



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

ERICKA FERNANDA FERREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPOSTOS DERIVADOS DO
SELÊNIO EM CÉLULAS LEUCÊMICAS E DE CÂNCER DE MAMA**

RECIFE – PE

2021

ERICKA FERNANDA FERREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPOSTOS DERIVADOS DO
SELÊNIO EM CÉLULAS LEUCÊMICAS E DE CÂNCER DE MAMA**

Tese submetida à coordenação da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho.

Co-orientadora: Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar.

RECIFE – PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Q3e Queiroz, Ericka Fernanda Ferreira de
Estudo in silico, in vitro e in vivo de compostos derivados do selênio em células leucêmicas e de câncer de mama / Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz. - 2021.
132 f. : il.
- Orientador: Manoel Adriaio Gomes Filho.
Coorientador: Jaciana dos Santos Aguiar.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.
1. Anticancer activity. 2. HL-60 cells. 3. MCF7 cells. 4. organoselenium. I. Filho, Manoel Adriaio Gomes, orient. II. Aguiar, Jaciana dos Santos, coorient. III. Título

ERICKA FERNANDA FERREIRA DE QUEIROZ

**ESTUDO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPOSTOS DERIVADOS DO
SELÊNIO EM CÉLULAS LEUCÊMICAS E DE CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao programa Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em _____, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz
Discente

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena
Universidade Federal de Pernambuco/DMFA-UFRPE

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco/DMFA-UFRPE

Prof. Dr. Valdomiro Amaro da Silva Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco/DMFA-UFRPE

Dr.^a Luciana Amaral de Mascena Costa
Universidade Federal Rural de Pernambuco

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

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

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, soberano criador e galardoador de todas as bênçãos, por sua graça, misericórdia e amor incondicional.
- A meus pais, Gildo Queiroz e Luzinete Queiroz e a minha irmã Millana Queiroz, sem os quais essa conquista não seria possível.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filhos pela oportunidade, apoio, encorajamento e ensinamentos.
- Meu agradecimento especial a Diego Dantas pelas grandes lições de perseverança, dedicação e simplicidade que levarei por toda a vida.
- A todos os meus familiares: Alzira Maria (*in memoriam*) tias e tios, e os primos queridos.
- A Silvany Araujo (*in memoriam*) e Luciana Costa pelo compartilhamento de experimentos e esforços para obtenção dos melhores resultados possíveis.
- A Maria do Carmo pela paciência, força e inestimável ajuda.
- Ao meu amigo, incansável incentivador e substituto de várias aulas, Joel Vieira Filho.
- A FACEPE pelo apoio financeiro e bolsa concedida.
- A UFRPE pelos valiosos anos em que tive a oportunidade de crescer intelectual, pessoal e socialmente.

LISTA DE FIGURAS

Parte Textual

Figura 1: Via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	21
Figura 2: Esquema da cascata de metástase.....	25
Figura 3: Características adquiridas pelas células tumorais.....	26
Figura 4: Mapa global apresentando a colocação mundial do câncer como causa de morte em idades abaixo de 70 anos em 2015. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda. Fonte: Organização Mundial de Saúde.....	27
Figura 5: Incidência e mortalidade global de câncer no ano de 2018.....	28
Figura 6: Estimativa da incidência de câncer, em números absolutos, nas diversas regiões político-administrativas do Brasil para cada ano do triênio 2020 – 2022.....	29
Figura 7: Representação da translocação entre os cromossomos 15 e 17 – t(15;17) e consequente fusão dos genes PML e RAR α	32
Figura 8: Anatomia da mama de uma mulher: (a) sem tumor e (b) com células anormais no ducto da mamário.....	34
Figura 9: Alvos celulares da quimioterapia.....	37
Figura 10: Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos em relação à fase do ciclo celular.....	39
Figura 11: Estrutura química dos derivados de platina: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.....	41
Figura 12: Estrutura química, em 2D, da doxorubicina.....	42
Figura 13: Estrutura química, em 2D, da 5-FU.....	43
Figura 14: Estrutura química do docetaxel e paclitaxel.....	44
Figura 15: Estrutura, química, em 2D, do selenito e do selol.....	50

Artigo Científico I

Figure 1. Compounds of the selenoglycolicamides series.....	85
Figure 2. Receiver operating characteristic plots generated by the selected Random Forest models for the cross-validations and test sets and the area under the curve and Matthews Correlation Coefficient values. (A) Cross-validation set	

for HL-60, (B) Test set for HL-60, (C) Cross-validation set for MCF7, (D) Test set for MCF7..... 89

Figure 3. Molecular interactions between compound 3 and caspase 3 and caspase 8 at the S1 active sites on both molecules. (A) Caspase 3 active site S1. (B) Caspase 8 active site S1. (C) Molecular interactions between compound 3 and the caspase 7 active site..... 91

Figure 4. Assessment of cellular viability (%) in the HL-60 cell line (A1–A4); MCF7 cell line (B1–B4) and PBMCs (C1–C4), after 24 h of incubation with compounds 3, 6, 7 and 8, at four different concentrations each. IC50 values are expressed in μM . Data were compared with negative control (nontreated group) by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. ANOVA: Analysis of variance; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell..... 93

Figure 5. (A) Assessment of the membrane integrity in HL-60 cells after incubation with different concentrations of the selenium-based compound for 24 h. (B) The percentage of cell viability and the proportions of necrotic and apoptotic HL-60 cells, treated with different concentrations of compound 3, for 24 h. (C) Assessment of mitochondrial depolarization, using the JC-1 assay, in HL-60 cells incubated with different concentrations of compound 3 for 24 h. Data are expressed as the mean \pm SEM and were compared with the negative control by ANOVA, followed by Student–Newman–Keuls test. DOX (1.34 μM). $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. ANOVA: Analysis of variance; DOX: Doxorubicin; SEM: Standard error of the mean..... 94

Figure 6. Determination of caspase 3 and caspase 7 expression levels. The negative control (CN) is characterized by the predominance of living cells (gray quadrant), evidenced by the low expression of caspases 3 and 7. The positive control (CP) shows the high expression of caspases (green quadrant), indicating the activation of the apoptotic cell death pathway, followed by necrotic events (red quadrant). Treatment with 8.0 μM compound 3 (Treat 8.0) shows the predominance of live cells (gray quadrant), accompanied by low caspase expression (green and brown quadrants); treatment with 17.0 μM compound 3 (Treat. 17.0) shows a preponderance of apoptotic events, demonstrated by caspase expression (green and brown quadrants), followed by living cells (gray quadrant). Necrotic cells were not observed. Treatment with 34.0 μM compound 3 (Treat. 34.0) shows high caspase expression (green and brown quadrants). (A) Living cell. (B) Initial apoptosis. (C) Late apoptosis. (D) Necrosis. CN: Untreated cells, cultured with culture medium.....95

Figure 7. (A) Assessment of caspase 3 and 7 expression levels by flow cytometry. HL-60 cells were incubated with different concentrations of the selenium-based compound for 24 h. (B) Percentage of HL-60 tumor cells killed without the activation of the apoptotic pathway. Cells were exposed to different concentrations of compound 3 for 24 h. Data are presented as the mean \pm SEM and were compared with the positive control by ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. DOX (1.34 μM). $**p < 0.01$. ANOVA: Analysis of variance; CN: Untreated cells, cultured with culture medium; DOX: Doxorubicin; SEM: Standard error of the mean.....96

Artigo Científico II

Figure 1. Compounds of the selenoglycolicamides series..... 106

Figure 2. Teratogenic and morphometric effects evaluated in zebrafish embryos after exposure to compound 3 from 24 hpf to 96 hpf. DS - spinal deformation; Dcau - tail deformation; PE - pericardial edema; YS - yolk sac; Coag - coagulation; AM - absence of melanin; DG - generalized deformations; BL - body length; HL - head length; HW - head width..... 111

