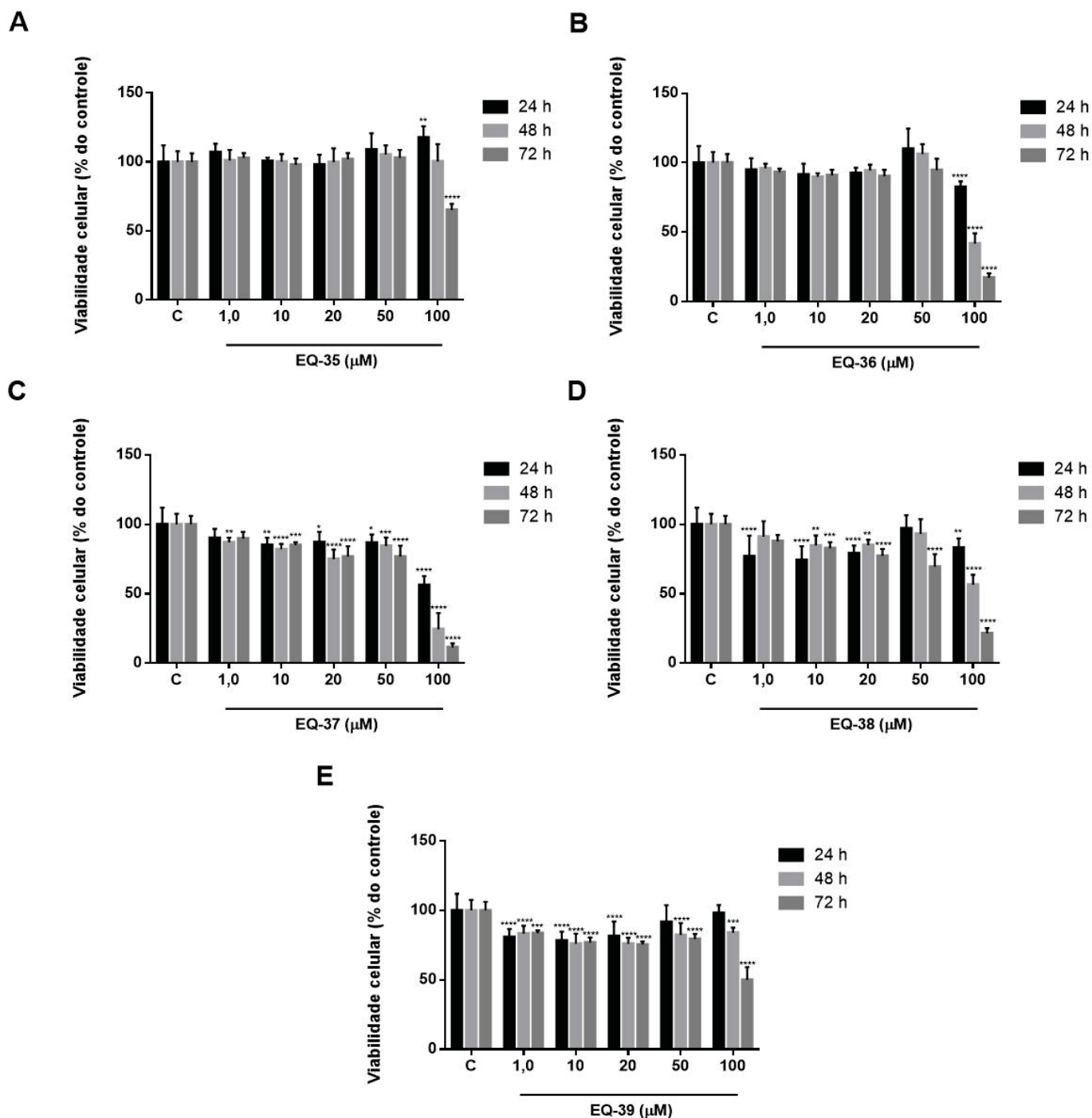
FIGURA 5 – EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-30 A EQ-34 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS MCF-7



FONTE: O AUTOR (2020).

LEGENDA: Efeitos dos compostos EQ-30 (A) a EQ-34 (E) na viabilidade de células de câncer de mama MCF-7, avaliada através do método do MTT. As células ($1,0 \times 10^4$ /poço) foram plaqueadas e incubadas com os compostos por 24, 48 ou 72h. Decorridos os tempos de incubação, foram adicionados 20 μL de MTT (5 mg/mL em PBS) sobre o meio por 3 horas a 37 °C. Os cristais de formazana formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância registrada em leitor de placas a 550 nm. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, em triplicata. *, **, *** e **** representam valores estatisticamente diferentes do controle (células incubadas com DMSO apenas), considerando $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

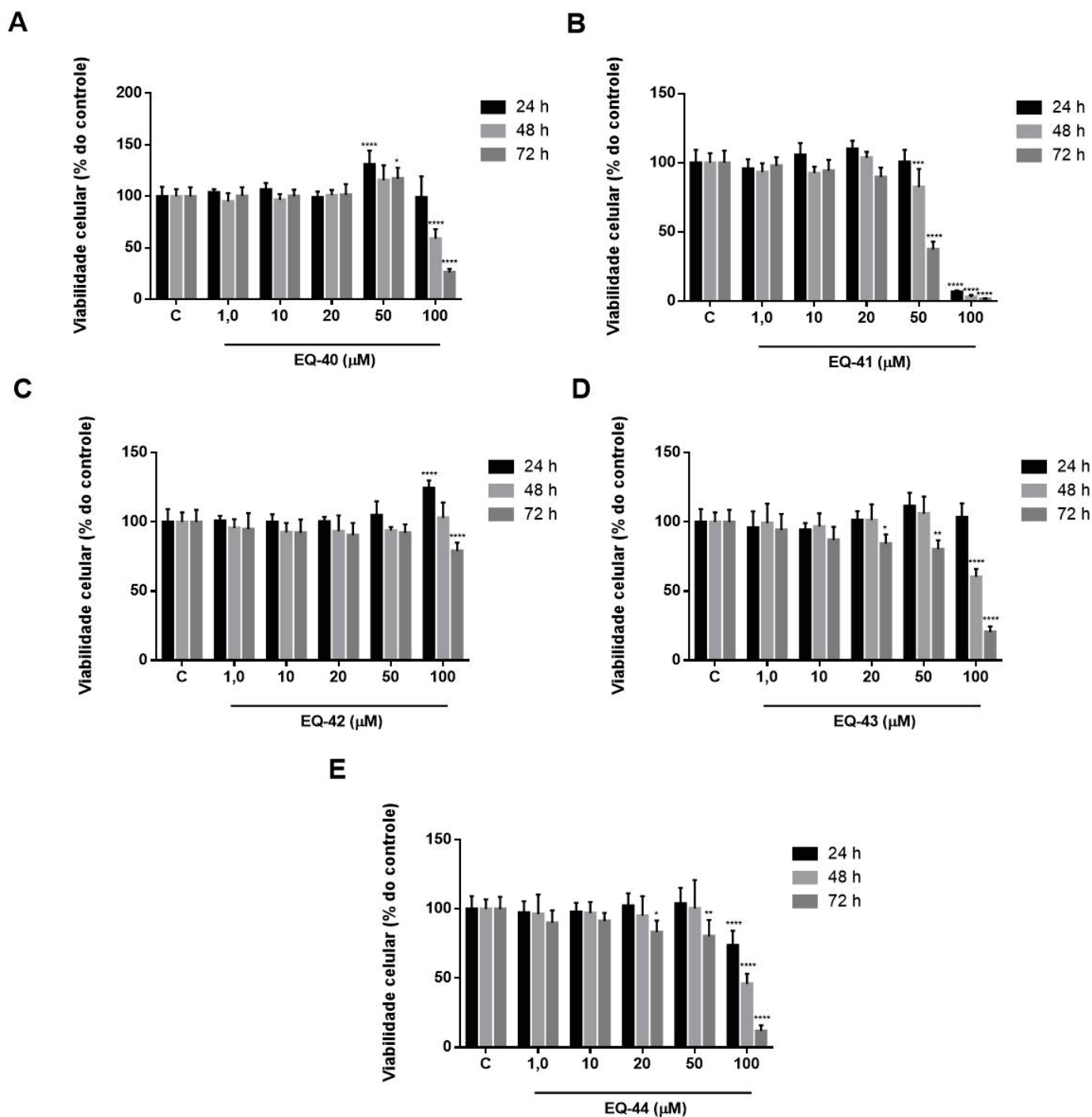
FIGURA 6 – EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-35 A EQ-39 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS MCF-7



FONTE: O AUTOR (2020).

LEGENDA: Efeitos dos compostos EQ-35 (A) a EQ-39 (E) sobre a viabilidade de células de câncer de mama MCF-7, avaliada através do método do MTT. $1,0 \times 10^4$ células/poço foram plaqueadas e incubadas com os compostos-teste por 24, 48 ou 72h. Após o tempo, foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de MTT (5 mg/mL em PBS) sobre o meio por 3 horas a 37°C . Os cristais de formazana formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância registrada em leitor de placas a 550 nm. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, em triplicata. *, **, *** e **** representam valores estatisticamente diferentes do controle (células incubadas com DMSO apenas), considerando $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

FIGURA 7 – EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-40 A EQ-44 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS MCF-7



FONTE: O AUTOR (2020).

LEGENDA: Efeitos dos compostos EQ-40 (A) a EQ-44 (E) sobre a viabilidade de células de câncer de mama MCF-7, avaliada através do método do MTT. $1,0 \times 10^4$ células/poço foram plaqueadas e incubadas com os compostos-teste por 24, 48 ou 72h. Após o tempo, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL em PBS) sobre o meio por 3 horas a 37°C. Os cristais de formazana formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância registrada em leitor de placas a 550 nm. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, em triplicata. *, **, *** e **** representam valores estatisticamente diferentes do controle (células incubadas com DMSO apenas), considerando $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

Em contrapartida, os efeitos dos compostos nas células HepG2 estão representados nas Figuras de 8 a 10. De maneira similar, a maior concentração (100 μM) de todos os compostos reduziu significativamente a viabilidade celular após 72h. A incubação com alguns dos compostos também resultou em um aumento do número de células viáveis e/ou da atividade metabólica celular nas concentrações de 50 e 100 μM , nos tempos de 24 e 48 horas. Os efeitos dos compostos de EQ-37 a EQ-39 em menores concentrações (1,0 e 10 μM), por sua vez, foram menos pronunciados do que os observados para as células MCF-7 (Figuras 6 e 9).

Os efeitos dos compostos EQ-36 e EQ-43 foram mais pronunciados nas células HepG2, em comparação às células MCF-7. No tempo de incubação de 72h, EQ-36 reduziu a viabilidade celular de 17% a 84% para as concentrações de 10 a 100 μM , enquanto o composto EQ-43 reduziu a viabilidade em 22% a 78% nestas mesmas concentrações, porém apresentou efeito significativo desde a menor concentração (1,0 μM) para os tempos de incubação de 48 e 72h.

Como observado para as células MCF-7, os derivados trifluormetilados EQ-34 e EQ-41 foram os mais citotóxicos para as células HepG2, reduzindo quase por completo a viabilidade desde o tempo de incubação de 24h, na maior concentração. Para o tempo de incubação de 72h, os derivados reduziram a viabilidade a partir das concentrações de 20 μM e 10 μM , respectivamente, para EQ-34 e EQ-41, variando de 32% a 98% para o composto de organosselênio, e de 21% a 98% para o composto de organo enxofre. Os valores de CC_{50} para estes dois compostos, nos tempos de 48 e 72h, são demonstrados na Tabela 1.

É importante ressaltar que, embora os compostos investigados permaneçam às mesmas classes (selenilindóis ou tiofenilindóis), eles possuem diferentes efeitos sobre a viabilidade das células MCF-7 e HepG2. Isto possivelmente se deve a duas variáveis, os substituintes específicos de cada composto e as características de cada linhagem, que apresentam responsividade variada.

TABELA 1 – VALORES PRELIMINARES DE CC₅₀ (μM) DOS COMPOSTOS EQ-34 E EQ-41 NAS LINHAGENS MCF-7 E HepG2 NOS TEMPOS DE INCUBAÇÃO DE 48 E 72 H

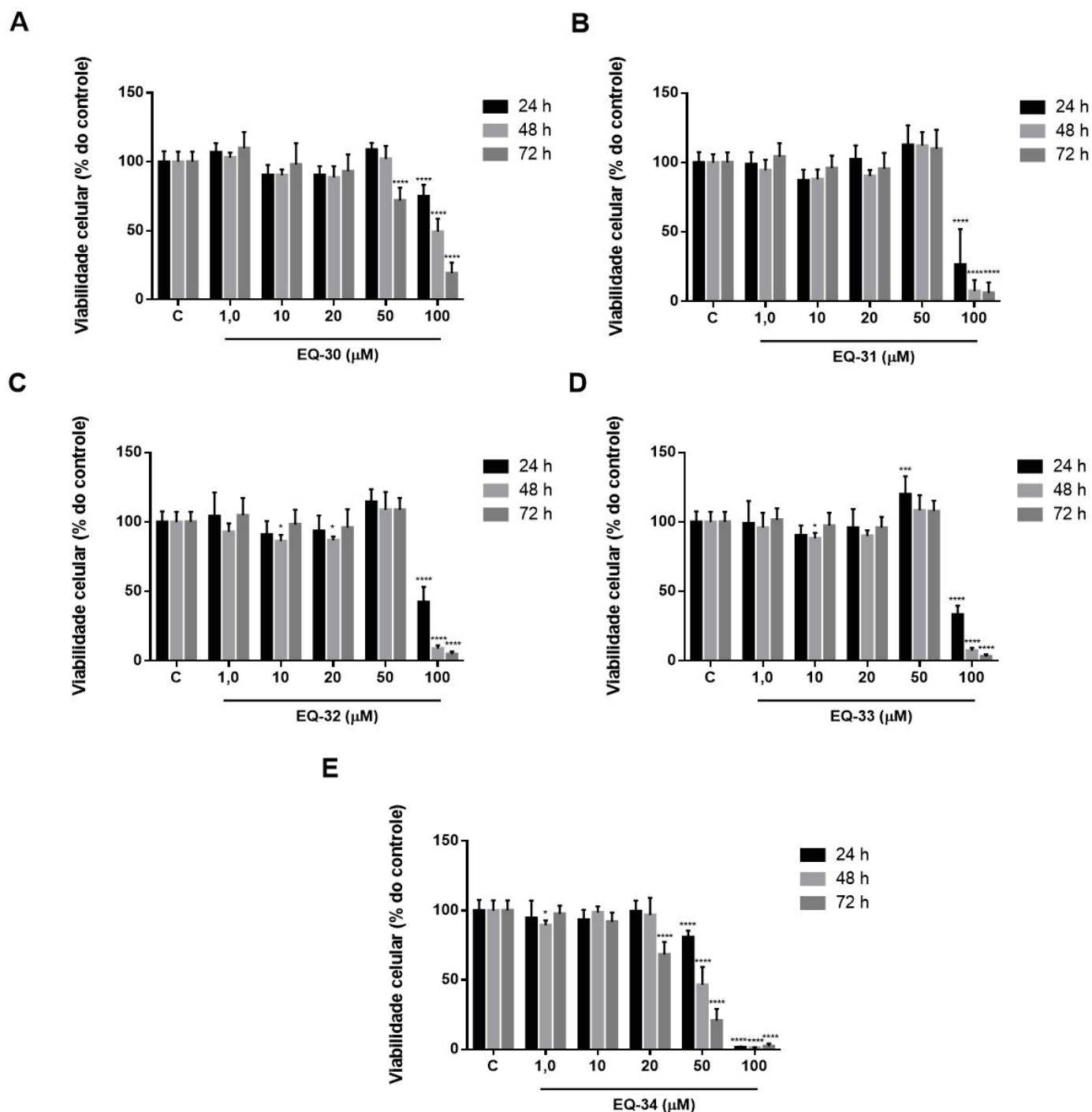
Composto EQ-34		
Linhagem celular	48h	72h
MCF-7	46,88	25,02
HepG2	48,55	27,82
Composto EQ-41		
Linhagem celular	48h	72h
MCF-7	61,84	41,48
HepG2	62,10	30,69

NOTA: O cálculo da CC₅₀ foi realizado através de análise de regressão linear, em que os valores de concentração foram convertidos para a forma logarítmica e comparados com a resposta normalizada dos compostos sobre a viabilidade celular, de 0 a 100%. Os valores correspondem às concentrações aproximadas em μM capazes de reduzir a viabilidade celular em 50%.

FONTE: O AUTOR (2020).

Utilizando como critérios principais os perfis dose-resposta e a maior capacidade de redução na viabilidade celular das duas linhagens, os compostos EQ-34 e EQ-41 foram selecionados para prosseguir com este estudo. Além disto, de acordo com a Tabela 1, a linhagem HepG2 apresentou menor valor de CC₅₀ para o composto de organo enxofre no tempo de incubação de 72h, sendo, portanto, mais responsiva do que a linhagem de câncer de mama MCF-7. O uso de uma linhagem de hepatocarcinoma, que dispõe de enzimas do metabolismo hepático, também possibilita a realização de futuras investigações acerca dos efeitos dos metabólitos dos compostos-teste (BALE et al., 2016). Com base nisto, as células de hepatocarcinoma HepG2 foram as selecionadas para os experimentos posteriores.

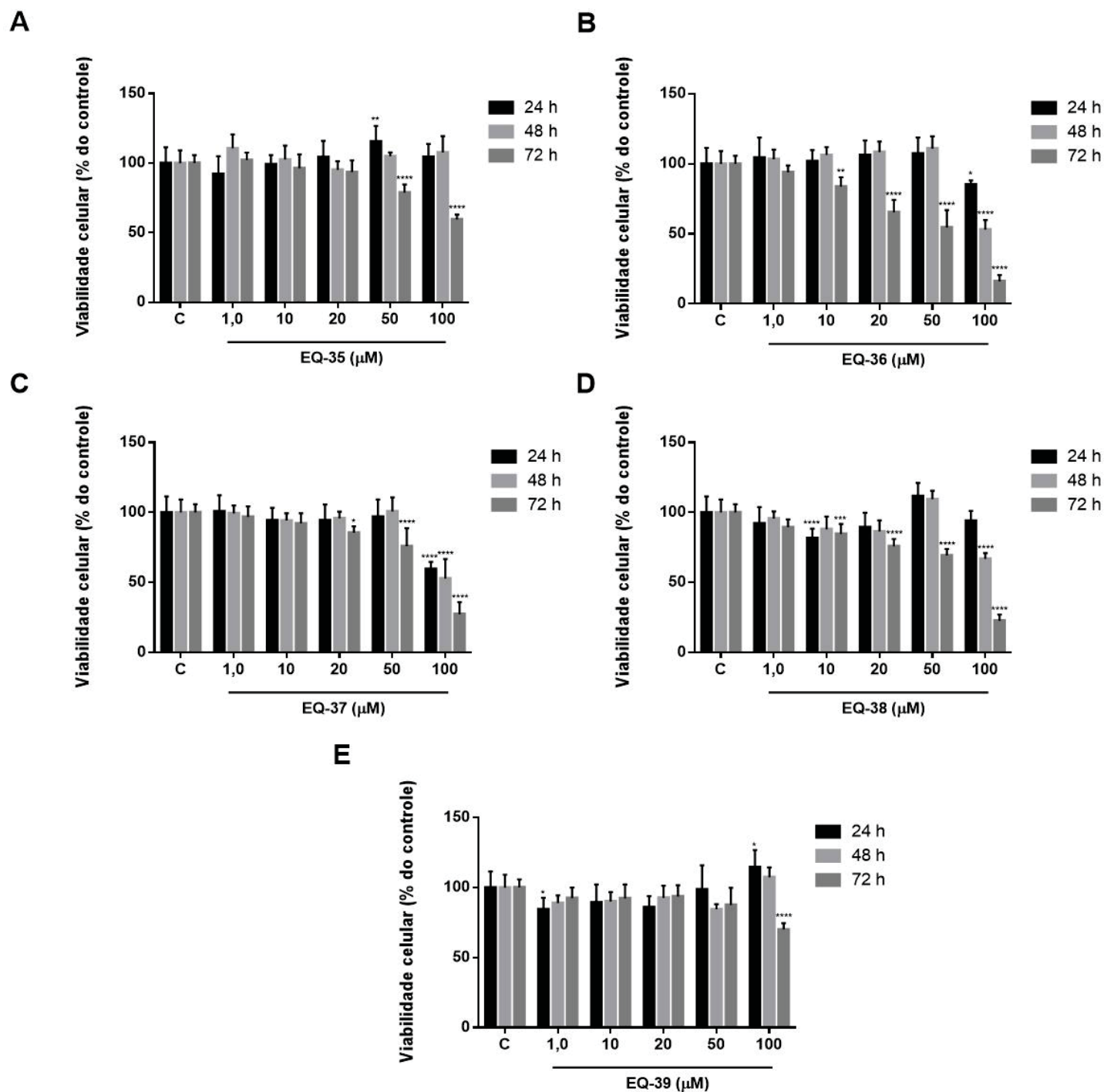
FIGURA 8 – EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-30 A EQ-34 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HepG2



FONTE: O AUTOR (2020).

LEGENDA: Efeitos dos compostos EQ-30 (A) a EQ-34 (E) sobre a viabilidade de células de câncer de hepatocarcinoma HepG2, avaliada através do método do MTT. $1,0 \times 10^4$ células/poço foram plaqueadas e incubadas com os compostos-teste por 24, 48 ou 72 horas. Após o tempo, foram adicionados 20 μL de MTT (5 mg/mL em PBS) sobre o meio por 3 horas a 37 °C. Os cristais de formazana formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância registrada em leitor de placas a 550 nm. Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes, em triplicata. *, *** e **** representam valores estatisticamente diferentes do controle (células incubadas com DMSO apenas), considerando $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

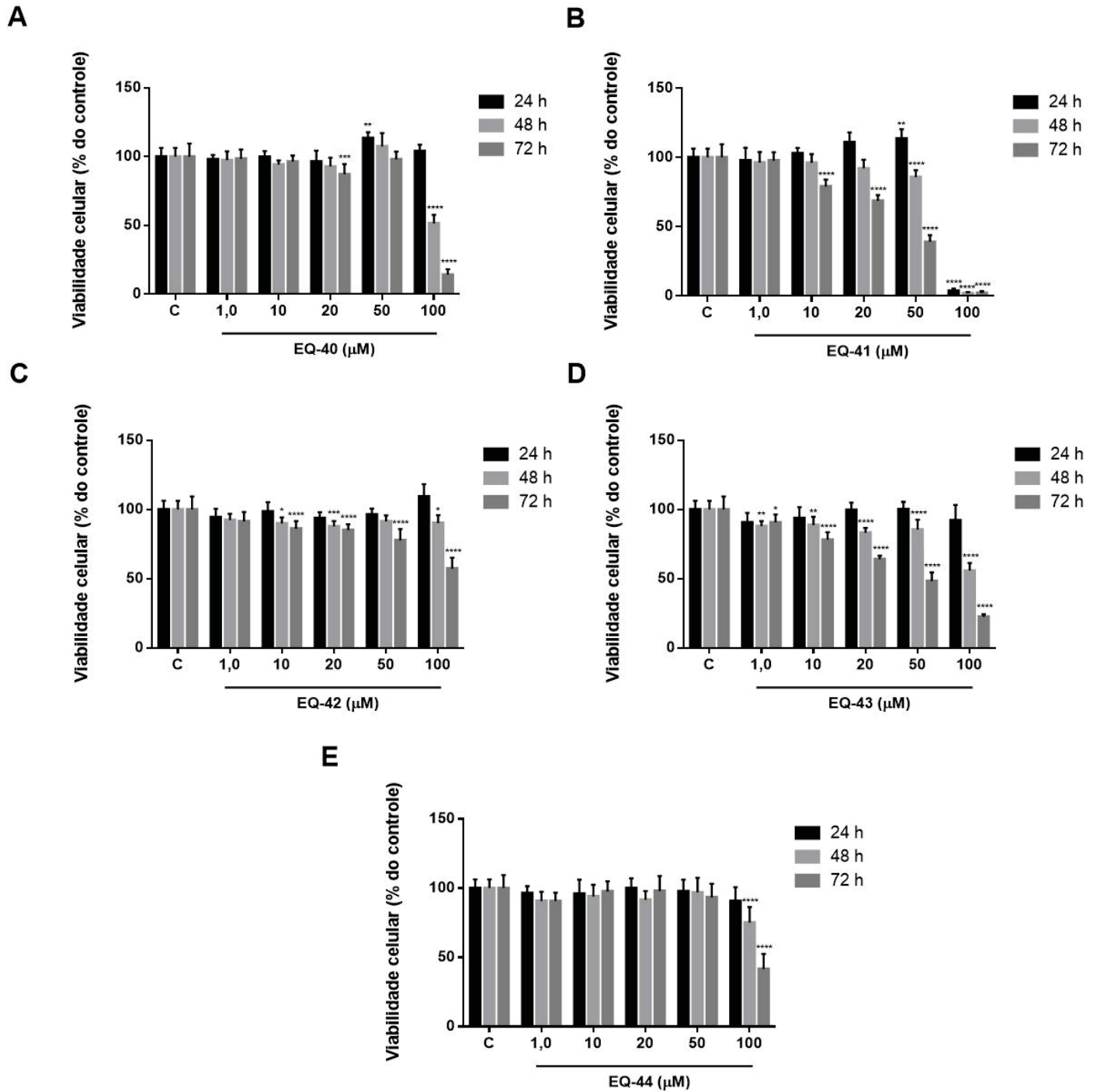
FIGURA 9 – EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-35 A EQ-39 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HepG2



FONTE: O AUTOR (2020).

LEGENDA: Efeitos dos compostos EQ-35 (A) a EQ-39 (E) sobre a viabilidade de células de hepatocarcinoma HepG2, avaliada através do método do MTT. $1,0 \times 10^4$ células/poço foram plaqueadas e incubadas com os compostos-teste por 24, 48 ou 72 horas. Após o tempo, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL em PBS) sobre o meio por 3 horas a 37 °C. Os cristais de formazana formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância registrada em leitor de placas a 550 nm. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, em triplicata. *, **, *** e **** representam valores estatisticamente diferentes do controle (células incubadas com DMSO apenas), considerando $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

FIGURA 10 – EFEITOS DOS COMPOSTOS EQ-40 A EQ-44 SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HepG2



FONTE: O AUTOR (2020).

LEGENDA: Efeitos dos compostos EQ-40 (A) a EQ-44 (E) sobre a viabilidade de células de hepatocarcinoma HepG2, avaliada através do método do MTT. $1,0 \times 10^4$ células/poço foram plaqueadas e incubadas com os compostos-teste por 24, 48 ou 72 horas. Após o tempo, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL em PBS) sobre o meio por 3 horas a 37 °C. Os cristais de formazana formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância registrada em leitor de placas a 550 nm. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, em triplicata. *, **, *** e **** representam valores estatisticamente diferentes do controle (células incubadas com DMSO apenas), considerando $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

Entretanto, quando experimentos subsequentes foram realizados para confirmar a citotoxicidade dos derivados trifluormetilados nas células de hepatocarcinoma, os efeitos citotóxicos foram mais acentuados do que os observados no *screening* pelo método do MTT. Em ensaios preliminares de morte celular por citometria, o número de células viáveis obtidas foi muito inferior ao esperado após a incubação com os compostos na concentração de escolha (35 μ M), que deveria reduzir a viabilidade em somente 30% após 48h de exposição. Entretanto, menos da metade da quantidade de células viáveis foi obtida em comparação com o controle. A morfologia celular após 48h, avaliada por microscopia óptica, também foi drasticamente alterada na presença do composto, indicando alta toxicidade.

A discordância entre os resultados pode ser devido à metodologia empregada no *screening*. Sabe-se que o método do MTT pode sofrer interferência de substâncias contendo grupamentos funcionais capazes de reduzir o sal de tetrazólio a formazana mesmo na ausência de atividade metabólica (NEUFELD et al., 2018). Como os ensaios iniciais foram realizados pela adição direta do MTT ao meio de cultura contendo os compostos, seguindo-se uma incubação por 3h, é possível que tenham ocorrido reações inespecíficas entre os compostos em estudo e o tetrazólio.

Desta maneira, os ensaios de viabilidade celular para os compostos EQ-34 e EQ-41, seus protótipos não substituídos (EQ-30 e EQ-38) e contendo apenas um halogênio (EQ-31 e EQ-39), foram novamente realizados na linhagem HepG2, removendo o meio de cultura contendo os compostos antes da adição do MTT. Os resultados obtidos foram diferentes daqueles inicialmente descritos e condizentes com os dos demais experimentos. Os novos ensaios de viabilidade realizados estão demonstrados a seguir no Artigo.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Esta dissertação foi escrita de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica (Resolução 32/17), o qual prevê em seu Artigo nº 52 (Seção XIV – Do Documento Para Defesa do Mestrado e Doutorado) que dissertações e teses podem ser apresentadas segundo as Normas para Apresentação de Documentos Científicos publicadas pela Editora da UFPR ou em formato de artigo científico. O artigo científico apresentado neste trabalho será submetido para a revista Food and Chemical Toxicology, que utiliza o formato *Your Paper Your Way* e não exige formatação específica no momento da submissão inicial.

Title:

Trifluormethyl-substituted 3-selenylindol and 3-thiophenylindol induce metabolic alterations and impairment of cell cycle progression on hepatocarcinoma cells (HepG2)

Authors:

Eduardo Sbrana Serur dos Santos¹, Eduardo Quadros da Luz², Silvia Maria Suter Correia Cadena¹, Daniel da Silveira Rampon² and Guilhermina Rodrigues Noleto^{1*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba-PR, Brazil

² Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Curitiba-PR, Brazil

*Corresponding author: guinoletto@yahoo.com.br

Abstract

Despite the available therapeutic options, hepatocellular carcinoma is still responsible for many cancer-related deaths. Novel synthetic compounds have been developed as promising drugs in cancer therapy, amongst them organoselenium, organosulfur and

indolic compounds. The present work evaluated the cytotoxic effects of new 15 selenylindoles and thiophenylindoles on HepG2 cells. The screening of the chalcogenylindoles by the MTT method evidenced that the trifluormethyl-substituted derivatives were the most cytotoxic and promoted a significant reduction in HepG2 cells viability starting at 20 μ M after 24h and at 10 μ M and 15 μ M after 48h for the selenylindol and thiophenylindol, respectively. The increased release of LDH, the alterations in cell morphology, such as the presence of membrane blebbing, and the annexin V and propidium iodide staining also confirmed their cytotoxicity. Furthermore, both compounds significantly enhanced reactive oxygen species (ROS) levels in HepG2 cells after 48h and impaired cell cycle progression at the G₂/M phases after 24h, while simultaneously increased DNA fragmentation levels. The chalcogenylindoles also affected hepatocarcinoma cells' metabolism, as evidenced by the stimulus of the basal state of respiration, the increased levels of lactate in the culture medium, as well by the depletion in ATP levels. Overall, the results support the cytotoxicity of the trifluormethylated selenylindol and thiophenylindol, by cell death associated with augmented ROS levels, impaired cell cycle progression and altered metabolism.

Key words: Cytotoxicity. Organoselenium. Organosulfur. Indole. Chalcogenylindoles. Hepatocarcinoma.

1 Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for the majority (over 80%) of primary liver cancer cases, and is estimated to be the fourth most common cause of cancer-related death worldwide. Its development is related to risk factors such as viral hepatitis B and C, cirrhosis, non-alcoholic fatty liver disease, diabetes, obesity, alcohol consumption, and exposure to mutagenic agents such as aflatoxin and aristolochic acid (Rawla et al., 2018; Yang et al., 2019). Most HCC cases are diagnosed at advanced stages and patients typically have poor survival outcomes (Rimassa; Pressiani; Merle, 2019). Overall, the five-year survival rates for HCC patients is inferior of 15% (El-Serag, 2011).

Treatment of HCC depends on correct stratification of the disease and classification according to staging systems, and might include: resection, ablation or transplantation, chemoembolisation and systemic therapy with sorafenib and lenvatinib as first-line drugs (Galle et al., 2018; Vogel et al., 2018). The side effects from systemic therapy affect the majority of patients, and vary from less adverse to more severe manifestations, that might culminate in overall physical health deterioration and death (Ganten et al., 2017; Ikeda et al., 2018; Kudo et al., 2018; Raoul et al., 2019). Because of these problems, there is an urge for new therapeutic options for HCC.

The advances in rational drug design, structure-activity relationship studies, combinatorial methods of synthesis, and synthesis/modification of complex natural products in an economic fashion, have contributed to the development of a variety of anticancer drugs (Denny, 2002). Among the different synthetic compounds that have been developed as emerging anticancer and antihepatocarcinoma agents, are included organoselenium, organosulfur and indole-containing compounds.

Selenium-containing compounds include a variety of different chemicals, which consist of both inorganic selenium species and organoselenium compounds. Organoselenium compounds comprise a wide range of chemically distinct structures (Bartolini et al., 2017). Generally, they are known for their antioxidant properties, which was first described for Ebselen, an isoselenazole with glutathione peroxidase-like activity (Müller et al., 1984). Nevertheless, numerous organoselenium species, including Ebselen, have been shown to exert pro-oxidant and cytotoxic activities in tumor cells, including hepatocarcinoma cells (Fan et al., 2014; Zhang et al., 2014a; Liu et al., 2015; Xu et al., 2016; Yang et al., 2016; Zeng et al., 2018). Their mechanism of action are varied, and might include activation of the intrinsic pathway of apoptosis, release of cytochrome C and depletion of the mitochondrial membrane potential (Chen et al., 2008; Zhang et al., 2014b; Liu et al., 2015; Chakraborty et al., 2016; Wu et al., 2018). As a result of these properties, organoselenium compounds have been investigated as potential adjuvants of chemotherapeutic drugs (Spengler et al., 2019).

Organosulfur compounds with anticancer activities are mainly represented by diallyl sulfides present in *Allium sativum*, which have been shown to induce cell cycle arrest, mitochondrial-dependent apoptosis, cell differentiation, ROS production, histone acetylation and inhibit cell invasion in tumor cells (Pratheeshkumar; Thejass; Kuttan, 2010; Iciek et al., 2012; Dasgupta; Sengupta, 2013; Yi; Su, 2013; Wang et al.,

2016), although other natural compounds in garlic, such as S-allylcysteine, have also shown antiproliferative and antimetastatic activities in hepatocellular carcinoma (Ng et al., 2012). They also comprise different sulfur synthetic compounds (e.g. allylthiopyridazines, benzothiazole-2-thiol derivatives and 1,3,4-oxadiazole-2-thiol) which exhibit antihepatocarcinoma activities both *in vitro* and *in vivo* through a variety of mechanisms (Lee et al., 2003; Shi et al., 2012; Gabry et al., 2017; Mo'men; Hussein; Kandeil, 2020). Additionally, the indole moiety also stands out as a common and versatile scaffold of many natural and synthetic anticancer agents, which exert their actions via various targets, such as histone deacetylases, sirtuins and DNA topoisomerases, and therefore this group has been widely explored in cancer drug design (Dadashpour; Emami, 2018). A series of indole-containing compounds displayed cytotoxic activities in hepatocarcinoma cells, promoting apoptosis, impairment of cell cycle progression, decreased angiogenesis, increase in oxidative stress markers and other effects (Li et al., 2015; Abdelmageed et al., 2016; Gao et al., 2018; Lee; Park; Nam, 2019).

In view of the favourable results previously demonstrated for the referred chemicals, this study proposed to investigate the potential cytotoxic effects of 2- and 3- selenylindoles and thiophenylindoles, which have not had their anticancer activities studied thus far, in hepatocarcinoma (HepG2) cells. Two derivatives, the trifluormethyl-substituted compounds, discerned as the most cytotoxic and induced cell death, had pro-oxidant effects, and altered cell cycle progression and mitochondrial bioenergetics on these cells.

2 Material and methods

2.1 Reagents and material

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), trypsin, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium bicarbonate, streptomycin, penicillin G, propidium iodide, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), hematoxylin, eosin, ribonuclease A (RNase A), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), tert-butyl hydroperoxide (TBHP), oligomycin, rotenone, antimycin A, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), glycine, β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD⁺), β -nicotinamide adenine

dinucleotide in reduced form (NADH) and L-lactic dehydrogenase from bovine heart were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Neon (Brazil), whereas formaldehyde, hydrazinium hydroxide, calcium chloride and sodium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Triton X-100 was purchased from Vetec (Brazil), acetone and xylol came from Fmaia (Brazil), glacial acetic acid came from Biotec (Brazil), picric acid was purchased from Nuclear (Brazil), and tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (tris-HCl) was obtained from Hexapur (Amsterdam, Netherlands). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco and supplied by Induslab (Brazil). Tissue culture materials (Greiner and JET Biofil) were also provided by Induslab. All other chemicals used were of analytical grade.