Figure 3. Molecules that were classified in the in silico tests as 'Active' and showed p values ≥ 0.55 , resulting in the selection of compounds 3 and 6 for the cytotoxicity tests.....112

Figure 4. Receiver operating characteristic plots generated by the selected Random Forest models for the cross-validations and test sets and the area under the curve and Matthews Correlation Coefficient values. (A) Cross-validation set for MCF7, (B) Test set for MCF7..... 114

Figure 5. Assessment of cellular viability (%) in the MCF7 cell line (A1–A2); MCF7 and PBMCs (B1–B2), after 24 h of incubation with compounds 3 and 6, at four different concentrations each. IC₅₀ values are expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data were compared with negative control (nontreated group) by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test. **p < 0.01; ***p < 0.001. ANOVA: Analysis of variance; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell..... 116

Figure 6. Annexin V / PI staining of MCF-7 cells treated with compound 3 at concentrations of 6.12, 12.5 and 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, over a 24-hour period. Data were compared with control (nontreated group) by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. *p < 0.05; ***p < 0.001..... 117

Figure 7. (Affected animals). Percentage of affected animals at 24 - 96 hpf. The reduction in the percentage of affected animals was considered significant when * = p < 0.05. Each experimental group was compared with the control group by one-way ANOVA (24 hpf F(5,23) = 2.86 p = 0.04, 48 hpf F(5,23) = 2.53 p = 0.07, 72 hpf F(5,23) = 2.68 p < 0.06, 96 hpf F(5,23) = 1.95 p = 0.13) followed by Tukey's test. Legend: S5-S65 – compound 3 at 5-65 $\mu\text{g}/\text{L}$ 118

Figure 8. (A, B, C) Morphometry of zebrafish exposed to compound 3 at 96 hpf. Data are expressed as the mean \pm SD analyzed individually for each group compared to the control group using one-way ANOVA followed by Tukey's test. * = p < 0.05. One-way ANOVA results: Body length (F(5, 22) = 3.40, p < 0.05), Head-width (F(5, 22) = 1.87 p > 0.05), Head-length (F(5, 22) = 1.02, p > 0.05). (D) (Number of heartbeats). A heartbeat plot at 24 - 96 hpf reveals the same patterns of number of heartbeats between the zebrafish treated groups and control compared by two-way ANOVA (group (F(5, 1272) = 1.86, p = 0.09) and time (F(3, 1272) = 915.26, p < 0.001)). In all groups, the number of heartbeats increased with time. Legend: C - control; S5-S65 – compound 3 at 5-65 $\mu\text{g}/\text{L}$...119

LISTA DE TABELAS

Parte Textual

Tabela 1. Principais classes de antineoplásicos, seus respectivos mecanismos de ação, principais tipos de cânceres sobre os quais atuam e seus principais representantes..... 45

Tabela 2. Dose recomendada e limite máximo tolerado de Se de acordo com a idade..... 47

Artigo Científico I

Table 1. Summary of the training, internal cross-validation, and test results and the corresponding matched results, which were obtained using the Random Forest algorithm on the total set of 36,827 compounds tested against HL-60 cells (29,461 in the training set and 7366 in the test set) 88

Table 2. Summary of the training, internal cross-validation, and test results and the corresponding matched results, which were obtained using the Random Forest algorithm on the total set of 30,326 compounds tested against MCF7 cells (24,260 in the training set and 6066 in the test set) 88

Table 3. Prediction of activity, with their respective probabilities (p), calculated using the RF model for compounds 2–16 against HL-60 and MCF7 cells..... 90

Table 4. Activation sites for caspases 3 and 8..... 90

Table 5. Interaction energies between compound 3 and caspases 3 and 8, at each active site..... 90

Table 6. Activation site in caspase 7..... 92

Table 7. The mean and standard error of the mean for the cytotoxic activity of selenoglycolicamides in HL-60, MCF7 and peripheral blood mononuclear cells compared with doxorubicin..... 92

Artigo Científico II

Table 1. Summary of the training, internal cross-validation, and test results and the corresponding matched results, which were obtained using the Random Forest algorithm on the total set of 30.326 compounds tested against MCF7 cells (24.260 in the training set and 6.066 in the test set)..... 114

Table 2. Prediction of activity, with their respective probabilities (p), calculated using the RF model for compounds 2 – 10 against MCF7 cells. 114

Table 3. The mean and standard error of the mean for the cytotoxic activity of selenoglycolicamides in MCF7 and peripheral blood mononuclear cells compared with doxorubicin..... 115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BE – Brometo de etídio

CI₅₀ - Concentração que inibe 50% do crescimento celular

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

DCF - Diacetato de carboxifluoresceína

DMSO - Dimethyl sulphoxide (Dimetil Sulfóxido)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DOX – Doxorrubicina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM – Erro padrão médio

EROS – Espécies reativas de oxigênio

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

HL-60 – Linhagem celular - Leucemia promielocítica aguda

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

IARC - International Agency for Research on Cancer

IP – Iodeto de propídio

IV - Espectroscopia de infravermelho

LA – Laranja de acridina

LA/BE – Laranja de acridina/Brometo de etídio

LLA – Leucemia linfocítica aguda

LMA – Leucemia mieloide aguda

LPA – Leucemia promielocítica aguda

MCF7 – Adenocarcinoma mamário

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

NT – Não testado

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

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

PML – Gene que codifica a proteína da leucemia promielocítica

RAR α – Gene do receptor alfa do ácido retinóico

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear carbono-13

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Se – Selênio

T3 – Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TRAT - Tratamento

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

RESUMO

O câncer configura-se como um importante problema de saúde pública, principalmente para os países em desenvolvimento, motivando uma crescente busca mundial pelo desenvolvimento de novos e mais eficientes fármacos contra essa doença. Nessa perspectiva, os compostos derivados do selênio ganham significativa importância devido às diversas pesquisas que destacam o seu potencial antitumoral, bem como baixa citotoxicidade para células não tumorais. Diante disso, nosso objetivo foi avaliar o potencial antitumoral de um composto a base de selênio, bem como estabelecer a via de morte ativada pelo organoselênio. Fizemos uma análise de triagem virtual (*in silico*) baseada em ligante para identificar selenoglicolicamidas com potencial atividade antitumoral, bem como análises *in vitro* usando as linhagens celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário). Resultados e Conclusão: Os compostos 3, 6, 7 e 8 foram selecionados para os testes de citotoxicidade *in vitro*, pois de acordo com os resultados da espectrofotometria se mostraram ativos para ambas as linhagens celulares testadas (HL-60 e MCF-7). Avaliamos a citotoxicidade dos derivados de selênio selecionados e verificou-se que o composto 3 apresentou os melhores resultados frente a linhagem celular HL-60 ($CI_{50} = 9,41\mu M$), evidenciado pela diminuição da viabilidade celular de forma dose-dependente, o composto também foi capaz de induzir a morte celular em uma frequência semelhante à observada para a doxorrubicina, droga largamente utilizada no tratamento de diversos cânceres, contudo apresentou baixa toxicidade para células não tumorais (PBMC). Entre os parâmetros essenciais que devem ser observados durante o desenvolvimento de novos medicamentos contra o câncer, o equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos é uma consideração importante. Muitos medicamentos têm atividade citotóxica, mas não são seletivos contra células tumorais e também podem afetar células não tumorais. A despolarização da membrana mitocondrial em taxas mais altas que o controle negativo ($p < 0.05$) e semelhantes ou mais altas do que o controle positivo ($p < 0.001$), confirma que o composto promove apoptose através da via mitocondrial intrínseca. O composto 3 induziu a expressão de caspases 3 e 7 de forma dose-dependente, nas concentrações de 17,0 e 34,0 μM os níveis de ativação foram semelhantes e superiores a da doxorrubicina, respectivamente, confirmando desta forma, a ativação do mecanismo de morte pela via apoptótica. A indução do processo de apoptose faz com que a célula moribunda da membrana plasmática permaneça intacta, o que impede a liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido circulante. Além disso, um estudo de docking mostrou que o composto 3 tem boas energias de interação com as caspases 3, 7 e 8, que participam na via de morte celular apoptótica. Esses resultados sugerem que o selênio tem potencial farmacológico significativo para o direcionamento seletivo de células tumorais, induzindo eventos moleculares e celulares que culminam na morte das células tumorais.

Palavras-chave: Atividade anticâncer, Células HL-60, Células MCF7, Organoselênio, Selenoglicolicamidas, Triagem virtual, Avaliações *in vitro*.

ABSTRACT

The cancer appears as a major public health problem, especially for developing countries. Therefore, they are increasing around the world, research aimed at the development of new and more efficient drugs against this disease. In this perspective, compounds derived from selenium gain significant importance due to the various studies that highlight their antitumor potential, as well as low cytotoxicity for non-tumor cells. Therefore, our objective was to evaluate the antitumor potential of a selenium-based compound, as well as to establish the pathway of death activated by organoselenium. We performed a ligand-based virtual screening analysis (*in silico*) to identify selenoglycolicamides with potential antitumor activity, as well as *in vitro* analyzes using HL-60 (human promyelocytic leukemia) and MCF-7 (breast adenocarcinoma) cell lines. Results and Conclusion: Compounds 3, 6, 7 and 8 were selected for *in vitro* cytotoxicity tests, because, according to the spectrophotometry results, they were active for both cell lines tested (HL-60 and MCF-7). We evaluated the cytotoxicity of the selected selenium derivatives and it was found that compound 3 showed the best results against the HL-60 cell line (IC₅₀ = 9.41 μM), evidenced by the decrease in cell viability in a dose-dependent manner, the compound also was able to induce cell death at a frequency similar to that observed for doxorubicin, a drug widely used in the treatment of several cancers, however it presented low toxicity to non-tumor cells (PBMC). Among the essential parameters that must be observed when developing new cancer drugs, the balance between therapeutic and toxicological effects is an important consideration. Many drugs have cytotoxic activity, but are not selective against tumor cells and can also affect non-tumor cells. Depolarization of the mitochondrial membrane at rates higher than the negative control (p <0.05) and similar or higher than the positive control (p <0.001), confirms that the compound promotes apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway. Compound 3 induced the expression of caspases 3 and 7 in a dose-dependent manner at concentrations of 17.0 and 34.0 μM the activation levels were similar and higher than doxorubicin, respectively, thus confirming the etivation of the mechanism death by apoptotic route. The induction of the apoptosis process causes the dying cell of the plasma membrane to remain intact, which prevents the release of pro-inflammatory cytokines in the circulating tissue. In addition, a docking study showed that compound 3 has good interaction energies with caspases 3, 7 and 8, which participate in the path of apoptotic cell death. These results suggest that selenium has significant pharmacological potential for the selective targeting of tumor cells, inducing molecular and cellular events that culminate in the death of tumor cells.

Keywords: Anticancer activity, HL-60 cells, MCF7 cells, organoselenium, selenoglycolicamides, virtual screening, *In vitro* evaluations

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 CÂNCER – ASPECTOS GERAIS.....	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	26
2.3 LEUCEMIA.....	30
2.4 CÂNCER DE MAMA.....	33
2.5 FORMAS DE TRATAMENTO DO CÂNCER.....	36
2.6 COMPOSTOS DE SELÊNIO.....	46
2.7 ENSAIOS <i>IN SILICO</i> , <i>IN VITRO</i> , <i>IN VIVO</i> E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS.....	51
3. OBJETIVOS.....	57
3.1 OBJETIVO GERAL.....	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4. REFERÊNCIAS.....	58
ARTIGO I.....	82
ARTIGO II.....	101
5. CONCLUSÃO.....	131
ANEXO.....	133
ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO.....	133

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

Para este trabalho levantou-se a hipótese que compostos derivados do ácido selenoglicólico, apresentam atividade antitumoral em linhagens tumorais humanas. A fim de avaliar tal atividade, foram desenvolvidos ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, como a análise do tipo de morte celular induzido pelo composto, a ação sobre a integridade de membrana, o potencial de membrana mitocondrial e a ativação das caspases efetoras 3 e 7, bem como bioensaios com o modelo experimental de zebrafish.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER - ASPECTOS GERAIS

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 277 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial de invadir os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Sua origem se dá pela combinação de alterações genéticas e epigenéticas induzidas por fatores ambientais e de estilo de vida, que desencadeiam a inadequada ativação ou inativação de genes específicos, levando à transformação neoplásica (BRASIL, 2011, 2014; BIENNIAL REPORT, 2013; HASSANPOUR e DEHGHANI, 2017).

Em geral, o câncer interrompe as relações celulares e resulta na disfunção de genes vitais, promovendo perturbações no ciclo celular e levando à proliferação anormal de células (CIGUDOSA et al., 1999; SETO, HONMA e NAKAGAWA, 2010). Os proto-oncogenes são responsáveis pela divisão celular e crescimento em condições normais, mas se tornam oncogenes durante a mutação genética. Além disso, a falta de genes supressores de tumor desencadeia a divisão descontrolada das células (MATLASHEWSKI et al., 1984; SHTIVELMAN et al., 1985).

Somando-se a isso, modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, modificações de histonas e posição do nucleossomo, desempenham papéis importantes na formação do câncer (ALVAREZ-BUYLLA et al., 2008; PORTELA e ESTELLER, 2010). As células cancerígenas são caracterizadas por uma vasta redução na metilação do DNA (redução de cerca de 5-6% na quantidade total de 5-metil citosina) (GOELZ et al., 1985). A redução global de H4K16 (grupo de lisina na cauda N-terminal da histona 4) monoacetilada constitui a maioria das modificações das histonas nas células cancerígenas (FRAGA et al., 2005). Todas as famílias de proteínas modificadoras da cromatina estão associadas ao câncer, embora na maioria dos casos os mecanismos moleculares subjacentes às suas funções permaneçam desconhecidos (SHARMA, KELLY e JONES, 2010).

Os mais de 277 tipos de câncer podem ser agrupados em quatro grandes grupos dependendo dos tecidos nos quais surgem. Os **carcinomas** são originários das células epiteliais da pele ou que revestem os órgãos internos, sendo o tipo mais frequente, representando 80% dos casos diagnosticados a cada ano. Os **sarcomas** são originários dos ossos, cartilagens, tecido adiposo, músculos, vasos sanguíneos ou outros tecidos conectivos ou de suporte. As **leucemias** originam-se em tecidos responsáveis pela formação das células sanguíneas como a medula óssea, levando a formação de um número anormal de células sanguíneas. Por fim, os **linfomas** são originários das células do sistema imune (PELENGARIS e KHAN, 2013; HASSANPOUR e DEHGhani, 2017).

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

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

Segundo Bogliolo e Brasileiro (2011), a formação e desenvolvimento de neoplasias, conhecido como carcinogênese, é um processo lento e complexo que se desenvolve em três principais etapas: iniciação, promoção e progressão.

O estágio inicial é caracterizado por uma série de mutações cumulativas no material genético, que predispõe células normais à evolução maligna e imortalidade. As alterações podem ser decorrentes de uma lesão genética não letal, que pode ocorrer espontaneamente ou pela exposição à agentes ambientais, como substâncias químicas, radiação ou vírus.