2.2 Chemical synthesis and preparation of stock solutions

The 2- and 3- selenylindoles and thiophenylindoles used in this study were synthesized according to Luz et al., 2019, based on a direct chalcogenylation of indoles from diorganoyl dichalcogenides catalyzed by iron (III) chloride and potassium iodide (FeCl_3/KI system). The chemical structures of the 15 chalcogenylindoles employed in the study are depicted in Figure 1, which were named from EQ-30 to EQ-44. All test compounds were prepared in 0.1 M stock solutions in DMSO, sterilized by 0.22 μm filtration and kept at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until use.

2.3 Cell culture

The hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil) and donated by the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (FCFRP-USP). The cells were maintained in DMEM high glucose medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, sodium bicarbonate (8 mM), penicillin G (100 UI/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$), pH 7.4, and were grown in tissue-culture treated polystyrene flasks, at $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , under controlled humidity.

2.4 MTT assay

The drug screening of the initial 15 selenylindoles and thiophenylindoles was performed using the MTT method (Mossman, 1983). Briefly, HepG2 cells (1×10^4)

were seeded in 96-well plates. The seeding density for all other experiments respected the same density proportion according to the surface area of the plate. After 24h of adhesion at 37°C, 5% CO₂, the culture medium was removed and the cells were incubated with the test compounds (at concentrations ranging from 10 to 100 µM) for 24h and 48h. Following the incubation in the cited conditions, the supernatant was removed and MTT (0.5 mg/mL in PBS) was added and incubated for 3h. Next, the formazan crystals were dissolved in DMSO. The optical density was measured at 550 nm on a microplate reader and the cell viability was determined in comparison with vehicle-only treated cells.

2.5 LDH release assay

HepG2 cells (1×10^4) were seeded in 96-well plates and incubated with the selected compounds for 24h and 48h. Then, the medium was collected and used for determination of the lactate dehydrogenase (LDH) activity, following the manufacturer's instructions of the kit (Interteck Katal, Brazil). Triton X-100 1% (v/v) was used as a positive control of increased membrane permeability.

2.6 Annexin V and propidium iodide (PI) staining

HepG2 cells (5.85×10^4) were seeded in 24-well plates and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48h. Next, the medium was collected and combined with the cells, which were harvested with trypsin. The suspension was centrifuged at 2500 rpm for 3 min, and the formed pellet was resuspended in 100 µL of binding buffer for annexin V (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ in PBS, pH 7.4) and transferred to FACS polystyrene tubes. Then, 2.5 µL of annexin V-FITC conjugate (BD Pharmingen) and 5 µL of PI (50 µg/mL) were added and the mixture was maintained for 15 min at the dark and room temperature. Following incubation, an additional 400 µL of binding buffer was added and the events (10.000) were recorded on a BD Accuri™ C6 Plus flow cytometer (FL-1 and FL-2 filters) (Vermes et al., 1995). Compensation settings of the two signals were performed using positive controls separately stained with annexin V alone (FL-1 filter), PI alone (FL-2 filter), and both markers.

2.7 Morphological analysis

Staining of HepG2 cells with hematoxylin and eosin for morphological analysis (Lillie; Fullmer, 1976) was carried out by seeding cells (5.85×10^4) in 24-well plates containing circular coverslips and incubating at 37°C, 5% CO₂ for 24h. Next, the medium was removed, cells were washed twice with PBS and fixed with Bouin's solution (formaldehyde, saturated picric acid and glacial acetic acid 4:15:1) for 5 min. The cells were then dehydrated in ethanol 70% and stained with hematoxylin for 1 min. The excess of dye was removed with water, and the cells were further stained with eosin for 30 sec. Finally, the excess of dye was removed with water, and the cells were successively dehydrated in solutions of pure acetone, acetone:xylene (2:1, 1:1 and 1:2) and pure xylene. The coverslips were mounted in slides with Entellan® for subsequent analysis on an optical microscope.

2.8 Measurement of reactive oxygen species (ROS) production

ROS levels were evaluated by measuring the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), a fluorescent compound that can be quantified in live cells (Rosenkranz et al., 1992). HepG2 cells (1×10^4) were seeded in black, clear-bottom, 96-well plates and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48h, in medium without phenol red. Tert-butyl hydroperoxide (TBHP) (400 µM) was used as a positive control for ROS production, 4h before the end of incubation. Following incubation, the medium was removed and DCFDA (20 µM in medium) was added for 45 min, at 37°C in the dark. Next, the fluorogenic dye was removed, the cells were washed with PBS, and PBS was subsequently added to the wells prior to the fluorescence reading. The fluorescence was measured in a microplate reader (Infinite® M200, TECAN, Switzerland) at 485 nm excitation and 520 nm emission, and normalized according to the cell viability results of a parallel MTT assay, in the same experimental conditions.

2.9 Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed by a flow cytometry method using propidium iodide staining for quantifying intracellular DNA (Fried; Perez; Clarkson, 1976). HepG2 cells (5.85×10^4) were seeded in 24-well plates and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24h. After incubation, the cells were harvested with trypsin, centrifuged at

2500 rpm for 3 min, and resuspended in PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 and 100 µg/mL RNase A. Then, the cells were transferred to FACS polystyrene tubes and stained with PI (final concentration of 50 µg/mL) for 30 min at the dark and room temperature, followed by analysis on a BD FACSCalibur™ flow cytometer. The events (10.000) were recorded in FL-2 filter using a linear scale, excluding the doublets.

2.10 Respiration analysis

For analysis of cell respiration, HepG2 cells (1.85×10^6) were seeded in 100 mm plates, and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24h. Then, the medium was collected and the cells were harvested with trypsin and counted in an automated cell counter (Countess® II FL – Invitrogen). The cell suspension (2×10^6 viable cells) was subsequently added to the chamber of a high-resolution respirometer (Oxygraph-2k, Oroboros® Instruments, Austria) for measurement of cell respiration, at 37 °C under gentle agitation. Cell respiration was determined in intact cells by monitoring oxygen consumption in the presence of endogenous cellular substrates (basal respiration), and after addition of 2.5 µM FCCP (uncoupled respiration). The oxygen flow in these states was corrected by subtracting non-mitochondrial respiration, which was obtained after the addition of rotenone (1 µM) and antimycin A (3 µg/mL) (Djafarzadeh; Jakob, 2017). The results are expressed as the oxygen flow per cells (pmol/min/ 10^6 cells).

2.11 Measurement of ATP levels

ATP levels were determined with an assay based on the light emission resulting from the reaction of ATP with D-luciferin, catalyzed by firefly luciferase (Turman; Mathews, 1996). HepG2 cells (1.2×10^5) were seeded in 12-well plates and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48h, in medium without phenol red. Following incubation, the cells were harvested with trypsin, and the cell content was divided in two aliquots and centrifuged at 2500 rpm for 3 min. One of the two aliquots was resuspended in cell medium without serum, transferred to a white 96-well plate, and the ATP concentration was determined following the manufacturer's instructions of the kit (Abcam), comparing with an ATP standard curve and recording the emitted luminescence in a microplate reader (Infinite® M200, TECAN, Switzerland). The second aliquot was resuspended in cold PBS with 10% RIPA buffer and subsequently

processed for protein quantification in the supernatant using the Bradford method (Bradford, 1976). The results are expressed as nmol ATP per mg of protein.

2.12 Measurement of lactate and pyruvate levels

The supernatants from HepG2 cells incubated with the test compounds for respiration experiments were collected (150 μL) for determination of lactate and pyruvate according to Gutmann and Wahlefeld (1974) and Czoc and Lamprecht (1974), respectively. Lactate levels were determined in a reaction system consisted of 1.5 mM NAD^+ and 1.5 U lactate dehydrogenase on a 0.1 M glycine and 0.4 M hydrazine buffer, pH 9.5 (final volume of 300 μL). Pyruvate levels were determined in a reaction system composed of 0.15 mM NADH and 0.1 U lactate dehydrogenase on a 0.1 M tris-HCl buffer, pH 7.4 (final volume of 300 μL). The systems were maintained at 37°C, and NADH formation and NADH oxidation were spectrophotometrically determined at 340 nm for 90 min and 20 min, respectively. Lactate and pyruvate concentrations were calculated from the molar extinction coefficient of NADH ($\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) and normalized according to the viable cells counting.

2.13 Statistical analysis

The results are expressed as values of mean $\pm$ standard deviation (SD) of mean, and the statistical analysis was conducted by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) values of the drug screening were calculated by nonlinear regression.

3 Results

3.1 Cellular viability assays

The chemical structures of the 15 compounds tested are depicted in Figure 1. We identified EQ-34 (3-(3-trifluormethyl)phenylselenyl-1*H*-indole) and EQ-41 (3-(3-trifluormethyl)phenylthio-1*H*-indole), the two representants containing a 3-trifluormethyl substitution on the phenol ring, as the most potential cytotoxic compounds for the HepG2 cell line according to the MTT assay. Therefore, further experiments were restricted to EQ-34 and EQ-41.

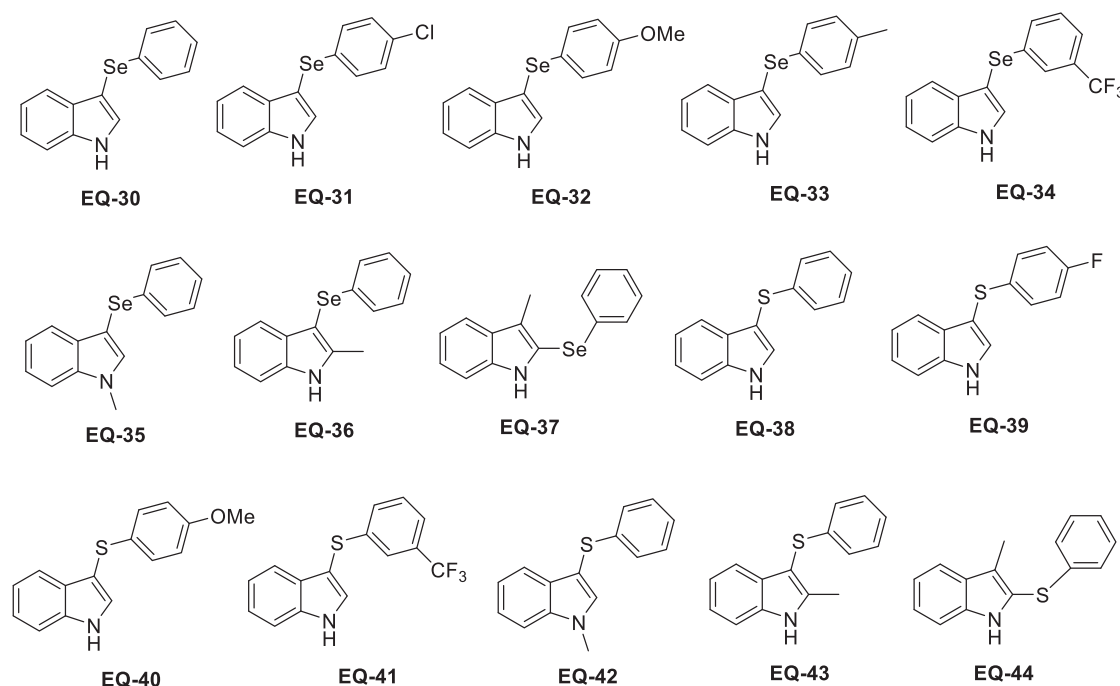


Figure 1. Chemical structures of the 2- and 3- selenylindoles and thiophenylindoles evaluated in the study. The compounds were named accordingly from EQ-30 to EQ-44.

At 24h, both compounds (20 μ M) significantly reduced HepG2 cells viability, while at 48h, the decrease in viability already began at concentrations of 10 and 15 μ M for EQ-34 and EQ-41, respectively (Figure 2). The CC₅₀ values of EQ-34 in HepG2 cells were determined as 42.9 and 32.0 μ M at 24h and 48h, respectively, and of EQ-41 as 44.8 and 30.3 μ M.

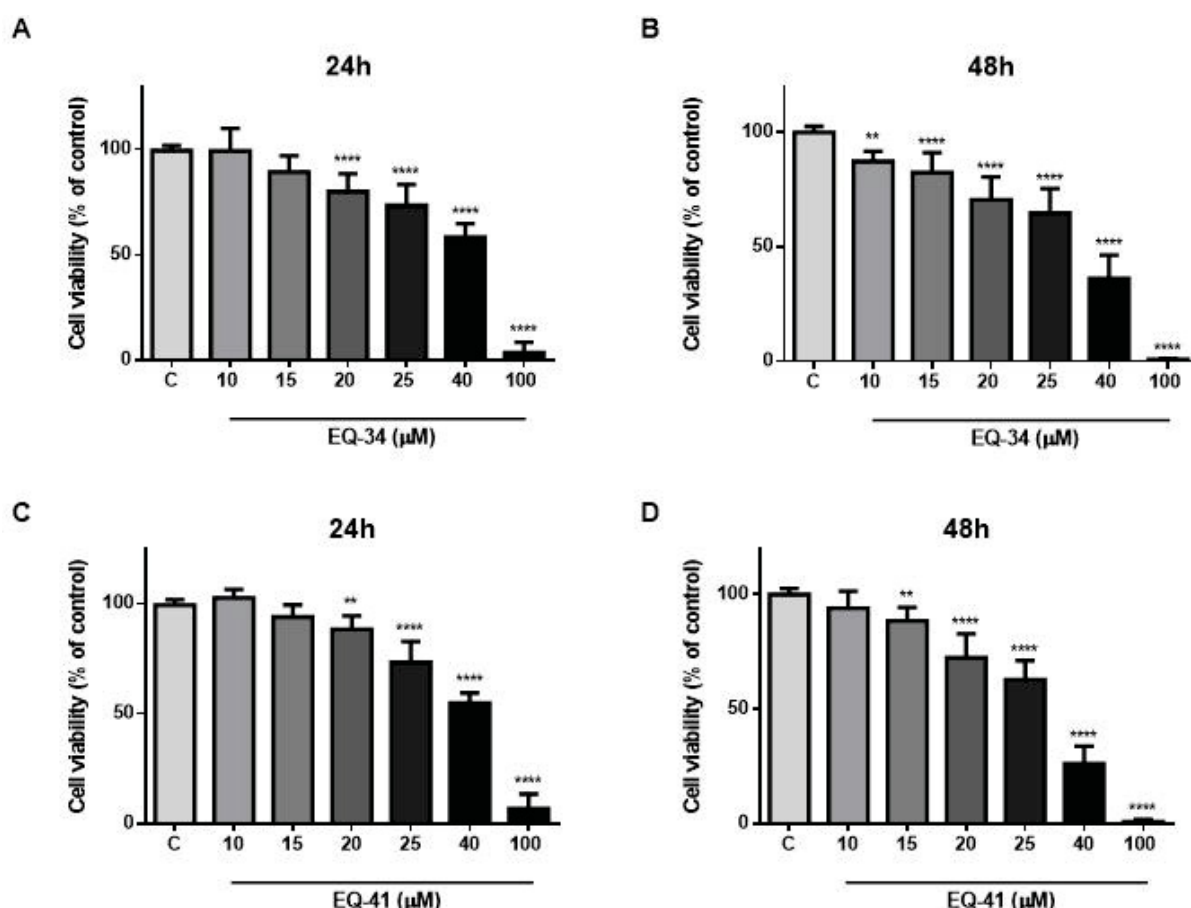


Figure 2. Effects of EQ-34 and EQ-41 on the cell viability of hepatocarcinoma cells. HepG2 cells were incubated with EQ-34 for 24h (A) and 48h (B), or with EQ-41 for 24h (C) and 48h (D), and after the period of incubation, the cell viability was assessed by the MTT method. Values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments in triplicate. ** and **** denote values significantly different from the control (incubated with DMSO only) at $p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively.

The effect of EQ-34 and EQ-41 on the viability of HepG2 cells was confirmed by the determination of LDH activity in the supernatant of the cells incubated with the compounds, which is proportional to alterations in the cell membrane permeability (Korzeniewski; Callewaert, 1983). As demonstrated in Figure 3, EQ-34 and EQ-41 were able to increase the release of LDH from HepG2 cells. This effect was observed for both compounds from 25 μM after 24h, and at 15 μM and 20 μM for EQ-34 and EQ-41, respectively, after 48h. The maximum activity of the enzyme in the culture medium reached up to 175% and 195%, respectively, with the highest concentration of the compounds (40 μM).