A promoção, segunda etapa da carcinogênese, é marcada pela proliferação da célula mutada, bem como sua ampliação clonal (HEIDI et al., 2009; KUMAR et al., 2010). A progressão é um processo irreversível, caracterizada pela presença de alterações fenotípicas, instabilidade gênica, aceleração no crescimento, autonomia replicativa, invasiva e metástase (OLIVEIRA et al., 2007).

A progressiva transformação de uma célula normal para o estado neoplásico é um processo complexo e requer a aquisição sucessiva de determinadas características que lhe possibilita tornar-se tumorigênica e, finalmente maligna. Hanahan e Weinberg (2011) sugerem que um grupo de seis mutações na fisiologia das células são suficientes para que o câncer se desenvolva. Estas seis mutações, acompanhadas da instabilidade genética, são essenciais para a origem e disseminação de tumores. Tais características são:

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

2) Insensibilidade aos supressores de crescimento: As células cancerígenas devem contornar programas eficazes que regulam negativamente a proliferação de células, muitos dos quais dependem da ação de genes supressores de tumor, dentre os quais, destacam-se o *RB* e o *TP53*. Os produtos desses genes atuam

como controladores centrais dentro de dois circuitos complementares que regem a proliferação e a ativação da senescência celular, bem como programas apoptóticos (BURKHART e SAGE, 2008; KNUDSEN e KNUDSEN, 2008; AYLON e OREN, 2011; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A proteína pRb, produto do gene *RB*, integra sinais de fontes intra e extracelulares (principalmente) e, em resposta, decide se uma célula deve ou não prosseguir o seu ciclo de crescimento e divisão. Foi observado que numa ampla gama de cânceres humano esse gene encontra-se inativado devido a diversos fatores, como: mutação, deleção, perda de expressão, superexpressão de ciclinas do tipo D, expressão de oncoproteínas virais, entre outros (BURKHART e SAGE, 2008; GORDON e DU, 2011; ZHAO et al, 2014).

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

3) Resistência à morte celular: A apoptose, ou morte celular programada, é um processo geneticamente programado que resulta na fragmentação do DNA e morte celular, desempenha papel importante em vários processos fisiológicos, tais como remodelagem dos tecidos, e na manutenção do sistema imune. Entretanto, a sua desregulação pode acarretar malformações e doenças, como é observado no desenvolvimento e progressão do câncer, onde a célula falha ao iniciar o processo de apoptose em resposta ao dano no DNA. A apoptose é orquestrada por uma família de cisteína proteases chamadas caspases.

Duas vias apoptóticas são possíveis, a via extrínseca, ocorre através da ligação de ligantes (Fas, TNF α e TRAIL) em seus receptores de membrana, recrutamento de FADD e ativação da caspase-8. A outra via, chamada de via

intrínseca ou mitocondrial, envolve a liberação de citocromo *c* da mitocôndria, desencadeada pela proteína Bax, membro pró-apoptótico da família Bcl2. A liberação de citocromo *c* leva à ativação de Apaf-1, uma proteína ATP ou dATP dependente capaz de se ligar à pró-caspase-9, formando um apoptossomo capaz de auto ativar a caspase-9. Tanto a caspase-8 quanto a caspase-9 ativadas desencadeiam a ativação de caspases efetoras (caspases-3,-6,-7) capazes de clivar substratos celulares levando à apoptose (Fig. 1) (LIU et al., 1996; LI et al., 1997; YANG et al., 1997; ZOU et al., 1997; GREEN, 2000; OW et al., 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011; TAKEKAWA et al., 2011).

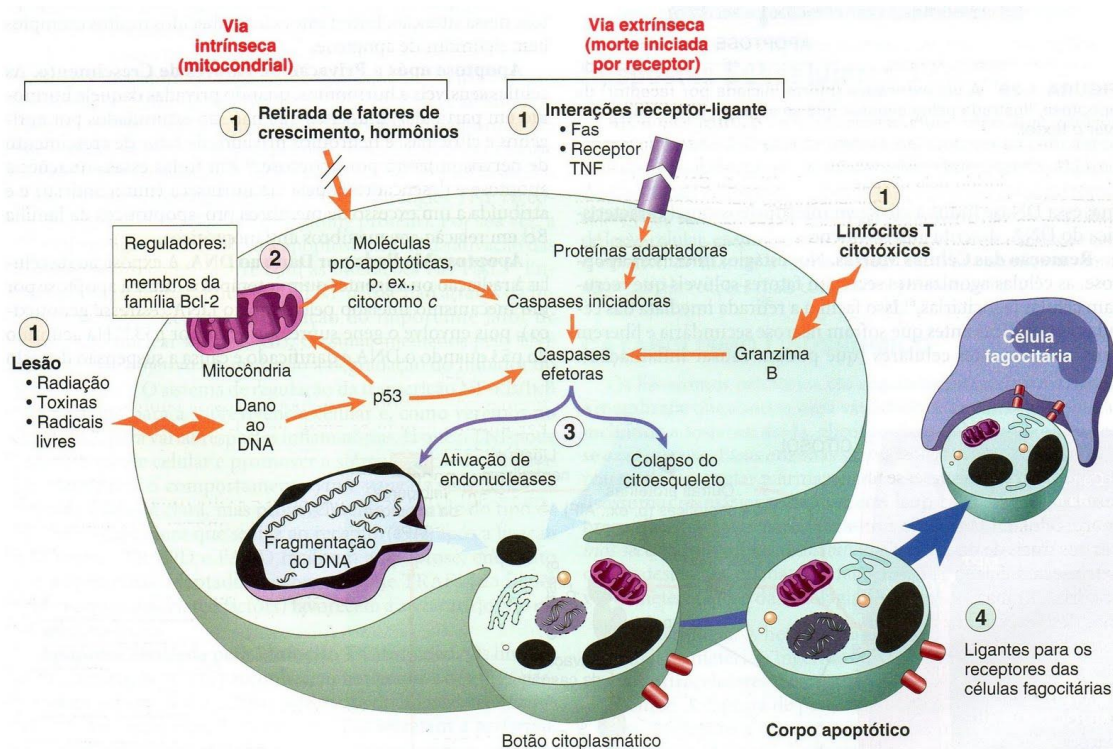


Figura 1. Via intrínseca e extrínseca da apoptose. Fonte: KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005.

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

As células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias para limitar ou burlar a apoptose, a mais comum é a perda da função supressora de tumores do gene *TP53*. Alternativamente, os tumores podem: aumentar a expressão de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x_L) ou de sinais de sobrevivência (Igf-1/2), baixar a expressão de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim Puma), entre outros. Acredita-se que a multiplicidade de mecanismos para evitar a apoptose reflete a diversidade de sinais indutores de apoptose que as populações de células cancerígenas encontram durante a sua evolução para o estado maligno (HANAHA e WEINBERG, 2011).

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

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

Acredita-se que a ativação da autofagia, em células normais, age como mecanismo supressor de tumores. Contudo, nas células tumorais a ativação desta via possui papel distinto, ou seja, depende do estágio da tumorigênese. Nos estágios iniciais atua como um mecanismo protetor, evitando a progressão tumoral, entretanto em fases avançadas da doença, a autofagia dificulta a eliminação do tumor e leva à resistência ao tratamento, uma vez que contribui

para a manutenção dos níveis energéticos intracelulares, permitindo a sobrevivência das células tumorais (RUBINSZTEIN et al., 2007; ROSENFELDT e RYAN, 2011). Quando expostas a tratamentos como, quimioterápicos, as células cancerígenas podem entrar em um estado de dormência reversível, ativando para isso a via autofágica (LU et al., 2008; WHITE e DIPAOLA, 2009). Também é possível que a autofagia esteja envolvida na promoção da metástase. Quando as células tumorais perdem o contato com a matriz extracelular, o que normalmente levaria à morte celular apoptótica, a autofagia é ativada para promover a sobrevivência da célula e, desta forma, contribuir para a invasão de outros tecidos (XU et al., 2013).