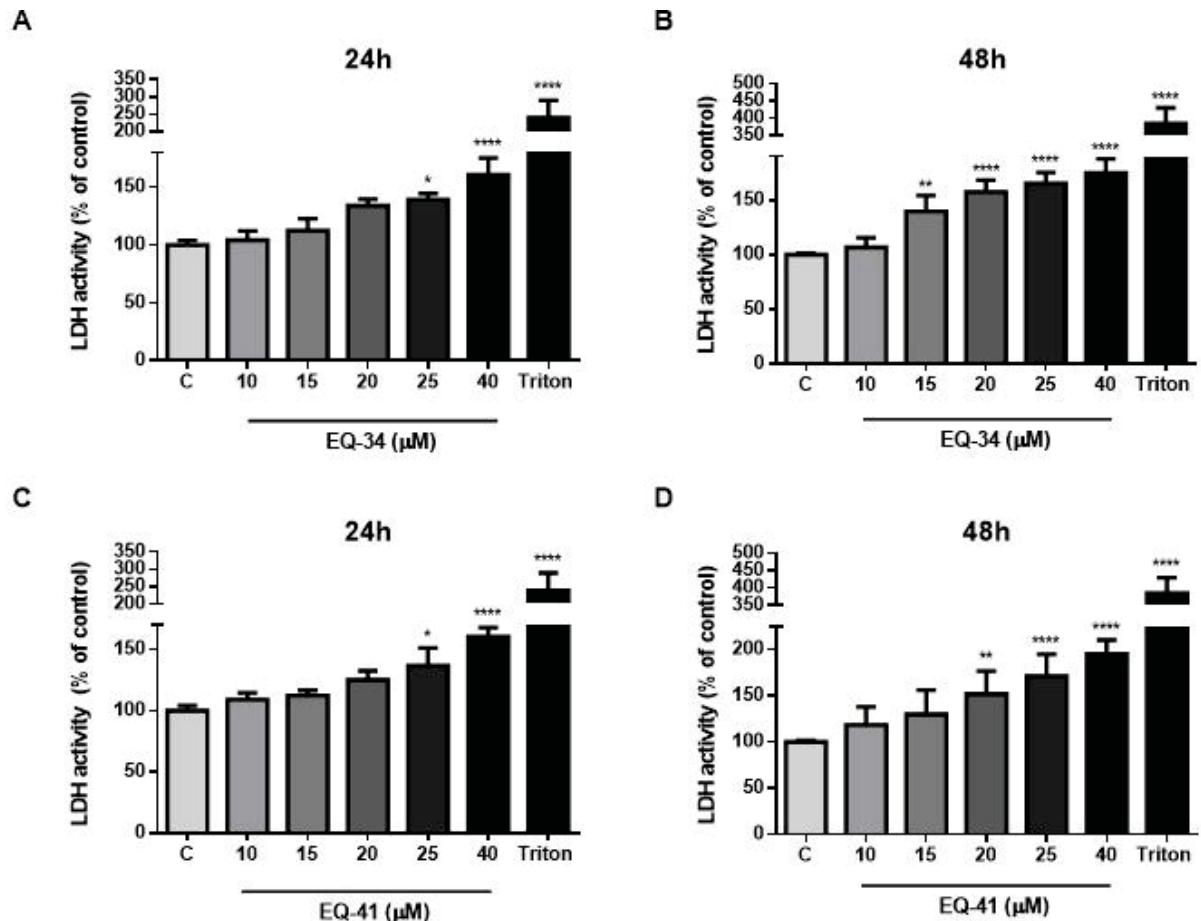


Figure 3. Influence of EQ-34 and EQ-41 on the release of LDH by hepatocarcinoma cells. HepG2 cells were incubated with EQ-34 for 24h (A) and 48h (B), or with EQ-41 for 24h (C) and 48h (D), and after the period of incubation, the supernatant was collected and LDH activity was determined following manufacturer's instruction of the kit. 100% correspond to 48.4 ± 6.5 U/L (24h) and 44.2 ± 2.7 U/L (48h). Triton X-100 1% was used as a positive control of increased membrane permeability. Values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments in triplicate. *, ** and **** denote values significantly different from the control (incubated with DMSO only) at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively.

3.2 Morphological analysis and cell death assay

The morphological features observed in HepG2 cells stained with hematoxylin and eosin reinforce the cytotoxicity of EQ-34 and EQ-41 (Figure 4). The images evidence the loss of epithelial-like morphology towards a more rounded shape, an altered cell volume (shrinkage and swelling), the presence of plasma membrane blebs, numerous immature cells with basophilic cytoplasm, and increased vacuolization after incubation of EQ-34, which were already evident at the lowest concentration (10 μ M). A similar profile was observed for EQ-41 (data not shown).

These alterations are consistent with cytotoxicity and possible induction of cell death triggered by both compounds.

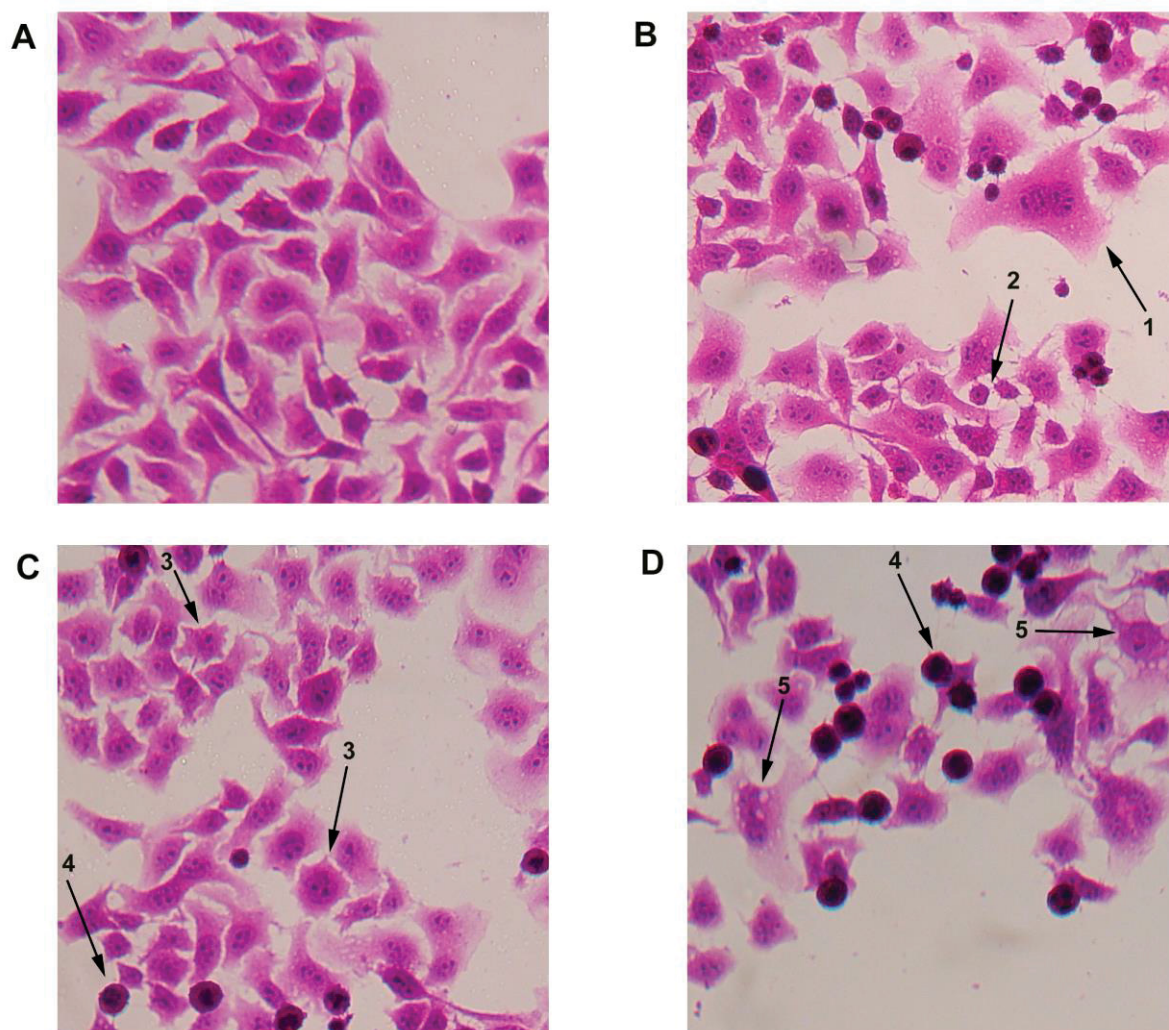


Figure 4. Morphological analysis of HepG2 cells incubated with EQ-34 for 24h and stained with hematoxylin and eosin. (A) Control cells. (B) Cells incubated with 10 μ M EQ-34. (C) Cells incubated with 15 μ M EQ-34. (D) Cells incubated with 20 μ M EQ-34. The arrows represent some of the main morphological alterations found, including: altered cell volume, with both increased volume (1) and shrinkage (2), presence of membrane blebbing (3), increased presence of highly basophilic cells (4), and vacuolization (5), visualized at 40x objective (total magnification of 400x). The micrographs are representative of three independent experiments in duplicate.

Moreover, staining with annexin V and PI and analysis by flow cytometry revealed that both compounds (20 μ M) promoted HepG2 cells death after 48h incubation, as demonstrated by annexin V binding to phosphatidylserine (PS) exposed at the external surface of the cell and PI binding to intracellular DNA, reflecting the increased membrane permeability. Approximately 9% of cells were

positive for annexin V staining, while over 22% and 13% of cells were stained with PI, or both annexin V and PI, respectively.

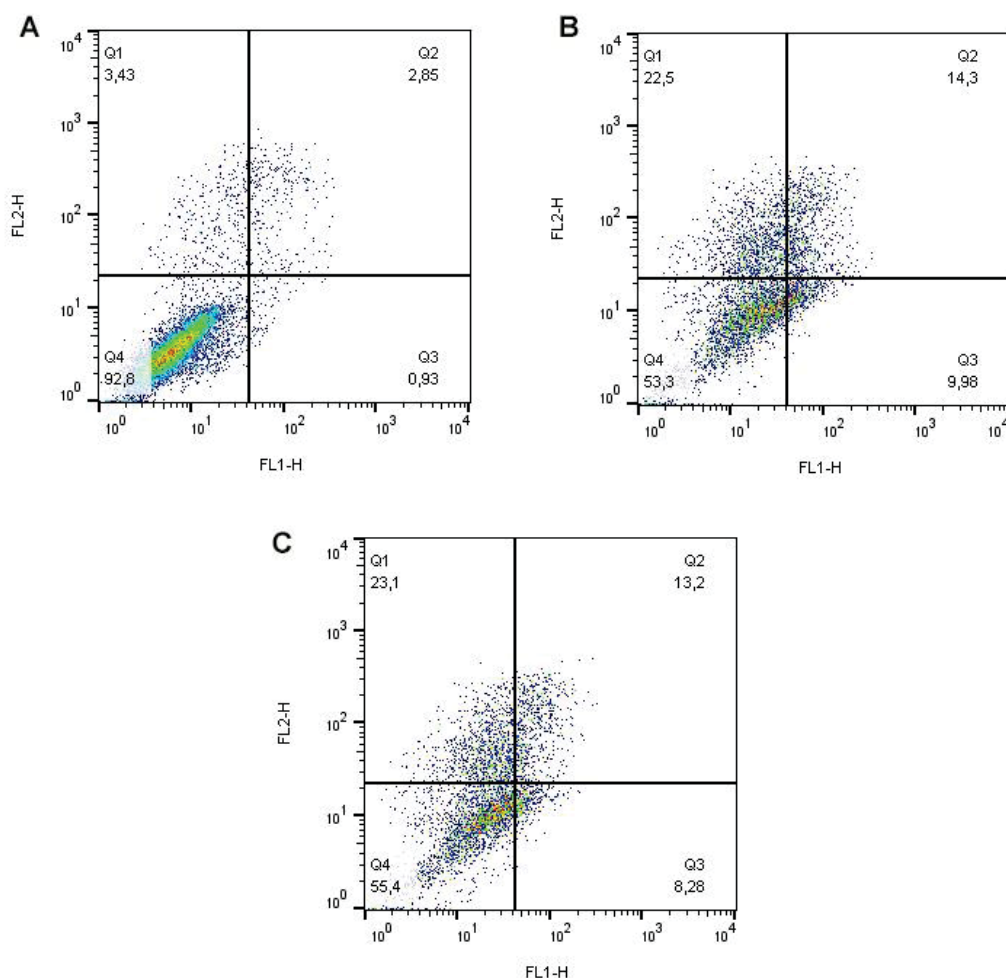


Figure 5. Cell death evaluation by annexin V and propidium iodide staining assay. Representative density plot histograms of flow cytometry analysis of HepG2 cells incubated with DMSO (A), EQ-34 (20 μ M) (B) and EQ-41 (20 μ M) (C) for 48h. The results are representative of three independent experiments and are expressed as log annexin V fluorescence intensity (x-axis, or FL1-H) and log propidium iodide intensity (y-axis, or FL2-H). The left lower quadrant represents the percentage of viable cells, the right lower quadrant indicates annexin V+/PI- cells, the left upper quadrant represents annexin V-/PI+ cells, and the right upper quadrant shows the proportion of annexin V+/PI+ cells.

3.3 Reactive oxygen species levels

Given that both EQ-34 and EQ-41 were capable of inducing cell death in HepG2 cells, it was evaluated whether this could be associated with an increase in intracellular ROS, as previously described for organoselenium and organosulfur compounds with anticancer activities (Yang; Shen; Ong, 2000; Iciek et al., 2012; Zhang et al., 2014a). As shown in Figure 6, incubation with EQ-34 and EQ-41 significantly augmented ROS levels in HepG2 cells after the 48h incubation, starting

at the 15 μ M concentration for EQ-34 and at the 25 μ M concentration for EQ-41. ROS levels were over 2-fold increased in comparison to the control, at the highest concentration of both compounds.

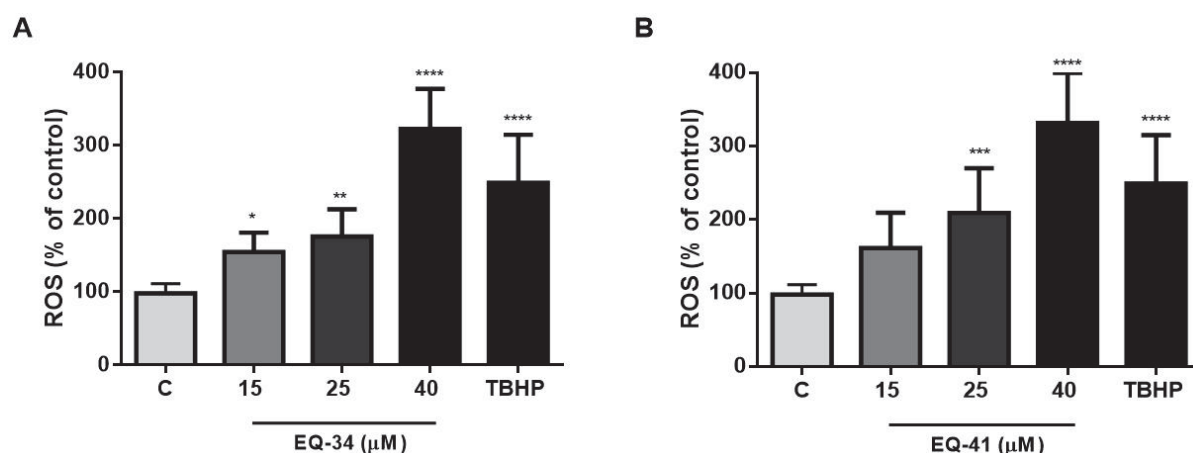


Figure 6. ROS levels in hepatocarcinoma cells following incubation with EQ-34 and EQ-41. HepG2 cells were incubated with EQ-34 (A) and EQ-41 (B) for 48h, and after the period of incubation, intracellular ROS was fluorescently quantified by measuring the oxidation of DCFDA to DCF and normalized with the MTT assay. TBHP (400 μ M) was used as a positive control of increased ROS production, and incubated 4h prior to the end of the experiment. Values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments in triplicate. *, **, *** and **** denote values significantly different from the control (incubated with DMSO only) at $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively.

3.4 Cell cycle and DNA fragmentation

Considering that cell death is one of the possible fates that may occur following impairment of cell cycle progression (Wiman; Zhivotovsky, 2017), the effects of the trifluormethyl-substituted compound on the cell cycle progression were evaluated using propidium iodide staining and flow cytometry analysis. This assay is based on the quantification of intracellular DNA, which is proportional to the different stages of the cell cycle (Figure 7A).

Figure 7 represents the DNA fragmentation levels (7B and 7D) and the proportion of cell cycle distribution (7C and 7E) of HepG2 cells following 24h of incubation. For both compounds, there was an increase (approximately 21%) in DNA fragmentation levels (cells in sub- G_1 phase) with the 20 μ M concentration. There was also a marked increase in the proportion of cells at the G_2/M phases of the cell cycle, reaching 56% and 44% for EQ-34 and EQ-41, respectively, with a concomitant reduction of cells at the G_0/G_1 phases. Experiments carried out with 48h of incubation, conversely, revealed approximately 46,5% and 55% of DNA fragmentation and a

reduction in the proportion of cells at the G₂/M phases to 15% and 12% for EQ-34 and EQ-41, respectively, at 20 μ M (data not shown).

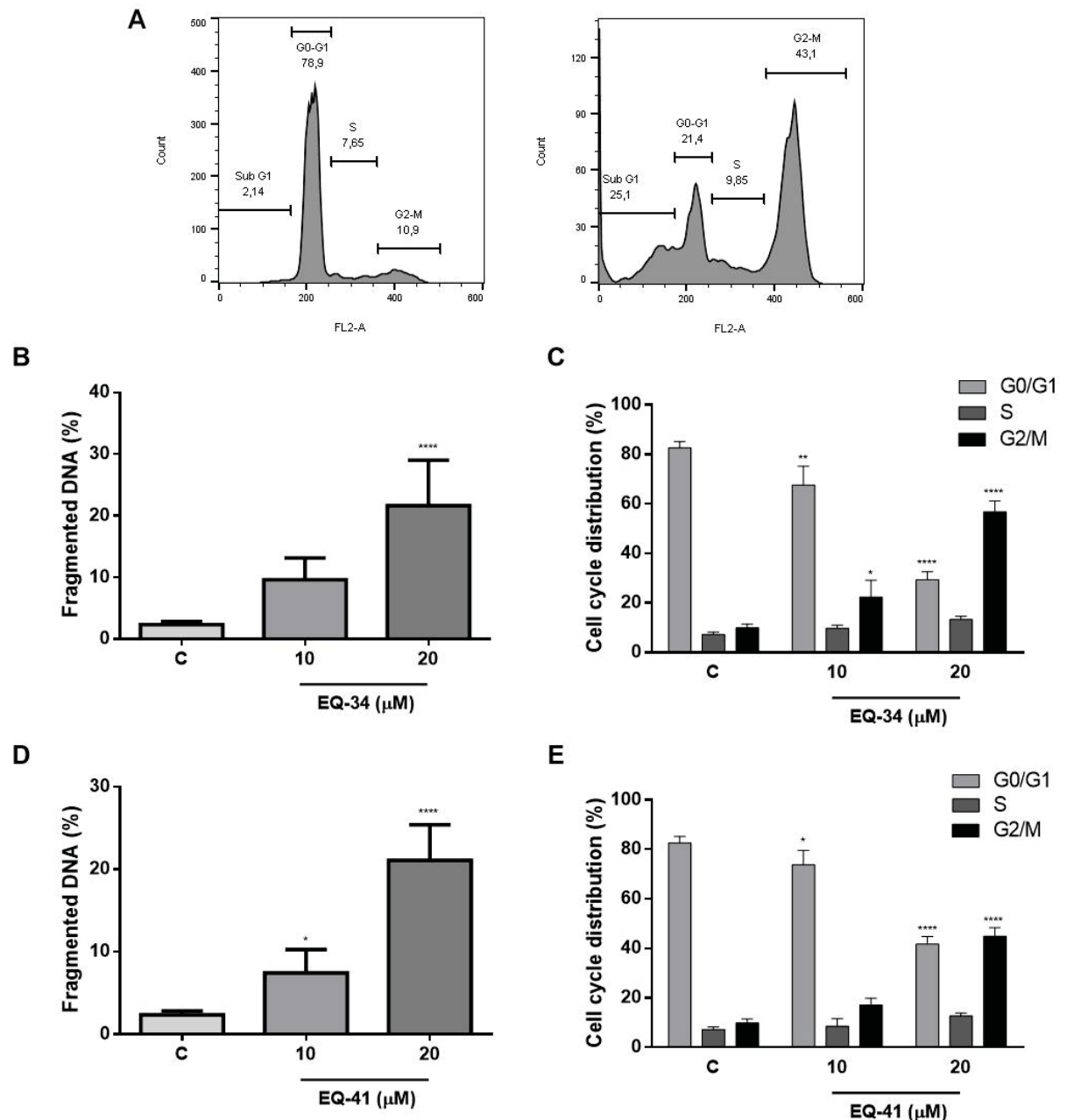


Figure 7. Effects of EQ-34 and EQ-41 on the cell cycle distribution of hepatocarcinoma cells and DNA fragmentation levels. HepG2 cells were incubated with the compounds for 24h, and cells were then collected, resuspended in PBS containing 0.1% Triton X-100 and 100 μ g/mL RNase A and stained with 50 μ g/mL propidium iodide (15 min) for flow cytometry analysis. (A) Representative cell cycle histograms of control cells (left) and cells incubated with 20 μ M EQ-34 (right). (B) DNA fragmentation levels and (C) cell cycle distribution of cells incubated with EQ-34. (D) DNA fragmentation levels and (E) cell cycle distribution of cells incubated with EQ-41. Values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments in duplicate. *, ** and **** denote values significantly different from the control (incubated with DMSO only) at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively.

3.5 Cell respiration

Figure 8 shows the effects of the compounds on the respiration of intact HepG2 cells. A representative trace is shown in Figure 8A, where the blue line represents the oxygen concentration (nmol/mL) in the oxygraph chamber and the red line represents the oxygen flow per cell (pmol/s/10⁶ cells).

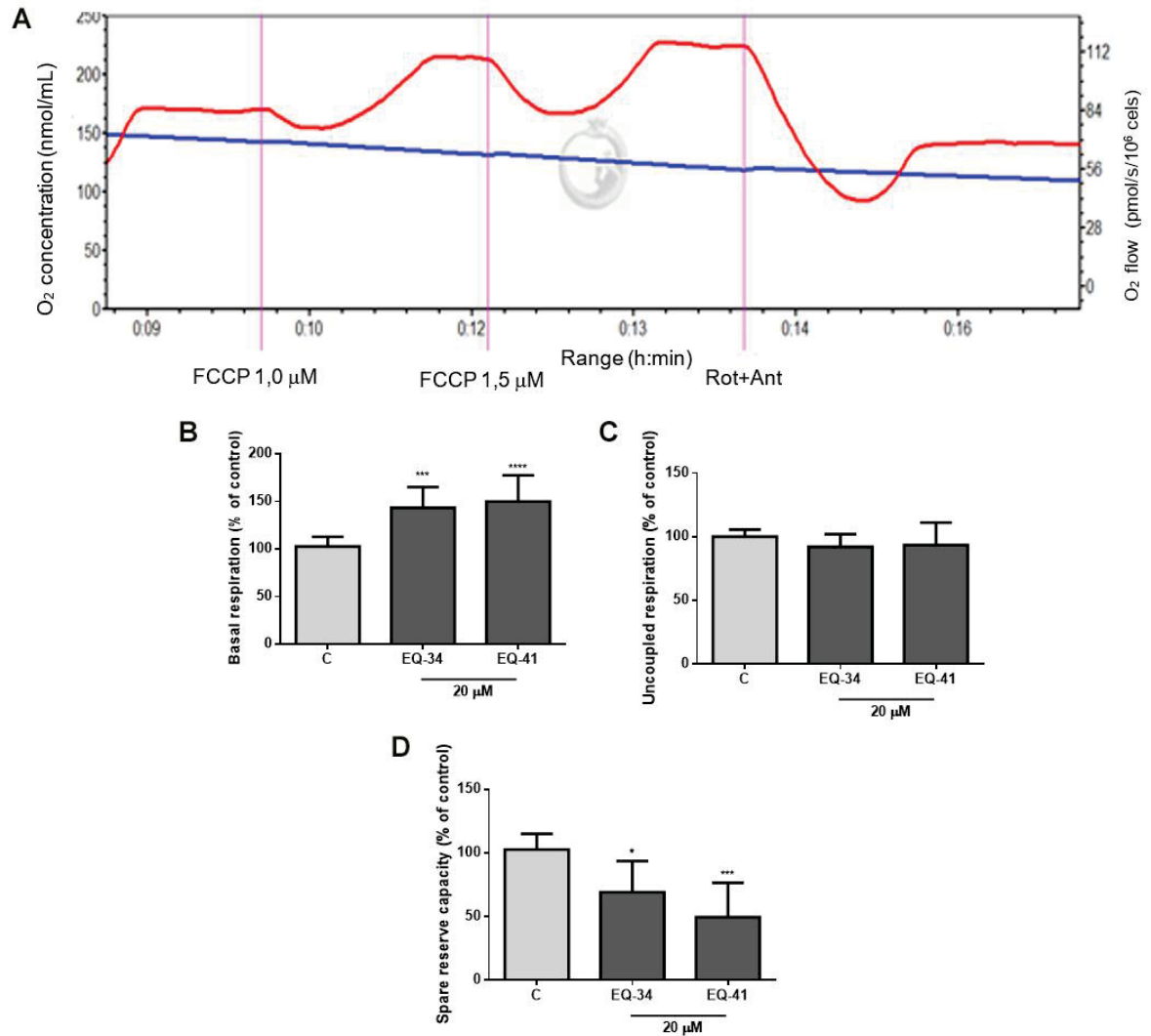


Figure 8. Effects of EQ-34 and EQ-41 on the respiration of hepatocarcinoma cells. HepG2 cells were incubated with EQ-34 and EQ-41 for 24h, harvested and added (2×10^6 viable cells) to the oxygraph chamber. (A) Representative curve of HepG2 cells respiration (the blue line represents oxygen concentration in nmol/mL and the red line represents the oxygen flow per cell in pmol/s/10⁶ cells). Basal respiration (B) was determined by monitoring oxygen consumption in the presence of endogenous substrates. 100% correspond to 19.4 ± 5.1 pmol/s/10⁶ cells. Uncoupled respiration (C) was determined in the presence of 2.5 μ M FCCP. 100% correspond to 38.3 ± 7.3 pmol/s/10⁶ cells. The spare reserve capacity (D) was calculated from subtracting basal respiration from maximum respiration. 100% correspond to 20.3 ± 3.9 pmol/s/10⁶ cells. All values were subtracted from non-mitochondrial respiration (respiration in the presence of 1 μ M rotenone and 3 μ g/mL antimycin A). Values represent the mean $\pm$

SD of four independent experiments in duplicate. *, *** and **** denote values significantly different from the control (incubated with DMSO only) at $p < 0.05$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively.

Both compounds (20 μ M) significantly increased (43% and 50%, respectively, for EQ-34 and EQ-41) basal respiration after 24h, suggesting that they can stimulate the electron transport of HepG2 respiratory chain (Figure 8B). However, in the presence of FCCP, no differences in cell respiration were found (Figure 8C). As a result, treated cells presented the spare reserve capacity (calculated by subtracting the basal respiration from maximum respiration) reduced by 31% and 51%, which reflect the cells' inability to increase their respiration in response to the uncoupler (Figure 8D).

3.6 Lactate, pyruvate and ATP levels

Regarding the other effects of the trifluormethylated compounds on metabolism, there was a significant increase (19% and 26%, respectively, for EQ-34 and EQ-41) in lactate levels on the supernatant of incubated cells after 24h (Figure 9). No statistical difference was found in pyruvate levels. The results suggest that not only oxidative phosphorylation, but also cellular glycolytic rates, might be stimulated in HepG2 cells in response to the chalcogenylindoles.

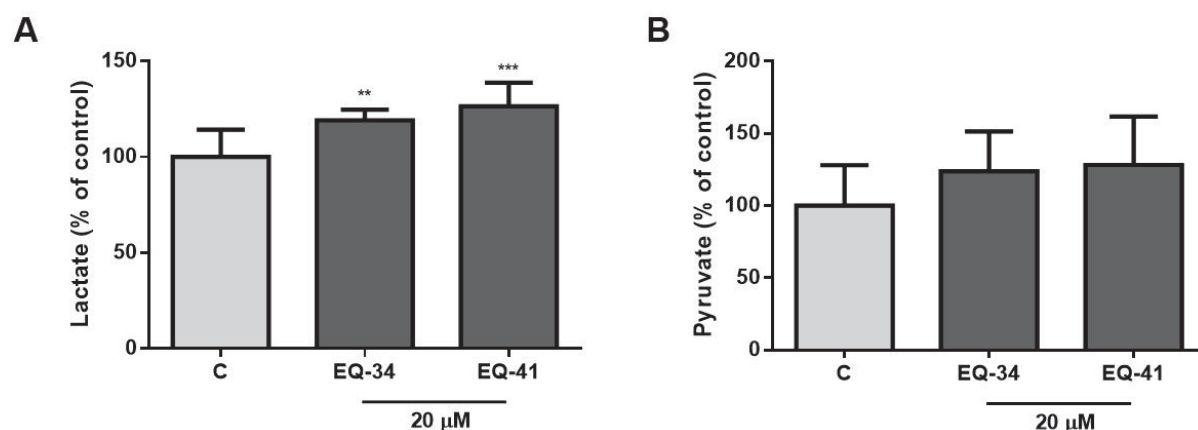


Figure 9. Lactate and pyruvate levels on the supernatant of HepG2 cells incubated with EQ-34 and EQ-41. The supernatant from HepG2 cells incubated for respiration experiments (24h) were collected and quantified for determination of lactate (A) and pyruvate (B) levels, using enzymatic reaction systems based on the oxidation of NADH or reduction of NAD^+ catalyzed by lactate dehydrogenase. Lactate and pyruvate levels in the supernatant were normalized according to viable cell numbers. 100% correspond to 0.28 ± 0.05 mM lactate/ 10^6 cells and 0.042 ± 0.012 mM pyruvate/ 10^6 cells. Values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments in triplicate. ** and *** denote values

significantly different from the control (incubated with DMSO only) at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Nevertheless, as shown in Figure 10, there was a pronounced reduction (~70%) on intracellular ATP levels after 48h exposure to the test compounds. This result evidences a marked depletion of the cellular energetic content, despite the increase in lactate levels and increase in basal respiration, indicating the inability of the oxidative phosphorylation and glycolysis in restoring normal ATP levels.

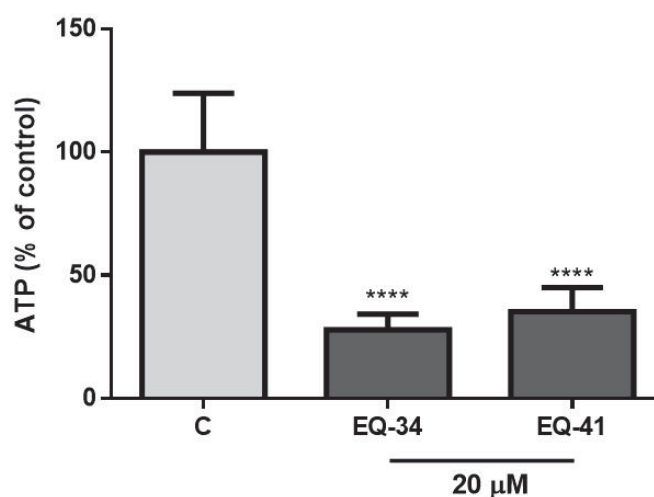


Figure 10. Intracellular ATP levels of hepatocarcinoma cells incubated with EQ-34 and EQ-41. HepG2 cells were incubated with EQ-34 for 48h, harvested and intracellular ATP levels were determined using a commercial kit, using an ATP standard curve. ATP levels were normalized by protein levels, quantified with the Bradford assay. 100% correspond to 2.5 ± 1.0 nmol ATP/mg protein. Values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments in triplicate. **** denote values significantly different from the control (incubated with DMSO only) at $p < 0.0001$.

4 Discussion

Fifteen selenylindoles and thiophenylindoles were obtained using a protocol of synthesis from diorganoyl dichalcogenides and indoles derivatives using a Fe(III)/KI system (Luz et al., 2019) for the purpose of evaluating their biological activities. They were screened on HepG2 cells, which are an important *in vitro* model for the evaluation of anti-hepatocarcinoma properties and have been employed in the study of other analogous compounds (Iciek et al., 2012; Yang et al., 2012; Fan et al., 2014; Zhang et al., 2014c; Abdelmageed et al., 2016; Gao et al., 2018). In previous studies designed to address the cytotoxicity of organoselenides in both HepG2 and MCF-7

(breast adenocarcinoma) lineages, Shaaban et al. (2016, 2019) demonstrated that the anticancer activity of the evaluated compounds was more pronounced in hepatocarcinoma rather than breast cancer cells, suggesting a possible increased responsiveness of these cells to organoselenium compounds.

In the present study, a cell viability (MTT) assay was used for screening of the selenylindoles and thiophenylindoles, which revealed two compounds with superior cytotoxic potential on hepatocarcinoma cells, EQ-34 (3-(3-trifluormethyl)phenylselanyl-1*H*-indole) and EQ-41 (3-(3-trifluormethyl)phenylthio-1*H*-indole), the trifluormethyl-substituted derivatives. Their CC₅₀ obtained values were of 42.9 and 32.0 μ M at 24h and 48h for EQ-34, and of 44.8 and 30.3 μ M for EQ-41, respectively. These values were significantly lower in comparison with the prototype unsubstituted molecules (EQ-30 and EQ-38), that presented CC₅₀ values of 82.3 and 47.2 μ M, and 81.1 and 48.0 μ M, respectively. The organoselenium and organosulfur compounds which only had a single chlorine or fluorine atom (EQ-31 and EQ-39) also did not show good cytotoxic responses, displaying higher CC₅₀ values, of 62.8 and 47.2 μ M for EQ-31, and > 100.0 and 90.4 μ M for EQ-39.

The incorporation of fluorine atoms in drug design is a common approach in medicinal chemistry. Fluorine substitution might disturb the molecule's pK_a value, modulate its lipophilicity, induce conformational changes (specially following drastic steric changes imposed by trifluormethyl groups), as well as favour hydrogen bonding and electrostatic interactions. As a result, the binding affinity with the target protein, membrane permeability, and overall pharmacokinetic properties of the molecule are significantly altered. Additionally, it might also confer drugs enhanced metabolic stability by preventing its oxidative metabolism (Purser et al., 2008). However, as demonstrated by the low cytotoxicity of EQ-31 and EQ-39, those enhanced biological activities in chalcogenylindoles could only be achieved by incorporation of trifluormethyl moieties and not by addition of a single halogen.

The quantification of the activity of released LDH was also performed as an additional cellular viability assay. LDH is a stable, cytoplasmic enzyme, that is rapidly released into the cell culture supernatant when the plasma membrane is damaged or permeabilized (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018). EQ-34 and EQ-41 promoted up to 75% and 95% increase in the enzyme activity, respectively, supporting the induced alterations in membrane permeability by the compounds. Significant increase in LDH

leakage with Se-containing and sulfur-containing compounds was also described in experiments with different lineages, such as with Ebselen (20 μ M) in C6 glioma cells, which induced 60% release after 3h incubation (Shi et al., 2006), selenite (50 μ M) in HL-60 promyelocytic leukemia cells, which promoted ~80% release after 24h (Kim et al., 2001), and diallyl disulfide (100 μ M) in PC-3 prostate cancer cells, that released up to ~50% of LDH after 24h and 48h (Arunkumar et al., 2005).

In agreement with cytotoxic effects, EQ-34 and EQ-41 induced the formation of membrane blebs and cell shrinkage in hepatocarcinoma cells after 24h, which are morphological features characteristic of cell death by apoptosis (Ziegler; Groscurth, 2004). Morphology changes were also observed in HepG2 cells following exposure of 75 μ M Ebselen for 12h, exhibiting cell shrinkage, membrane blebbing, chromatin condensation and formation of apoptotic bodies (Yang; Shen; Ong, 2000), and after incubation with 100 μ M diallyl disulfide for 24h, which promoted nuclear fragmentation and chromatin condensation (Wen et al., 2004), illustrating the cytotoxic effects mediated by other selenium and sulfur compounds.

Cell death was confirmed by the staining of cells with annexin V and PI and further detection with flow cytometry. Staining with the dyes confirmed that the EQ-34 and EQ-41 induced cell death by mechanisms involving both PS translocation to the outer leaflet of the membrane and the loss of membrane integrity, that are classical of apoptotic and necrotic deaths (Vermes et al., 1995; Vermes; Haanen; Reutelingsperger, 2000). Similar profiles were also observed in hepatocarcinoma cells for other organoselenium, organosulfur and indolic compounds, which also promoted increased DNA fragmentation, caspase 3 activity, p53 phosphorylation and cleaved poly-ADP ribose polymerase (PARP) (Ng et al., 2012; Lee et al., 2018; Zheng et al., 2018). Overall, these findings support the cell death promoted by the investigated drugs.

Because elevated ROS levels can induce tumor cell death, pro-oxidants compounds that either increase ROS generation and/or inhibit antioxidant defenses are effective in both eliminating cancer cells and overcoming resistance to chemotherapy (Galadari et al., 2017; Snezhkina et al., 2019). ROS quantification with the DCFDA assay showed that EQ-34 and EQ-41 had pro-oxidant effects, as evidenced by an increase of over 2-fold in ROS levels after 48h. It remains to be

determined whether the elevated levels are a direct result of ROS production, of a depletion of cellular antioxidants, or both mechanisms.