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

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

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

4) Potencial replicativo ilimitado: As células normais possuem um potencial limitado de crescimento e divisão celular que está relacionado com o tamanho dos telômeros. Cada vez que a célula se divide os telômeros tornam-se menores,

após um número crítico de divisões celulares a célula identifica esse encurtamento como um dano no DNA (FAGAGNA et al., 2003). Conseqüentemente a célula responde através da ativação de genes que impedem a célula de proliferar, levando-a ao estado senescente (processo de envelhecimento) (ALLSOPP et al., 1992). Porém, nas células cancerígenas, os mecanismos de defesa que levam a célula a senescência - estão inativados. Isso faz com que essas células consigam manter a integridade de seus telômeros e, conseqüentemente, adquiram potencial replicativo ilimitado (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

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

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

O processo de invasão e metástase envolve uma seqüência de etapas denominadas de cascata de invasão e metástase. Este processo prevê uma série de alterações na biologia da célula tumoral, seguida de invasão local, na seqüência ocorre à invasão e posterior evasão dos sistemas linfático e hematopoiético para o parênquima de tecidos distantes (extravasamento), formação de pequenos nódulos de células cancerígenas (micrometástases) e, finalmente, do desenvolvimento de lesões micrometastáticas em tumores

macroscópicos, este último passo é chamado de colonização (Fig. 2) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

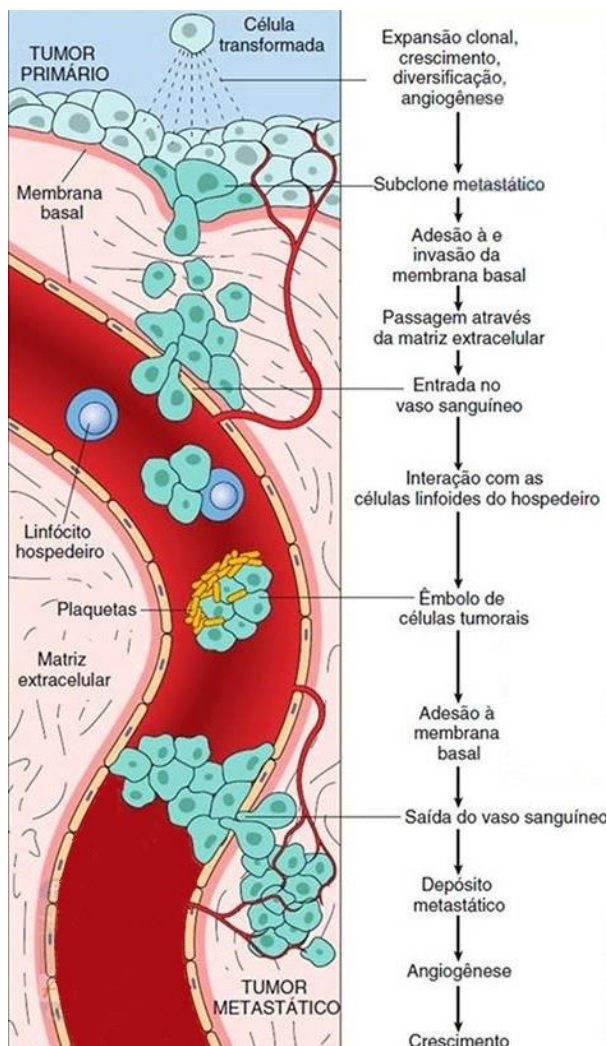


Figura. 2. Esquema da cascata de metástase. Adaptada de ROBBINS e COTRAN: Patologia: Bases Patológicas das Doenças, 2005.

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

células da imunidade inata e adaptativa contribuem para a progressão tumoral, fornecendo várias moléculas bioativas para o microambiente tumoral como, fatores de crescimento e sobrevivência e modificando enzimas que facilitam a angiogênese, invasão e metástase (Fig. 3).

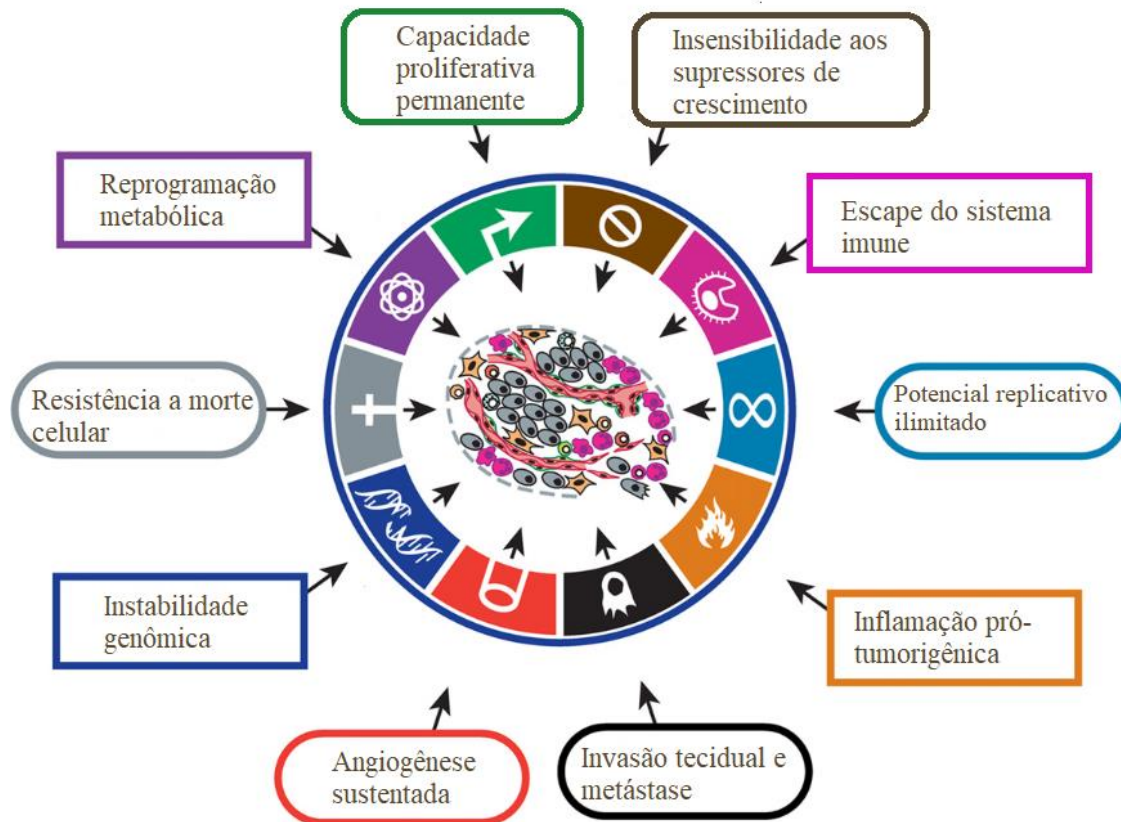


Figura 3. Características adquiridas pelas células tumorais. Adaptada de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, em 2015 aproximadamente uma de cada seis mortes foi causada por esta doença, representa um total de 8,8 milhões de óbitos. De acordo com a OMS (2015), o câncer foi a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos em 91 dos 172 países, sendo o terceiro ou quarto lugar em outros 22 países (Fig.4). Um a cada cinco homens e uma a cada seis mulheres em todo o mundo desenvolvem câncer durante sua vida, e um a cada oito homens e uma a cada 11 mulheres morrem.