ROS levels must be kept in a tight balance between its production and scavenging antioxidants systems in order to support tumorigenesis (Cairns; Harris; Mak, 2011). At low levels, ROS is required for cell proliferation and survival (Lee et al., 2002), while at moderate levels it induces expression of stress-responsive genes, such as HIF1A, which increases expression of pro-survival signals, such as the glucose transporter GLUT1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Xia et al., 2007; Paik et al., 2016). On the other hand, high levels of ROS are detrimental and might cause damage to DNA and other macromolecules, induce senescence, or permeabilize the mitochondria, leading to the release of cytochrome C and apoptosis (Petrosillo; Ruggiero; Paradies, 2003; Takahashi et al., 2006).

Pro-oxidant effects associated with the cytotoxicity of organoselenium and organosulfur compounds were described by other studies. Iciek et al. (2012) demonstrated that the antiproliferative effects and induction of apoptosis promoted by diallyl trisulfide in HepG2 cells were associated with an increase in hydrogen peroxide levels and a depletion in thiol species, such as glutathione. Moreover, selenocysteine, methylseleninic acid and a selenadiazole derivative, have been shown to elevate ROS levels and potentiate the cytotoxic effects of the chemotherapeutic agents doxorubicin and cisplatin in HepG2 cells. The rise in ROS levels were associated with downregulation of phosphorylated AKT and ERK and increased DNA damage (Fan et al., 2014; Liu et al., 2015; Zhang et al., 2014b), mechanisms that appear to play a crucial role in the synergistic effects of Se-compounds with classical anticancer agents. PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways are also target of indole-containing compounds (Abdelmageed et al., 2016; Gao et al., 2018), raising their attention as potential targets of selenylindoles and thiophenylindoles.

Drugs that target cell cycle progression and/or cell cycle proteins have also been investigated as promising molecules in cancer therapy (Otto; Sicinski, 2017). Cell cycle progression is controlled by three main checkpoints that determine if cell division can occur. In the DNA damage response, a start checkpoint at the G₁/S phases might be activated to prevent DNA replication and further cell cycle events. However, if the cells have a defective checkpoint in these stages, often because of p53 pathway mutations, the G₂/M checkpoint, which is predominantly regulated by the Cyclin B-Cdc2 (CDK1) complex, can also prevent cells from entering mitosis when

DNA is damaged, thus providing a new opportunity for DNA repair by stopping the proliferation of damaged cells. If the damage cannot be repaired, cells might undergo senescence or cell death (Allday et al., 1995; Stark; Taylor, 2004; Visconti; Monica; Grieco, 2016).

The results of the present study showed that both selected compounds impaired cell cycle progression at G₂/M phases after 24h. The cells also had increased DNA fragmentation levels, an important marker of apoptosis (Hua; Xu, 2000). Impairment of cell cycle progression in HepG2 cells at G₂/M phases was also observed with Butaselen (Zheng et al., 2018), a chalcone derivative containing indole moiety (Wang; Peng; Li, 2019), and an organosulfur derivative of 6-mercaptopurine (Yang et al., 2012). Since the levels of DNA fragmentation were significantly higher after 48h of incubation with EQ-34 and EQ-41, it is likely that cells halted at G₂/M were excessively damaged and could not be repaired, ultimately leading to cell death.

Different organoselenium and organosulfur compounds have been shown to exert their apoptotic effects via mitochondria. Reduced mitochondrial membrane potential, decreased Bcl-2 and Bcl-xL expression or increased Bax/Bcl-2 ratio, and increased caspase 9 activity are included among the main effects observed in hepatocarcinoma cells (Shiah et al., 2007; Ng et al., 2012; Yang et al., 2012; Guo et al., 2013; Tong et al., 2014; Zhang et al., 2014b; Wu et al., 2018). Moreover, ROS generated by organoselenium compounds have been found to induce the mitochondrial membrane permeability transition, causing the release of cytochrome C and the activation of the intrinsic apoptotic pathway (Wallenberg; Misra; Björnstedt, 2014; Chen et al., 2020), which might be associated with their thiol-oxidation capacities (Kim; Yun; Kim, 2003). Therefore, considering the mitochondria as potential targets of these compounds, we investigated the role of the selenylindol and thiophenylindol on mitochondrial and cellular bioenergetics.

The mitochondrial effects of the trifluoromethylated derivatives was first evaluated by the analysis of cell respiration. Respiration experiments showed that both compounds stimulated basal respiration after 24h, as evidenced by an increased oxygen consumption of HepG2 cells. To our knowledge, this is the first work that shows the effects of an organoselenium, organosulfur or indolic compound on the respiration of hepatocarcinoma cells. Additionally, lactate and pyruvate levels were also quantified to collect information of the glycolytic status of the cell. A significant rise in lactate levels in the culture medium was observed, suggesting that the test

compounds might stimulate both cellular glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation. However, it is not clear whether the increase in lactate levels is necessarily related to an overall higher glycolytic flow, or if it might be associated with an augmented lactate secretion by monocarboxylate transporters (MCTs), many of which have been found to be upregulated in cancer (Payen et al., 2020), including MCT-4 in hepatocarcinoma (Alves et al., 2014).

Finally, to provide a general picture of the energetic content of the cell, the ATP intracellular content was also evaluated. The results showed that ATP levels were almost 3-fold reduced following 48h incubation with EQ-34 and EQ-41. Similarly, Li et al. (2015) also observed a decrease in approximately 66% of intracellular ATP levels after 48h incubation of HepG2 cells with a novel indole compound (60 μ M).

Considering that even though the chalcogenylindoles appear to stimulate the oxidative phosphorylation and glycolysis pathways, there was still a marked reduction in ATP levels, a likely hypothesis is that these cells are not effectively synthesizing ATP through mitochondrial respiration. This might be attributed to a possible uncoupler effect on oxidative phosphorylation elicited by the compounds. Accordingly, a recent study demonstrated that an indolic derivative has uncoupling effects on the mitochondria, which confers it an anticancer activity in gastric carcinoma cells. This uncoupling effect was also associated with a significant reduction (~50%) on ATP intracellular content, a depletion in mitochondrial membrane potential and increased cytochrome C release (Wang et al., 2018). In light of these observations, further experiments are required to clarify the metabolic alterations induced by the chalcogenylindoles, and whether they include uncoupling of the electron transport chain.

5 Conclusion

In conclusion, the cytotoxicity and cell death promoted by EQ-34 and EQ-41 on hepatocarcinoma HepG2 cells are associated with increased ROS levels, DNA fragmentation, impaired cell cycle progression, and alterations on the mitochondrial bioenergetics. Further studies involving the in-depth mechanism of action and possible antitumoral effects of the 3-chalcogenylindoles are still necessary to support their therapeutic application in hepatocellular carcinoma. However, the present

findings reinforce the potential of the trifluormethyl-substituted 3-selenylindol and 3-thiophenylindol as novel molecules with *in vitro* anticancer properties.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian research funding agencies CNPq, CAPES and Fundação Araucaria.

Statement of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdelmageed, M.M., El-Naga, R.N., El-Demerdash, E., Elmazar, M.M., 2016. Indole-3-carbinol enhances sorafenib cytotoxicity in hepatocellular carcinoma cells: A mechanistic study. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep32733>
- Allday, M.J., Inman, G.J., Crawford, D.H., Farrell, P.J., 1995. DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is transactivation competent and G2/M when it is transactivation defective. *EMBO J.* 14, 4994–5005. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00182.x>
- Alves, V.A., Pinheiro, C., Morais-Santos, F., Felipe-Silva, A., Longatto-Filho, A., Baltazar, F., 2014. Characterization of monocarboxylate transporter activity in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 20, 11780–11787. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11780>
- Arunkumar, A., Vijayababu, M.R., Kanagaraj, P., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2005. Growth suppressing effect of garlic compound diallyl disulfide on prostate cancer cell line (PC-3) in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 740–743. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.740>
- Bartolini, D., Sancineto, L., Fabro de Bem, A., Tew, K.D., Santi, C., Radi, R., Toquato, P., Galli, F., 2017. Selenocompounds in Cancer Therapy: An Overview. *Adv. Cancer Res.* 136, 259–302. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.07.007>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand, M.D., 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 45, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
- Chakraborty, P., Roy, S.S., Basu, A., Bhattacharya, S., 2016. Sensitization of cancer cells to cyclophosphamide therapy by an organoselenium compound through ROS-mediated apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* 84, 1992–1999. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.006>
- Chen, T., Zheng, W., Wong, Y.S., Yang, F., 2008. Mitochondria-mediated apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells induced by a novel selenadiazole derivative. *Biomed. Pharmacother.* 62, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.12.002>
- Chen, Z., Lai, H., Hou, L., Chen, T., 2020. Rational design and action mechanisms of chemically innovative organoselenium in cancer therapy. *Chem. Commun.* 56, 179–196. <https://doi.org/10.1039/c9cc07683b>
- Collery, P., 2018. Strategies for the development of selenium-based anticancer drugs. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 50, 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.02.024>
- Czoc, R., Lamprecht, W., 1974. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer, H.U. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd vol. New York: Academic Press Inc., 1446–1448.
- Dadashpour, S., Emami, S., 2018. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. *Eur. J. Med. Chem.* 150, 9–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.065>

- Dasgupta, P., Sumita, S., 2013. Role of Diallyl disulfide, a garlic component in NF- κ B mediated transient G2-N phase arrest and apoptosis in human leukemic cell-lines. *Nutr. Cancer* 65, 611–622. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.776090>
- Denny, W.A., 2002. The Contribution of Synthetic Organic Chemistry To Anticancer Drug Development. In: Baguley, B.C., Kerr, D.J. (ed). *Anticancer Drug Dev.* San Diego: Academic Press, 187–202. <https://doi.org/10.1016/b978-012072651-6/50012-7>
- Djafarzadeh, S., Jakob, S.M., 2017. High-resolution respirometry to assess mitochondrial function in permeabilized and intact cells. *J. Vis. Exp.* 2017, 1–11. <https://doi.org/10.3791/54985>
- El-Serag, H.B., 2011. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 365, 1118–1127. <https://doi.org/10.1056/nejmra1001683>.
- Fan, C., Zheng, W., Fu, X., Li, X., Wong, Y.S., Chen, T., 2014. Enhancement of auranofin-induced lung cancer cell apoptosis by selenocystine, a natural inhibitor of TrxR1 in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 5. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.132>
- Fernandes, A.P., Gandin, V., 2015. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850, 1642–1660. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.008>
- Fried, J., Perez, A.G., Clarkson, B.D., 1976. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide: Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J. Cell Biol.* 71, 172–181. <https://doi.org/10.1083/jcb.71.1.172>
- Gabry, M.S., Elgemeie, G.H., Basseli, N.S., Melek, S.T., Hafez, S.E., Farid, O.A., Abdelhady, S.S., 2017. Biological Evidences of Hepatocellular Carcinoma Treatment with 1,3,4-oxadiazole-2-thiol as Anticancer Agent. *J. Biomol. Res. Ther.* 06, 2–8. <https://doi.org/10.4172/2167-7956.1000153>
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Thayyullathil, F., 2017. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic. Biol. Med.* 104, 144–164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>
- Galle, P.R., Forner, A., Llovet, J.M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J.L., Schirmacher, P., Vilgrain, V., 2018. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 69, 182–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>
- Ganten, T.M., Stauber, R.E., Schott, E., Malfertheiner, P., Buder, R., Galle, P.R., Gohler, T., Walther, M., Koschny, R., Gerken, G., 2017. Sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma—results of the observational INSIGHT study. *Clin. Cancer Res.* 23, 5720–5728. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0919>
- Gao, X., Cen, L., Li, F., Wen, R., Yan, H., Yao, H., Zhu, S., 2018. Oral administration of indole substituted dipyrido[2,3-d]pyrimidine derivative exhibits anti-tumor activity via inhibiting AKT and ERK1/2 on hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 505, 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.120>
- Guo, P., Wang, Q., Liu, J., Liu, L., Zhao, P., Cao, Y., Liu, Yuping, Qi, C., Liu, Yanli, 2013. Preparation of two organoselenium compounds and their induction of apoptosis to SMMC-7221 cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 154, 304–311. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9715-7>
- Gutmann, I., Wahlefeld, W., 1974. L-(+)-lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.U. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd vol. New York: Academic Press Inc., 1464–1472.
- Hua, Z.J., Xu, M., 2000. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res.* 10, 205–211. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290049>

- Iciek, M., Kwiecień, I., Chwatko, G., Sokolowska-Jezewicz, M., Kowalczyk-Pachel, D., Rokita, H., 2012. The effects of garlic-derived sulfur compounds on cell proliferation, caspase 3 activity, thiol levels and anaerobic sulfur metabolism in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Cell Biochem. Funct.* 30, 198–204. <https://doi.org/10.1002/cbf.1835>
- Ikeda, M., Kobayashi, M., Tahara, M., Kaneko, S., 2018. Optimal management of patients with hepatocellular carcinoma treated with lenvatinib. *Expert Opin. Drug Saf.* 17, 1095–1105. <https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1530212>
- Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Bennett, B., Zielonka, J., 2018. Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biol.* 15, 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.012>
- Kim, T., Jung, U., Cho, D.Y., Chung, A.S., 2001. Se-methylselenocysteine induces apoptosis through caspase activation in HL-60 cells. *Carcinogenesis* 22, 559–565. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.4.559>
- Kim, T.S., Yun, B.Y., Kim, I.Y., 2003. Induction of the mitochondrial permeability transition by selenium compounds mediated by oxidation of the protein thiol groups and generation of the superoxide. *Biochem. Pharmacol.* 66, 2301–2311. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.021>
- Korzeniewski, C., Callewaert, D.M., 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 64, 313–320. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90438-6)
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>
- Kudo, M., Finn, R.S., Qin, S., Han, K.H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J.W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J.F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T.R.J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., Tamai, T., Ren, M., Cheng, A.L., 2018. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 391, 1163–1173. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30207-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30207-1)
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D., 2018. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018, 465–468. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Lee, S., Yang, K., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G., 2002. Reversible Inactivation of the Tumor Suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem.* 277, 20336–20342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111899200>
- Lee, E.J., Shin, I., Kwon, S.K., Shin, H.S., Moon, A., 2003. Chemopreventive allylthiopyridazines inhibit invasion, migration and angiogenesis in hepatocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 23, 1645–1650. <https://doi.org/10.3892/ijo.23.6.1645>
- Lee, C.M., Choi, Y.J., Park, S.H., Nam, M.J., 2018. Indole-3-carbinol induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. *Food Chem. Toxicol.* 118, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.014>
- Lee, C.M., Park, S.H., Nam, M.J., 2019. Anticarcinogenic effect of indole-3-carbinol (I3C) on human hepatocellular carcinoma SNU449 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 38, 136–147. <https://doi.org/10.1177/0960327118785235>
- Li, Y., Wang, W., Xu, X., Sun, S., Qu, X. jun, 2015. {2-[1-(3-Methoxycarbonylmethyl-1H-indol-2-yl)-1-methyl-ethyl]-1H-indol-3-yl}-acetic acid methyl ester (MIAM) inhibited human hepatocellular

- carcinoma growth through upregulation of Sirtuin-3 (SIRT3). *Biomed. Pharmacother.* 69, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.11.005>
- Lillie, R.D, Fullmer, H.M., 1976. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 4th ed. New York: McGraw Hill Book Company.
- Liu, Y., Luo, Y., Li, X., Zheng, W., Chen, T., 2015. Rational design of selenadiazole derivatives to antagonize hyperglycemia-induced drug resistance in cancer cells. *Chem. - An Asian J.* 10, 642–652. <https://doi.org/10.1002/asia.201403409>
- Luz, E.Q., Seckler, D., Araújo, J.S., Angst, L., Lima, D.B., Maluf Rios, E.A., Ribeiro, R.R., Rampon, D.S., 2019. Fe(III)-Catalyzed direct C3 chalcogenylation of indole: The effect of iodide ions. *Tetrahedron* 75, 1258–1266. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.01.037>
- Mo'men, Y.S., Hussein, R.M., Kandeil, M.A., 2020. A novel chemoprotective effect of tiopronin against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats: Role of ASK1/P38 MAPK-P53 signalling cascade. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 47, 322–332. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13204>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Müller, A., Cadenas, E., Graf, P., Sies, H., 1984. A novel biologically active seleno-organic compound-1. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* 33, 3235–3239. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90083-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90083-2)
- Ng, K.T.P., Guo, D.Y., Cheng, Q., Geng, W., Ling, C.C., Li, C.X., Liu, X.B., Ma, Y.Y., Lo, C.M., Poon, R.T.P., Fan, S.T., Man, K., 2012. A garlic derivative, S-allylcysteine (SAC), suppresses proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031655>
- Otto, T., Sicinski, P., 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 93–115. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
- Paik, J., Jung, K., Lee, J., Park, J., Lee, K., 2016. Reactive oxygen species-driven HIF1 α triggers accelerated glycolysis in endothelial cells exposed to low oxygen tension. *Nucl Med Biol.* 45, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.10.006>
- Payen, V.L., Mina, E., Van Hée, V.F., Porporato, P.E., Sonveaux, P., 2020. Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol. Metab.* 33, 48–66. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.07.006>
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Paradies, G., 2003. Role of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin in the Release of Cytochrome C From Mitochondria. *FASEB J.* 17, 2202–2208. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0012com>
- Pratheeshkumar, P., Thejass, P., Kutan, G., 2010. Diallyl disulfide induces caspase-dependent apoptosis via mitochondria-mediated intrinsic pathway in B16F-10 melanoma cells by up-regulating P53, caspase-3 and down-regulating pro-inflammatory cytokines and nuclear factor- κ B-mediated Bcl-2 activation. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 29, 113–125. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v29.i2.50>
- Purser, S., Moore, P.R., Swallow, S., Gouverneur, V., 2008. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 37, 320–330. <https://doi.org/10.1039/b610213c>
- Raoul, J.L., Adhoute, X., Penaranda, G., Perrier, H., Castellani, P., Oules, V., Bourlière, M., 2019. Sorafenib: Experience and Better Management of Side Effects Improve Overall Survival in

- Hepatocellular Carcinoma Patients: A Real-Life Retrospective Analysis. *Liver Cancer* 8, 457–467. <https://doi.org/10.1159/000497161>
- Rawla, P., Sunkara, T., Muralidharan, P., Raj, J.P., 2018. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *Wspolczesna Onkol.* 22, 141–150. <https://doi.org/10.5114/wo.2018.78941>
- Rimassa, L., Pressiani, T., Merle, P., 2019. Systemic Treatment Options in Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer* 427–446. <https://doi.org/10.1159/000499765>
- Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W., Zlabinger, G.J., 1992. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J. Immunol. Methods* 156, 39–45. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90008-H](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90008-H)
- Shaaban, S., Negm, A., Ashmawy, A.M., Ahmed, D.M., Wessjohann, L.A., 2016. Combinatorial synthesis, in silico, molecular and biochemical studies of tetrazole-derived organic selenides with increased selectivity against hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Med. Chem.* 122, 55–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.005>
- Shaaban, S., Ashmawy, A.M., Negm, A., Wessjohann, L.A., 2019. Synthesis and biochemical studies of novel organic selenides with increased selectivity for hepatocellular carcinoma and breast adenocarcinoma. *Eur. J. Med. Chem.* 179, 515–526. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.075>
- Shi, H., Liu, S., Miyake, M., Liu, K.J., 2006. Ebselen Induced C6 Glioma Cell Death in Oxygen and Glucose Deprivation. *Chem Res Toxicol.* 19, 655–660. <https://doi.org/10.1021/tx0502544>
- Shiah, H.S., Lee, W.S., Juang, S.H., Hong, P.C., Lung, C.C., Chang, C.J., Chou, K.M., Chang, J.Y., 2007. Mitochondria-mediated and p53-associated apoptosis induced in human cancer cells by a novel selenophene derivative, D-501036. *Biochem. Pharmacol.* 73, 610–619. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.10.019>
- Shi, X.H., Wang, Z., Xia, Y., Ye, T.H., Deng, M., Xu, Y.Z., Wei, Y.Q., Yu, L.T., 2012. Synthesis and biological evaluation of novel benzothiazole-2-thiol derivatives as potential anticancer agents. *Molecules* 17, 3933–3944. <https://doi.org/10.3390/molecules17043933>
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O.L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G.S., Dmitriev, A.A., 2020. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
- Spengler, G., Gajdács, M., Marć, M.A., Domínguez-Álvarez, E., Sanmartín, C., 2019. Organoselenium compounds as novel adjuvants of chemotherapy drugs—a promising approach to fight cancer drug resistance. *Molecules* 24, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules24020336>
- Stark, G.R., Taylor, W.R., 2004. Analyzing the G2/M Checkpoint. *Methods Mol Biol* 280, 51–82. <https://doi.org/10.1385/1-59259-788-2:051>
- Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., Hara, E., 2006. Mitogenic Signalling and the p16INK4a-Rb Pathway Cooperate to Enforce Irreversible Cellular Senescence. *Nat Cell Biol.* 8, 1291–1297. <https://doi.org/10.1038/ncb1491>
- Tong, D., Qu, H., Meng, X., Jiang, Y., Liu, D., Ye, S., Chen, H., Jin, Y., Fu, S., Geng, J., 2014. S-allylmercaptocysteine promotes MAPK inhibitor-induced apoptosis by activating the TGF- β

- signaling pathway in cancer cells. *Oncol. Rep.* 32, 1124–1132. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3295>
- Turman, M.A., Mathews, A., 1996. A simple luciferase assay to measure ATP levels in small numbers of cells using a fluorescent plate reader. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 32, 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF02722985>
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-I](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-I)
- Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C., 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* 243, 167–190. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00233-7)
- Visconti, R., Della Monica, R., Grieco, D., 2016. Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0433-9>
- Vogel, A., Cervantes, A., Chau, I., Daniele, B., Llovet, J., Meyer, T., Nault, J.C., Neumann, U., Ricke, J., Sangro, B., Schirmacher, P., Verslype, C., Zech, C.J., Arnold, D., Martinelli, E., 2018. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 29, iv238–iv255. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy308>
- Wallenberg, M., Misra, S., Björnstedt, M., 2014. Selenium cytotoxicity in cancer. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 114, 377–386. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12207>
- Wang, H., Sun, N., Li, X., Li, K., Tian, J., Li, J., 2016. Diallyl trisulfide induces osteosarcoma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated downregulation of the PI3K/Akt pathway. *Oncol. Rep.* 35, 3648–3658. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4722>
- Wang, J., He, H., Xiang, C., Fan, X., Yang, L., Yuan, L., Jiang, F., Liu, Y., 2018. Uncoupling Effect of F16 Is Responsible for Its Mitochondrial Toxicity and Anticancer Activity. *Toxicol Sci.* 161, 431–442. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx218>
- Wang, G., Peng, Z., Li, Y., 2019. Synthesis, anticancer activity and molecular modeling studies of novel chalcone derivatives containing indole and naphthalene moieties as tubulin polymerization inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 67, 725–728. <https://doi.org/10.1248/cpb.c19-00217>
- Wen, J., Zhang, Y., Chen, X., Shen, L., Li, G.C., Xu, M., 2004. Enhancement of diallyl disulfide-induced apoptosis by inhibitors of MAPKs in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 68, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.03.027>
- Wu, D., Zhao, Y., Fu, S., Zhang, J., Wang, W., Yan, Z., Guo, H., Liu, A., 2018. Seleno-short-chain chitosan induces apoptosis in human breast cancer cells through mitochondrial apoptosis pathway in vitro. *Cell Cycle* 17, 1579–1590. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1464845>
- Xia, C., Meng, Q., Liu, L., Rojanasakul, Y., Wang, X., Jiang, B., 2007. Reactive Oxygen Species Regulate Angiogenesis and Tumor Growth Through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res.* 67, 10823–10830. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-0783>
- Xu, J., Zuo, D., Qi, H., Shen, Q., Bai, Z., Han, M., Li, Z., Zhang, W., Wu, Y., 2016. 2-Methoxy-5((3,4,5-trimethoxyphenyl)seleninyl) phenol (SQ0814061), a novel microtubule inhibitor, evokes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* 78, 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.040>

- Yang, C.F., Shen, H.M., Ong, C.N., 2000. Ebselen induces apoptosis in HepG2 cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 142–152. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1574>
- Yang, X.G., Bao, Y.L., Huang, Y.X., Sun, L.G., Zhang, Y.W., Yu, C.L., Wu, Y., Li, Y.X., 2012. 6-[(1-naphthylmethyl)sulfanyl]-9H-purine induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 695, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.09.004>
- Yang, Y., Deng, S., Zeng, Q., Hu, W., Chen, T., 2016. Highly stable selenadiazole derivatives induce bladder cancer cell apoptosis and inhibit cell migration and invasion through the activation of ROS-mediated signaling pathways. *Dalt. Trans.* 45, 18465–18475. <https://doi.org/10.1039/c6dt02045c>
- Yang, J.D., Hainaut, P., Gores, G.J., Amadou, A., Plymoth, A., Roberts, L.R., 2019. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 589–604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>
- Yi, L., Su, Q., 2013. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *Food Chem. Toxicol.* 57, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.001>
- Zeng, D., Deng, S., Sang, C., Zhao, J., Chen, T., 2018. Rational Design of Cancer-Targeted Selenadiazole Derivative as Efficient Radiosensitizer for Precise Cancer Therapy. *Bioconjug. Chem.* 29, 2039–2049. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00247>
- Zhang, L., Zhou, L., Du, J., Li, M., Qian, C., Cheng, Y., Peng, Y., Xie, J., Wang, D., 2014a. Induction of apoptosis in human multiple myeloma cell lines by ebselen via enhancing the endogenous reactive oxygen species production. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/696107>
- Zhang, Y., Zheng, S., Ngai, S.M., Zheng, W., Li, J., Chen, T., Zhong, X., 2014b. A novel selenadiazole derivative induces apoptosis in human glioma cells by dephosphorylation of AKT. *Chem. Pharm. Bull.* 62, 994–999. <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00354>
- Zhang, Y., Zheng, S., Zheng, J.S., Wong, K.H., Huang, Z., Ngai, S.M., Zheng, W., Wong, Y.S., Chen, T., 2014c. Synergistic induction of apoptosis by methylseleninic acid and cisplatin, the role of ROS-ERK/AKT-p53 pathway. *Mol. Pharm.* 11, 1282–1293. <https://doi.org/10.1021/mp400749f>
- Zheng, X., Ma, W., Sun, R., Yin, H., Lin, F., Liu, Y., Xu, W., Zeng, H., 2018. Butaselen prevents hepatocarcinogenesis and progression through inhibiting thioredoxin reductase activity. *Redox Biol.* 14, 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.014>
- Ziegler, U., Groscurth, P., 2004. Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* 19, 124–128. <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>

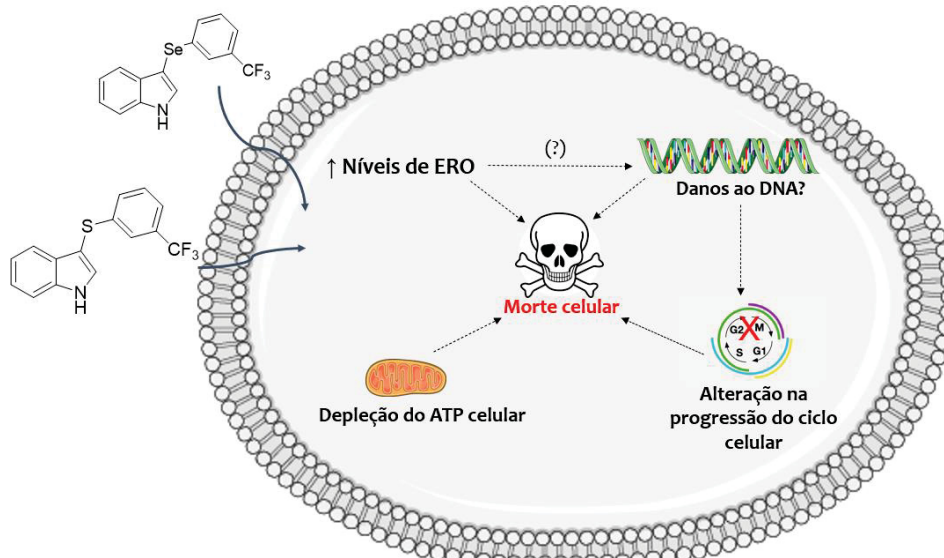
5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, conclui-se que dentre as 15 substâncias avaliadas, os 3-selenilindol e 3-tiofenilindol trifluormetilados (EQ-34 e EQ-41) tiveram maior potencial citotóxico em ambas as linhagens avaliadas, sendo que este efeito foi mais pronunciado em células de hepatocarcinoma (HepG2) do que em células de câncer de mama (MCF-7).

Ensaio adicionais confirmaram que a incubação com os dois compostos selecionados resulta em citotoxicidade nas células HepG2. Esta citotoxicidade está associada com difentes efeitos, incluindo: aumento dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, alteração na progressão do ciclo celular com aumento na proporção de células nas fases G₂/M, aumento na fragmentação de DNA, e alterações metabólicas diversas como: estímulo da respiração basal celular, aumento dos níveis de lactato no sobrenadante, e depleção dos níveis intracelulares de ATP.

A Figura 11 representa um resumo dos efeitos destes derivados trifluormetilados observados no presente estudo. Entretanto, é importante ressaltar que até o presente momento os efeitos observados são apenas isolados e ainda não foram evidenciadas interdependências entre eles, o que incentiva a realização de estudos futuros visando a maior compreensão do mecanismo de ação destes compostos e de seu potencial no tratamento do hepatocarcinoma.

FIGURA 11 – VISÃO GERAL DOS EFEITOS DOS DERIVADOS TRIFLUORMETILADOS SOBRE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA



FONTE: O AUTOR (2020).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, N.; ALSHAWA, A.; SUAREZ-ALMAZOR, M. E. Adverse Events in Cancer Immunotherapy. In: NAING, A.; HAJJAR, J. (Ed.). **Immunotherapy**. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 995. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 155–174.
- ABRIL-RODRIGUEZ, G.; RIBAS, A. SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. **Cancer Cell**, v. 31, n. 6, p. 848, 2017.
- AL-DIMASSI, S.; ABOU-ANTOUN, T.; EL-SIBAI, M. Cancer cell resistance mechanisms: A mini review. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, n. 6, p. 511–516, 2014.
- ALBERTS, B. et al. Cancer. In: ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 6th ed. New York: Garland Science, 2015. p. 1091–1144.
- ALCOLEA, V. et al. Chalcogen containing heterocyclic scaffolds: New hybrids with antitumoral activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 407–418, 2016a.
- ALCOLEA, V. et al. Novel seleno- and thio-urea derivatives with potent in vitro activities against several cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 113, p. 134–144, 2016b.
- ALTONSY, M. O.; HABIB, T. N.; ANDREWS, S. C. Diallyl disulfide-induced apoptosis in a breast-cancer cell line (MCF-7) may be caused by inhibition of histone deacetylation. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 8, p. 1251-1260, 2012.
- ANARI, F.; RAMAMURTHY, C.; ZIBELMAN, M. Impact of tumor microenvironment composition on therapeutic responses and clinical outcomes in cancer. **Future Oncology**, v. 14, n. 14, p. 1409–1421, 2018.
- APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1447–1459, 2015.
- ARNÉR, E. S. J. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1296–1303, 2010.
- ARRUEBO, M. et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. **Cancers**, v. 3, n. 3, p. 3279–3330, 2011.
- ARUNKUMAR, A. et al. Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 288. n. 1-2, p. 107–113, 2006.
- ASHWORTH, A.; LORD, C. J. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 9, p. 564–576, 2018.

BAI, J.; LI, Y.; ZHANG, G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 4, p. 348–362, 2017.

BANERJEE, K. et al. Potent anti-proliferative activities of organochalcogenocyanates towards breast cancer. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 45, p. 8769–8782, 2018.

BARBOSA, F. A. R. et al. Novel Pyrimidinic Selenourea Induces DNA Damage, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Carcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 503–515, 2018.

BARTOLINI, D. et al. Selenocompounds in Cancer Therapy: An Overview. **Advances in Cancer Research**, v. 136, p. 259–302, 2017.

BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. Epigenetic determinants of cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 9, p. 1–35, 2016.

BENJAMIN, D. J. The efficacy of surgical treatment of cancer - 20 years later. **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 4, p. 412–420, 2014.

BIBERGER, C.; VON ANGERER, E. 2-Phenylindoles with Sulfur Containing Side Chains. Estrogen Receptor Affinity, Antiestrogenic Potency, and Antitumor Activity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 58, n. 1, p. 31–43, 1996.

BOMMAGANI, S. et al. Indole carboxylic acid esters of melampomagnolide B are potent anticancer agents against both hematological and solid tumor cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 393–405, 2017.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

CAI, G. et al. Thiophene derivatives as anticancer agents and their delivery to tumor cells using albumin nanoparticles. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 1–16, 2019.

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

CARBONNEAU, M. et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate activates the mTOR signalling pathway. **Nature Communications**, v. 7, n. 12700, p. 1–12, 2016.

CASARIL, A. M. et al. Selenium-containing indolyl compounds: kinetics of reaction with inflammation-associated oxidants and protective effect against oxidation of extracellular matrix proteins. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 113, p. 395–405, 2017a.

CASARIL, A. M. et al. Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress

in lipopolysaccharide-challenged mice. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1263–1273, 2017b.

CHABNER, B. A. et al. Antineoplastic Agents. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2011. p. 1315–1403.

CHEN, T.; WONG, Y. S. Selenocystine induces apoptosis of A375 human melanoma cells by activating ROS-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 17, p. 2763–2775, 2008.

CHEN, Z. et al. Rational design and action mechanisms of chemically innovative organoselenium in cancer therapy. **Chemical Communications**, v. 56, n. 2, p. 179–196, 2020.

CLARK, O.; YEN, K.; MELLINGHOFF, I. K. Molecular pathways: Isocitrate dehydrogenase mutations in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 8, p. 1837–1842, 2016.

COLEGIO, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559–563, 2014.

COLLERY, P. Strategies for the development of selenium-based anticancer drugs. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 498–507, 2018.

CYR, L. et al. Antiproliferative Effects of a Series of Novel Synthetic Sulfonate Esters on Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. **Anticancer Research**, v. 27, n. 3B, p. 1437–1448, 2007.

DADASHPOUR, S.; EMAMI, S. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 9–29, 2018.

DARE, A. J. et al. Surgical Services for Cancer Care. In: GELBAND, H. et al. (Ed.). **Cancer. Disease Control Priorities, volume 3**. 3rd ed. Washington: World Bank, 2015. p. 223–238.

DARVIN, P. et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, p. 1–11, 2018.

DAYTON, T. L.; JACKS, T.; VANDER HEIDEN, M. G. PKM 2, cancer metabolism, and the road ahead . **EMBO reports**, v. 17, n. 12, p. 1721–1730, 2016.

DE LA CRUZ-LÓPEZ, K. G. et al. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 1143, p. 1–21, 2019.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of Cancer Metabolism. **Science Advances**, v. 2, n. 5, p. 1–18, 2016.

DHUP, S. et al. Multiple Biological Activities of Lactic Acid in Cancer: Influences on Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 10, p. 1319–1330, 2012.

DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E. et al. Identification of selenocompounds with promising properties to reverse cancer multidrug resistance. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 12, p. 2821–2824, 2016.

DONG, C. et al. Role of thioredoxin reductase 1 in dysplastic transformation of human breast epithelial cells triggered by chronic oxidative stress. **Scientific Reports**, v. 6, n. 36860, p. 1–13, 2016.

FAN, C. et al. Enhancement of auranofin-induced lung cancer cell apoptosis by selenocystine, a natural inhibitor of TrxR1 in vitro and in vivo. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 4, p. 1–11, 2014.

FENG, Y. et al. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 12, p. 6124–6136, 2018.

FERNANDES, A. P.; GANDIN, V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1642–1660, 2015.

FITZMAURICE, C. et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden of Disease Cancer Collaboration. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524–548, 2017.

FREITAS, M. et al. Combined effect of sodium selenite and docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 4, p. 713–719, 2011.

FREZZA, C. Metabolism and cancer: the future is now. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 2, p. 133–135, 2020.

FUNK, L. M. et al. Global Operating Theatre Distribution and Pulse Oximetry Supply: An Estimation from Reported Data. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1055–1061, 2010.