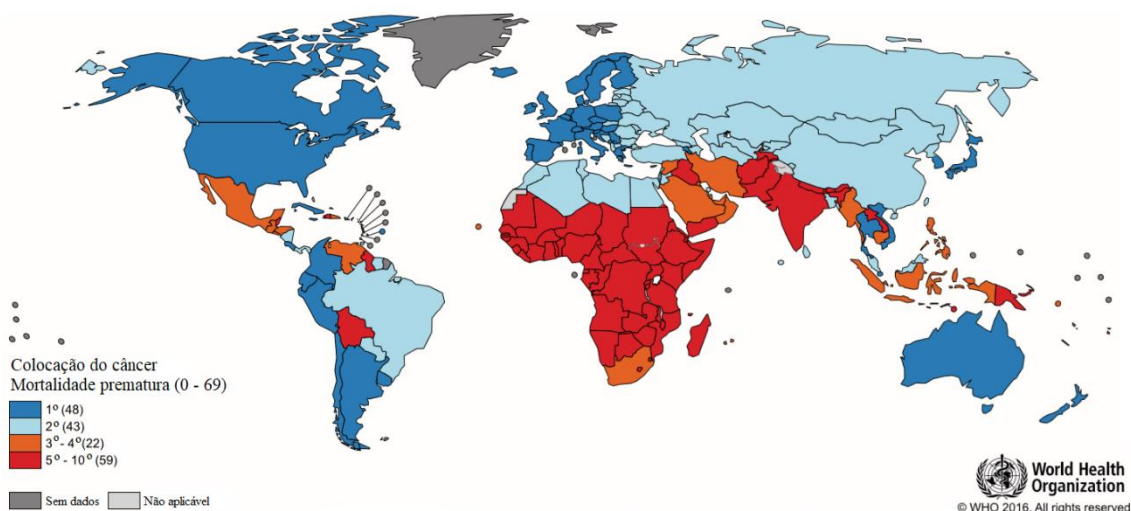


Figura 4. Mapa global apresentando a colocação mundial do câncer como causa de morte em idades abaixo de 70 anos em 2015. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda. Fonte: Organização Mundial de Saúde.

Avalia -se que em 2018 a carga global dessa doença tenha aumentado para 18,1 milhões de novos casos e aproximadamente 9,6 milhões de mortes (Fig. 2). O câncer de pulmão e o de mama feminina são os mais prevalentes, para cada um desses tipos são estimados 2,1 milhões de diagnósticos, o que corresponde a 11,6% da carga total de incidência. O câncer colorretal é o terceiro mais comumente detectado, com 1,8 milhões de casos (10,2% do total), seguido pelo de próstata com 1,3 milhão de casos (7,1%) e o de estômago com 1,0 milhão de casos (5,7%) (BRAY, et al., 2018).

Em homens, as maiores porcentagens de tipos de câncer ocorrem na próstata, pulmão e brônquios, cólon e reto e bexiga urinária, respectivamente. Em mulheres, o câncer de mama, de pulmão e brônquios, de cólon e reto, colo uterino e tireoide são os mais prevalentes, respectivamente. Esses dados indicam que o câncer de próstata e de mama constitui uma parcela importante do câncer em homens e mulheres, respectivamente (SIEGEL, MILLER, e JEMAL, 2016; BRAY, et al., 2018). Para as crianças, as leucemias são a forma mais frequente de câncer, com mais de 35% dos casos. De causa complexa, envolvendo eventos genéticos, infecciosos e ambientais, são invariavelmente fatais se não tratadas adequadamente, contudo com resultados cada vez melhores se diagnosticadas precocemente e realizado o tratamento correto (INCA, 2017).

Estima-se que a incidência de câncer continue aumentando até 2030, com 27 milhões de novos casos, podendo chegar a 75 milhões de pessoas com câncer e 17 milhões de mortes. O maior efeito desse aumento irá incidir em países de baixa e média renda. O crescimento e envelhecimento da população nos países em desenvolvimento, somado a falta de detecção precoce e acesso ao tratamento, resultam na forma desproporcional com que estes países são afetados pelo câncer em relação ao mundo. Mais de 60% do total de casos ocorrem na África, Ásia, América Central e América do Sul, representando 70% de mortes por câncer no mundo (Fig. 5). (BRASIL, 2011; WORLD CANCER REPORT, 2014).

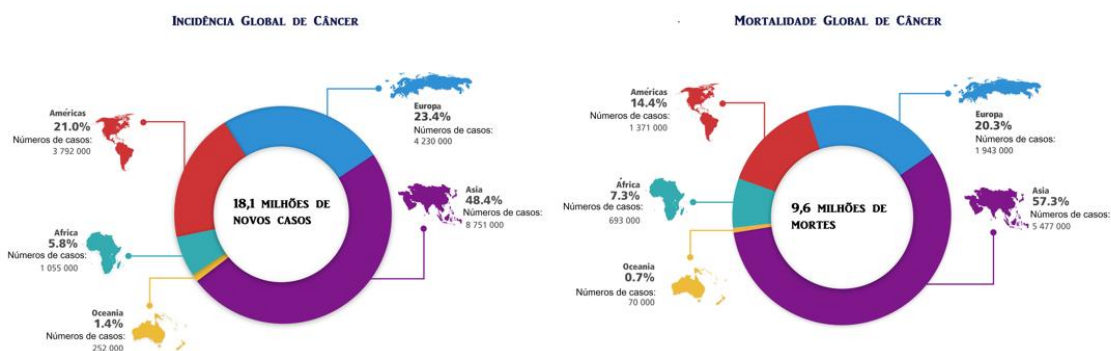


Figura 5. Incidência e mortalidade global de câncer no ano de 2018. Adaptada de BRAY, et al, 2018.

O fumo é de longe o fator de risco mais importante para a ocorrência do câncer. Foi a causa, em 2008 e 2012, de 22% de todas as mortes ocasionadas por câncer (ERIKSEN et al., 2012; GBD, 2016). As infecções crônicas causadas pelos vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), papilomavirus humano (HPV) e outros agentes infecciosos, representam outro importante fator de risco. Para o ano de 2008 foi estimado que dos 12,7 milhões de casos de câncer 2,1 milhões (16,4%) seriam causados por infecções. Esta porcentagem é substancialmente maior nas regiões menos desenvolvidas do mundo (23,4% de todos os cânceres) em comparação com as regiões mais desenvolvidas (7,5%) (DE MARTEL et al., 2012).

Para o Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para cada ano do triênio 2020/2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer. As regiões mais afetadas, em números absolutos, serão: a sudeste,

nordeste e sul, respectivamente. As Regiões Sudeste e Nordeste concentram aproximadamente 70% da ocorrência de casos novos, sendo que, na Região Sudeste, encontra-se quase a metade dessa incidência (Fig. 6) (BRASIL, 2018).



Figura 6. Estimativa da incidência de câncer, em números absolutos, nas diversas regiões político-administrativas do Brasil para cada ano do triênio 2020 - 2022. Adaptada de BRASIL, 2019.

O tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos será o de pele não melanoma (177 mil novos casos), que corresponde a 28,4% do total estimado. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos mais incidentes em homens serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), traqueia, brônquio e pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), traqueia, brônquio e pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais. (BRASIL, 2019).

Existe uma grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes regiões do Brasil. Nas regiões sul e sudeste predominam os cânceres de próstata e de mama feminina, bem como os cânceres de cólon e reto,

traqueia, brônquio e pulmão. A região centro-oeste, apesar de semelhante, incorpora em seu perfil os cânceres do colo do útero, cólon e reto entre os mais incidentes. Nas regiões norte e nordeste, apesar de também apresentarem os cânceres de próstata e mama feminina entre os principais, a incidência dos cânceres do colo do útero e estômago também figuram entre os mais incidentes. A região norte é a única do país onde as taxas dos cânceres de mama e do colo do útero se equivalem entre as mulheres (BRASIL, 2019).

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

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

2.3 LEUCEMIA

As leucemias (todos os subtipos combinados) são neoplasias malignas hematológicas resultantes da proliferação anormal de células progenitoras hematopoiéticas da linhagem mieloide e linfoide. O tipo da leucemia depende do tipo de célula sanguínea que se torna cancerosa e, se cresce rápido ou

lentamente, o que caracteriza a doença em aguda ou crônica. Frequentemente encontrada em pacientes com idade de 0 a 18 anos, representa 25-30% de todos os tumores nessa população, aparecendo quase sempre na sua forma aguda (REIS et al., 2011; REDAELLI et al., 2004). No Brasil, para essa mesma faixa etária, o câncer é a segunda causa de morte e a leucemia é a forma mais comum com quase 30% de incidência (INCA, 2014).

De acordo com a citologia, imuno-histoquímica e citogenética, a leucemia pode ser classificada como: leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA), representando 70-80% e 15% dos casos, respectivamente (MENDONÇA, 2003). A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo da LMA e corresponde a cerca de 20% a 25% das LMAs nos países latino-americanos. Em cerca de 90% dos casos a LPA está associada à translocação entre os cromossomos 15 e 17 – $t(15;17)(q22;q21)$, que resulta na fusão dos genes *PML* (codifica a proteína da leucemia promielocítica) e *RAR α* (gene receptor alfa do ácido retinóico) identificada por Rowley e colaboradores, em 1977 (ROWLEY et al., 1977; GRIMWADE et al., 1996) (Fig. 7).

A translocação $t(15;17)(q24;q21)$, típica da LPA, leva à quebra do gene *PML*, regulador da apoptose e estabilizador do genoma, e do gene *RAR α* , expresso maioritariamente nas células hematopoiéticas e regulador da transcrição de outros genes. O gene de fusão *PML-RAR α* , codifica a oncoproteína PML/RAR α , que apresenta uma elevada afinidade a um amplo espectro de enzimas epigenéticas, motivando a condensação da cromatina com consequente repressão da transcrição de genes importantes para a diferenciação mieloide, conduzindo ao bloqueio da diferenciação da linhagem hematopoiética mieloide e à acumulação de promielócitos anormais na medula óssea (MO). A degradação desta oncoproteína é induzida pelo ácido all-transretinóico (ATRA) e pelo trióxido de arsênio (ATO), conduzindo a dois fenômenos importantes para o controle da doença, com potencial sinergismo: indução de diferenciação e aumento da apoptose dos promielócitos anormais (MANDELLI, AVVISATI e COCO, 2002; LO-COCO e HASAN, 2014; THÉ, PANDOLFI e CHEN, 2017).

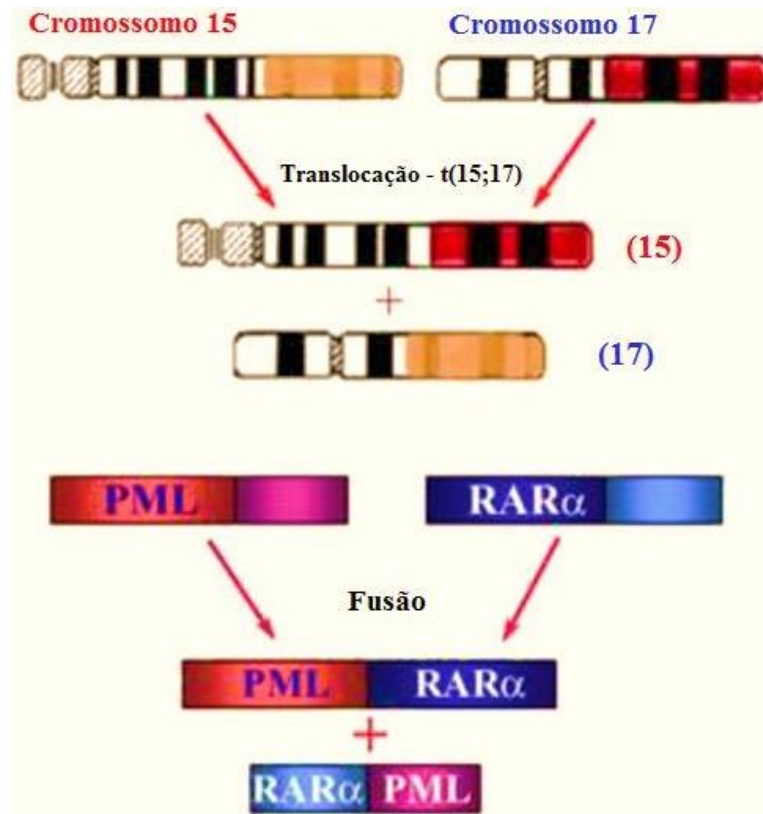


Figura 7. Representação da translocação entre os cromossomos 15 e 17 – t(15;17) e consequente fusão dos genes PML e RAR α . Adaptada de: <http://hematologyinprogress.net/?p=1718>. Acesso em: 19 de Mar. de 2016.

A LPA apresenta características clínicas, morfológicas e biológicas que a distinguem dos demais subtipos dessa doença. Morfologicamente, apresenta promielócitos anormais, núcleo excêntrico, abundante granulação no citoplasma, presença de múltiplos bastonetes de Auer no citoplasma, interrupção da maturação mieloide e acúmulo de células leucêmicas semelhantes à mielócitos na medula óssea (BENNET et al., 1976). Do ponto de vista clínico, difere das outras LMAs por estar associada à coagulopatia em cerca de 60% a 90% dos pacientes sendo responsável pelas altas taxas de morte durante as fases iniciais do tratamento (SANZ et al., 1999; HERNANDEZ et al., 2011; CANDONI et al., 2003; BREEN, GRIMWADE e HUNT, 2012; DAVID e MATHEWS, 2018). Na maioria dos casos, os pacientes apresentam sintomas relacionados à anemia, trombocitopenia, organomegalia e distúrbios da coagulação. Outras características menos frequentes são observadas em 15% a 20% dos pacientes.

Infiltrações no sistema nervoso central e na pele são achados raros (MENÉNDEZ et al., 2000; MANDELLI, AVVISATI e COCO, 2002; SUN, 2002).

O tratamento de escolha para a LPA inclui a combinação do ATRA e quimioterápicos, que podem ser utilizados em conjunto com outras terapias. Os protocolos de quimioterapia duram mais de 18 meses (SANZ et al., 2004; LAND et al., 2012). Melhorias nos resultados do tratamento foram observadas em crianças com essa neoplasia, contudo estudos ainda relatam a ocorrência de algumas complicações como leucemia secundária e complicações nos sistemas: musculoesquelético, pulmonar, urinário, gastrointestinal, cardíaco e nervoso (MACKENZIE, 2001).

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

2.4 CÂNCER DE MAMA

Em países desenvolvidos e em desenvolvimento, o câncer de mama é o tipo mais incidente e com as maiores taxas de mortalidade na população feminina. Em 2018, ocorreram 2,1 milhões de casos novos, o equivalente a 11,6% de todos os cânceres estimados. Esses valores correspondem a um risco estimado de 55,2/100 mil. As maiores taxas de incidência foram registradas na Austrália e Nova Zelândia, nos países do Norte da Europa e na Europa ocidental (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018).