GAIKWAD, R. et al. 2-Phenylindole derivatives as anticancer agents: synthesis and screening against murine melanoma, human lung and breast cancer cell lines. **Synthetic Communications**, v. 49, n. 17, p. 2258–2269, 2019.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 144–164, 2017.

GANDIN, V. et al. Organic selenium compounds as potential chemotherapeutic agents for improved cancer treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 127, p. 80–97, 2018.

GEGECHKORI, N.; HAINES, L.; LIN, J. J. Long-Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 6, p. 1053–1073, 2017.

GILLET, J.; GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer. In: ZHOU, J. (Ed.). **Multi-Drug Resistance in Cancer**. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 596. Totowa: Humana Press, 2010. p. 47–76.

GOLIAS, T. et al. Hypoxic repression of pyruvate dehydrogenase activity is necessary for metabolic reprogramming and growth of model tumours. **Scientific Reports**, v. 6, n. 31146, p. 1–11, 2016.

GOODWIN, M. L. et al. Lactate and cancer: a “lactatic” perspective on spinal tumor metabolism (part 1). **Annals of Translational Medicine**, v. 7, n. 10, p. 220–220, 2019.

GUO, P. et al. Preparation of two organoselenium compounds and their induction of apoptosis to SMMC-7221 cells. **Biological Trace Element Research**, v. 154, n. 2, p. 304–311, 2013.

HAHM, E. R.; SINGH, S. V. Diallyl trisulfide inhibits estrogen receptor- α activity in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 144, n. 1, p. 47–57, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HIRSCHHAEUSER, F.; SATTLER, U. G. A.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate: A metabolic key player in cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 22, p. 6921–6925, 2011.

HUGHES, D. J. et al. Prediagnostic selenium status and hepatobiliary cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 2, p. 406–414, 2016.

ICIEK, M. et al. The effects of garlic-derived sulfur compounds on cell proliferation, caspase 3 activity, thiol levels and anaerobic sulfur metabolism in human hepatoblastoma HepG2 cells. **Cell Biochem Funct.**, v. 30, n. 3, p. 198–204, 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids**. Washington: The National Academic Press, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **O que é câncer?** 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138955707781387939>>. Acesso em: 19/03/2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Cancer tomorrow**. 2020. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>. Acesso em: 19/03/2020.

JAFFRAY, D. A.; GOSPODAROWICZ, M. K. Radiation Therapy for Cancer. In: GELBAND, H. et al. (Ed.). **Cancer. Disease Control Priorities, volume 3**. 3rd ed. Washington: World Bank, 2015. p. 239–248.

JARIWALLA, R. J.; GANGAPURKAR, B.; NAKAMURA, D. Differential sensitivity of various human tumour-derived cell types to apoptosis by organic derivatives of selenium. **The British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 2, p. 182–189, 2009.

JIANG, X. et al. Diallyl trisulfide inhibits growth of NCI-H460 in vitro and in vivo, and ameliorates cisplatin-induced oxidative injury in the treatment of lung carcinoma in xenograft mice. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 2, p. 167–178, 2017.

JINESH, G. G. et al. Blebbishields, the emergency program for cancer stem cells: sphere formation and tumorigenesis after apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, n. 3, p. 382–395, 2013.

JURKOWKSA, H. et al. A possible mechanism of inhibition of U87MG and SH-SY5Y cancer cell proliferation by diallyl trisulfide and other aspects of its activity. **Amino Acids**, v. 49, n. 11, p. 1855–1866, 2017.

KANEHARA, K. et al. The indole compound MA-35 attenuates tumorigenesis in an inflammation-induced colon cancer model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 12739, p. 1–12, 2019.

KARCZMARZYK, Z. et al. Synthetic approaches for sulfur derivatives containing 1,2,4-triazine moiety: Their activity for in vitro screening towards two human cancer cell lines. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 63, n. 7, p. 531–537, 2015.

KELLOFF, G. J. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors as Potential Cancer Chemopreventives. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 5, n. 8, p. 657–666, 1996.

KELLY, P. M. et al. Synthesis, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Activity of 2-phenylindoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4075–4099, 2016.

KIM, C.; LEE, J.; PARK, M. S. Synthesis of new diorganodiselenides from organic halides: Their antiproliferative effects against human breast cancer MCF-7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 5, p. 659–665, 2015.

- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Neoplasia. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018. p. 189–242.
- LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017.
- LEBELO, M. T.; JOUBERT, A. M.; VISAGIE, M. H. Warburg Effect and Its Role in Tumorigenesis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 10, p. 833–847, 2019.
- LEE, C. M. et al. Indole-3-carbinol induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 119–130, 2018.
- LEONI, A. et al. 2-Indolinone a versatile scaffold for treatment of cancer: A patent review (2008-2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 2, p. 149–173, 2016.
- LI, G. et al. Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 9, p. 2034–2043, 2007.
- LI, Z. et al. Combination of methylselenocysteine with tamoxifen inhibits MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice through elevated apoptosis and reduced angiogenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 118, n. 1, p. 33–43, 2009.
- LI, C. et al. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2016.
- LI, X. et al. Diallyl Trisulfide inhibits breast cancer stem cells via suppression of Wnt/ β -catenin pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 5, p. 4134–4141, 2018.
- LI, Y. et al. Diallyl disulfide suppresses FOXM1-mediated proliferation and invasion in osteosarcoma by upregulating miR-134. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 7286–7296, 2019.
- LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.
- LIU, Y. et al. Rational design of selenadiazole derivatives to antagonize hyperglycemia-induced drug resistance in cancer cells. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 10, n. 3, p. 642–652, 2015.
- LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 723–727, 2009.
- LUENGO, A.; GUI, D. Y.; VANDER HEIDEN, M. G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 9, p. 1161–1180, 2017.

LUO, H. et al. PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to reactive oxygen species-mediated apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 2, p. 1–11, 2013.

LUZ, E. Q. et al. Fe(III)-Catalyzed direct C3 chalcogenylation of indole: The effect of iodide ions. **Tetrahedron**, v. 75, n. 9, p. 1258–1266, 2019.

MARTINS, I. L. et al. Selenium-containing chrysin and quercetin derivatives: Attractive scaffolds for cancer therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 4250–4265, 2015.

MATHUPALA, S. P.; KO, Y. H.; PEDERSEN, P. L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 1, p. 17–24, 2009.

MÉPLAN, C.; HESKETH, J. Selenium and Cancer: A Story that Should not be Forgotten-Insights from Genomics. In: ZAPPIA, V. et al. (Ed.). **Advances in Nutrition and Cancer**. Cancer Treatment and Research, vol 159. Berlin: Springer, 2013. p. 145–166.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

MORIARTY, R. M.; NAITHANI, R.; SURVE, B. Organosulfur Compounds in Cancer Chemoprevention. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 827–838, 2007.

MÜLLER, A. et al. A novel biologically active seleno-organic compound-1. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 20, p. 3235–3239, 1984.

NEUFELD, B. H. et al. Small Molecule Interferences in Resazurin and MTT-Based Metabolic Assays in the Absence of Cells. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 11, p. 6867–6876, 2018.

NIKOLAOU, M. et al. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 35, n. 4, p. 309–318, 2018.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. **Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology**. In: RAPPOPORT, Z. Patai's Chemistry of Functional Groups. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012. p. 1–82.

ODIN, M. J.; WEAVER, V. M. Physical and chemical gradients in the tumor microenvironment regulate tumor cell invasion, migration, and metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, n. 1, p. 189–205, 2016.

PAROLINI, I. et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 34211–34222, 2009.

PATIL, R. et al. Indole molecules as inhibitors of tubulin polymerization: Potential new anticancer agents, an update (2013-2015). **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1291–1316, 2016.

PLANO, D. et al. Antioxidant-Prooxidant Properties of a New Organoselenium Compound Library. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7292–7312, 2010.

POERSCHKE, R. L.; FRANKLIN, M. R.; MOOS, P. J. Modulation of Redox Status in Human Lung Cell Lines by Organoselenocompounds: Selenazolidines, Selenomethionine, and Methylseleninic Acid. **Toxicology In Vitro**, v. 22, n. 7, p. 1761–1767, 2008.

PRAKASH, B. et al. Novel indole derivatives as potential anticancer agents: Design, synthesis and biological screening. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 1, p. 321–331, 2018.

PUISIEUX, A. et al. Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 33, n. 2, p. 164–172, 2018.

QUIRIT, J. G. et al. Indole-3-carbinol (I3C) analogues are potent small molecule inhibitors of NEDD4-1 ubiquitin ligase activity that disrupt proliferation of human melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 127, p. 13–27, 2017.

RATH, B. et al. Anticancer activity of fascaplysin against lung cancer cell and small cell lung cancer circulating tumor cell lines. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, p. 1–12, 2018.

REDMAN, C. et al. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. **Cancer Letters**, v. 125, n. 1–2, p. 103–110, 1998.

RIKIISHI, H. Apoptotic cellular events for selenium compounds involved in cancer prevention. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 1, p. 91–98, 2007.

ROMANO, B. et al. *In vitro* radical scavenging and cytotoxic activities of novel hybrid selenocarbamates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1716–1727, 2015.

ROSEBLADE, A.; UNG, A.; BEBAWY, M. Synthesis and in Vitro Biological Evaluation of Thiosulfinate Derivatives for the Treatment of Human Multidrug-Resistant Breast Cancer. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 10, p. 1353–1368, 2017.

RUBERTE, A. C. et al. Novel selenadiazole derivatives as selective antitumor and radical scavenging agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 14–27, 2018.

RUDOLF, E. et al. Combined effect of sodium selenite and camptothecin on cervical carcinoma cells. **Neoplasma**, v. 51, n. 2, p. 127–135, 2004.

SAN-MILLÁN, I.; BROOKS, G. A. Reexamining cancer metabolism: Lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 2, p. 119–133, 2017.

SCHEPETKIN, I. A. et al. Neutrophil immunomodulatory activity of natural organosulfur compounds. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1–17, 2019.

SCHÜZ, J.; ESPINA, C.; WILD, C. P. Primary prevention: a need for concerted action. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 3, p. 567–578, 2019.

SHAABAN, S. et al. Combinatorial synthesis, in silico, molecular and biochemical studies of tetrazole-derived organic selenides with increased selectivity against hepatocellular carcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 55–71, 2016.

SHAABAN, S. et al. Synthesis and biochemical studies of novel organic selenides with increased selectivity for hepatocellular carcinoma and breast adenocarcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 515–526, 2019.

SHARIFI-RAD, J. et al. Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 1–52, 2019.

SHARMA, A. K. et al. Synthesis and Anticancer Activity Comparison of Phenylalkyl Isoselenocyanates with Corresponding Naturally Occurring and Synthetic Isothiocyanates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7820–7826, 2008.

SHERER, C. et al. Preliminary SAR on indole-3-carbinol and related fragments reveals a novel anticancer lead compound against resistant glioblastoma cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 7, p. 1561–1565, 2017.

SHI, X. H. et al. Synthesis and biological evaluation of novel benzothiazole-2-thiol derivatives as potential anticancer agents. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3933–3944, 2012.

SIDHU, J. S. et al. Indole Derivatives as Anticancer Agents for Breast Cancer Therapy: A Review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 160–173, 2016.

SONDKA, Z. et al. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 11, p. 696–705, 2018.

SPENGLER, G. et al. Organoselenium compounds as novel adjuvants of chemotherapy drugs—a promising approach to fight cancer drug resistance. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 1–15, 2019.

STAN, S. Garlic-derived organosulfur compound diallyl trisulfide induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **Nutrition**, v. 27, n. 1, 2013.

STEINBRENNER, H.; SPECKMANN, B.; KLOTZ, L. O. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 113–119, 2016.

STEWART, B. W.; WILD, C. P (Ed). **World Cancer Report 2014**. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2014.

STEWART, B. W. et al. Cancer prevention as part of precision medicine: “Plenty to be done”. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 1, p. 2–9, 2016.

STILL, E. R.; YUNEVA, M. O. Hopefully devoted to Q: Targeting glutamine addiction in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 116, n. 11, p. 1375–1381, 2017.

SULLIVAN, R. et al. Global cancer surgery: Delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 11, p. 1193–1224, 2015.

SUN, L. et al. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1870, n. 1, p. 51–66, 2018.

SUN, J. et al. Diallyl disulfide down-regulates calreticulin and promotes C/EBP α expression in differentiation of human leukaemia cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 1, p. 194–204, 2019.

SUNDE, R. A. Selenium. In: ROSS, A. R. et al. (Ed.). **Modern Nutrition in Health and Disease**. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014. p. 225–237.

TAKESHIMA, H.; USHIJIMA, T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. **npj Precision Oncology**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2019.

TAN, Q. et al. Augmented antitumor effects of combination therapy of cisplatin with ethaselen as a novel thioredoxin reductase inhibitor on human A549 cell in vivo. **Investigational New Drugs**, v. 28, n. 3, p. 205–215, 2010.

TAN, H. W. et al. Selenium species: Current status and potentials in cancer prevention and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1–26, 2019.

TARRADO-CASTELLARNAU, M. et al. Methylseleninic acid promotes antitumour effects via nuclear FOXO3a translocation through Akt inhibition. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 218–234, 2015.

TEH, B. T.; FEARON, E. R. Genetic and Epigenetic Alterations in Cancer. In: NIEDERHUBER, J. E. et al. **Abeloff's Clinical Oncology**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. p. 209–224.

THOMPSON, A. M. et al. Tyrosine kinase inhibitors. 1. Structure-activity relationships for inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by 2,3-dihydro-2-thioxo-1H-indole-3-alkanoic acids and 2,2'-dithiobis(1H-indole-3-alkanoic acids). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 17, p. 2459–2469, 1993.

VAZQUEZ, A. et al. Cancer metabolism at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 18, p. 3367–3373, 2016.

VERMA, V. et al. A systematic review of the cost and cost-effectiveness studies of immune checkpoint inhibitors 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2018.

VIEIRA, B. M. et al. Ultrasound-Assisted Synthesis and Antioxidant Activity of 3-Selanyl-1H-indole and 3-Selanylimidazo[1,2-a]pyridine Derivatives. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1635–1646, 2017.

VINCETI, M. et al. Selenium for preventing cancer. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 1, n. 1, p. 1–221, 2020.

VINEIS, P.; WILD, C. P. Global cancer patterns: Causes and prevention. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 549–557, 2014.

WALLENBERG, M.; MISRA, S.; BJÖRNSTEDT, M. Selenium Cytotoxicity in Cancer. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 5, p. 377–386, 2014.

WALLENBERG, M. et al. Selenium induces a multi-targeted cell death process in addition to ROS formation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 4, p. 671–684, 2014.

WAN, Y. et al. Indole: A privileged scaffold for the design of anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 1–18, 2019.

WANG, L. et al. Ethaselen: a potent mammalian thioredoxin reductase 1 inhibitor and novel organoselenium anticancer agent. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 5, p. 898–908, 2012.

WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 12, p. 3855–3864, 2018.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resistance**, v. 2, p. 141–160, 2019.

WATANABE, T. et al. A multicenter survey of temporal changes in chemotherapy-induced hair loss in breast cancer patients. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2019.

WEI, Z. et al. Diallyl trisulfides, a natural histone deacetylase inhibitor, attenuate HIF-1 α synthesis, and decreases breast cancer metastasis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 10, p. 2317–2331, 2017.

WEINBERG, R. A. The Rational Treatment of Cancer. In: WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. 2nd ed. New York: Garland Science, 2014. p. 797–876.

WILKY, B. A. Immune checkpoint inhibitors: The linchpins of modern immunotherapy. **Immunological Reviews**, v. 290, n. 1, p. 6–23, 2019.

WILLERS, H. et al. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. **Cancer Journal (United States)**, v. 19, n. 3, p. 200–207, 2013.

WILSON, L. F. et al. How many cancer cases and deaths are potentially preventable? Estimates for Australia in 2013. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 4, p. 691–701, 2018.

WONG, W. W. L. et al. Characterization of the apoptotic response of human leukemia cells to organosulfur compounds. **BMC Cancer**, v. 10, n. 351, p. 1–14, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. 2020a. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 11/02/2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer prevention**. 2020b. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/en/>>. Acesso em: 25/02/2020.

WU, W. et al. Phenylbutyl isoselenocyanate induces reactive oxygen species to inhibit androgen receptor and to initiate p53-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 57, n. 8, p. 1055–1066, 2018.

XIA, L. et al. Diallyl disulfide inhibits colon cancer metastasis by suppressing Rac1-mediated epithelial-mesenchymal transition. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 5713–5728, 2019.

XIE, X. et al. Diallyl Disulfide Inhibits Breast Cancer Stem Cell Progression and Glucose Metabolism by Targeting CD44/PKM2/AMPK Signaling. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 6, p. 592–599, 2018.

XIONG, T. et al. Tristetraprolin: A novel target of diallyl disulfide that inhibits the progression of breast cancer. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 7817–7827, 2018.

XU, J. et al. 2-Methoxy-5((3,4,5-trimethoxyphenyl)seleninyl) phenol (SQ0814061), a novel microtubule inhibitor, evokes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 308–321, 2016.

YAMAMOTO, S.; KONDO, S. Oral chemotherapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 993–1001, 2018.

YANG, Y. et al. The Anticancer Effects of Sodium Selenite and Selenomethionine on Human Colorectal Carcinoma Cell Lines in Nude Mice. **Oncology Research**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2009.

YE, S. et al. Dose-biomarker-response modeling of the anticancer effect of ethaselen in a human non-small cell lung cancer xenograft mouse model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, p. 223–232, 2017.

YI, L.; SU, Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 362–370, 2013.

YOSHIDA, G. J. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 111, p. 1–10, 2015.

ZAAL, E. A.; BERKERS, C. R. The influence of metabolism on drug response in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 500, p. 1–15, 2018.

ZHANG, L. et al. Induction of Apoptosis in Human Multiple Myeloma Cell Lines by Ebselen via Enhancing the Endogenous Reactive Oxygen Species Production. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

ZHANG, W. et al. A global transcriptional network connecting noncoding mutations to changes in tumor gene expression. **Nature Genetics**, v. 50, n. 4, p. 613–620, 2018a.

ZHANG, Q. Y. et al. Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1253, p. 1–25, 2018b.

ZHENG, X. et al. Synergistic inhibition of sunitinib and ethaselen against human colorectal cancer cells proliferation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 212–220, 2016.