No Brasil, para os anos do triênio 2020 – 2022 são estimados 66.280 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminino é o mais frequente em todas as Regiões brasileiras, com um risco estimado de 81,06 /100 mil na Região Sudeste; 71,16/100 mil na Região Sul; 45,24/100 mil na Região Centro-Oeste; 44,29/100 mil na Região Nordeste e de 21,34/100 mil na Região Norte (INCA, 2019).

O tipo histológico mais comum para o câncer de mama feminina é o carcinoma de células epiteliais, que se divide em lesões *in situ* e invasoras. Grande parte desses tumores origina-se dentro de tubos finos chamados ductos, e são conhecidos como carcinoma ductal invasivo, todavia, como o câncer de mama é caracterizado por ser um grupo heterogêneo de doença, existem outros subtipos de carcinomas diagnosticados, como o tubular, o lobular, o mucinoso, o micropapilar, o medular e o papilar (STEWART e WILD, 2014; INCA, 2015; BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os estágios iniciais do câncer de mama estão no seio ou nas glândulas sob os braços, conhecidos por serem os gânglios linfáticos (Figura 8.a,b). No caso de câncer de mama invasivo, as células cancerígenas se espalham para além dos ductos e são encontradas nos tecidos gordurosos da mama. O câncer acaba se espalhando por todo o corpo, quando rompe as membranas celulares (membranas basais). Quando isso ocorre, as células cancerígenas podem ser transportadas na corrente sanguínea para induzir metástases, principalmente nos pulmões e nos ossos. A maioria dos cânceres de mama geralmente surgem do revestimento dos ductos de leite ou das glândulas de leite encontradas nos lóbulos da mama. O local mais comum é a parte superior externa da mama (POLLOCK, 2006; BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

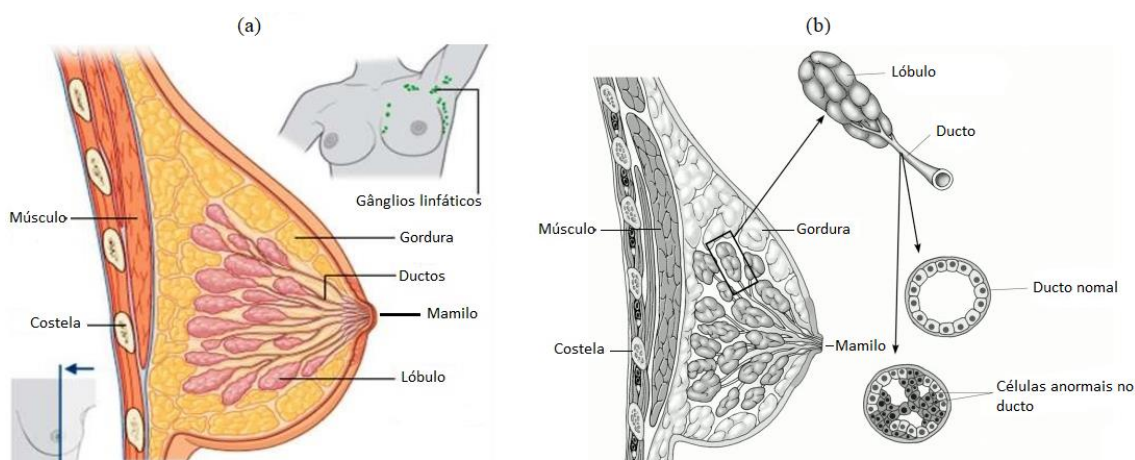


Figura 8. Anatomia da mama de uma mulher: (a) sem tumor e (b) com células anormais no ducto da mamário. (a) Adaptado de (Paul Crea, St. Vincent's Clinic, 2007) e (b) Adaptado da American Cancer Society.

Clinicamente, o câncer de mama é caracterizado em três tipos básicos, conforme suas propriedades imuno-histoquímicas (estado hormonal), temos:

câncer de mama positivo para receptores hormonais, positivo para o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) e triplo negativo (SORLIE et al., 2003; PARKER et al., 2009; SOTIRIOU e PUSZTAI, 2009; GEYER e REIS-FILHO, 2009).

Receptor hormonal positivo são os cânceres de mama com receptor de estrogênio positivo (ER+) / progesterona positivo (PR+), eles se dividem em dois subtipos: luminal A e luminal B. O subtipo luminal A tende a ser ER+ e/ou PR+ e HER2-. Os tumores luminais B tendem a ser ER+ e/ou PR+ e HER2+ [ou HER2- com alto Ki67 (antígeno utilizado para medir a taxa de proliferação das células cancerosas, quanto maior essa taxa, mais agressivo o tumor tende a ser)]. As estratégias para o tratamento desse tipo de câncer são muito eficazes, e portanto, apresenta no geral um melhor prognóstico (NAGARAJ, ELLIS e MA, 2012; TANG et al., 2016).

Os cânceres de mama HER2+ são positivos para o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano, mas negativo para o receptor hormonal (ER+/PR+). Comparado com o tipo ER+, o HER2+ tende a ser muito mais agressivo e de crescimento rápido e, portanto, apresenta um pior prognóstico devido a superexpressão de receptores na superfície das células cancerígenas, o que acarreta em um maior aporte de fatores de crescimento (RYBAROVA et al., 2006; SOTIRIOU e PUSZTAI, 2009; MITRI, CONSTANTINE e O'REGAN, 2012)

Estima-se que 15% dos cânceres de mama diagnosticados sejam do tipo triplo negativo, este se caracteriza por não expressar os genes dos receptores de estrogênio, progesterona e do HER2+. Como o câncer de mama triplo negativo não superexpressa os receptores, eles têm de longe o pior prognóstico devido a falta de tratamentos direcionados e maior chance de recorrência. Clinicamente, esse tipo é tratado com uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (ANDERS e CAREY, 2008; FOULKES, SMITH e REIS-FILHO, 2010; TANG et al., 2016).

A doença é multifatorial e os riscos para o câncer de mama envolvem fatores internos, como a predisposição hereditária (relatos de câncer de ovário na família) ou dependente da constituição hormonal, fatores genéticos

(mutações dos genes BRCA1 e BRCA2) e externos, tais como ambientais, agentes químicos, físicos e biológicos. Outros fatores estão ligados ao estilo de vida, como consumo de álcool, obesidade, sedentarismo e exposição à radiação ionizante, e podem acarretar em danos ao genoma e favorecer o desenvolvimento do carcinoma. No entanto, a idade acima dos 50 anos é considerado o fator mais importante para o desenvolvimento do câncer de mama (HARTMANN e LINDOR, 2016; MILNE e ANTONIOU, 2016; BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2018; INCA, 2019).

2.5 FORMAS DE TRATAMENTO DO CÂNCER

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

O tratamento cirúrgico do câncer pode ser aplicado com finalidade curativa ou paliativa. É considerado curativo quando indicado nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos. É um procedimento radical, que compreende a remoção do tumor primário. A cirurgia paliativa, por sua vez, tem a finalidade de reduzir a população de células tumorais ou de controlar sintomas que põem em risco a vida do paciente ou comprometem a qualidade da sua sobrevivência (BRASIL, 2015b).

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

compressão de órgãos; e ablativa, quando se administra a radiação para suprimir a função de um órgão (BRASIL, 2015c).

A quimioterapia refere-se a qualquer tratamento que usa compostos químicos, chamados quimioterápicos, que afetam o funcionamento celular, com o objetivo de destruir as células cancerosas e bloquear o seu desenvolvimento (Fig.9). Entretanto, a maioria dos quimioterápicos atua de forma não específica, lesa tanto células malignas quanto células normais, porém eles acarretam maior dano às células malignas, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares (MURAD e KATZ, 1996; SALMONM e KATZUNG, 1998).

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

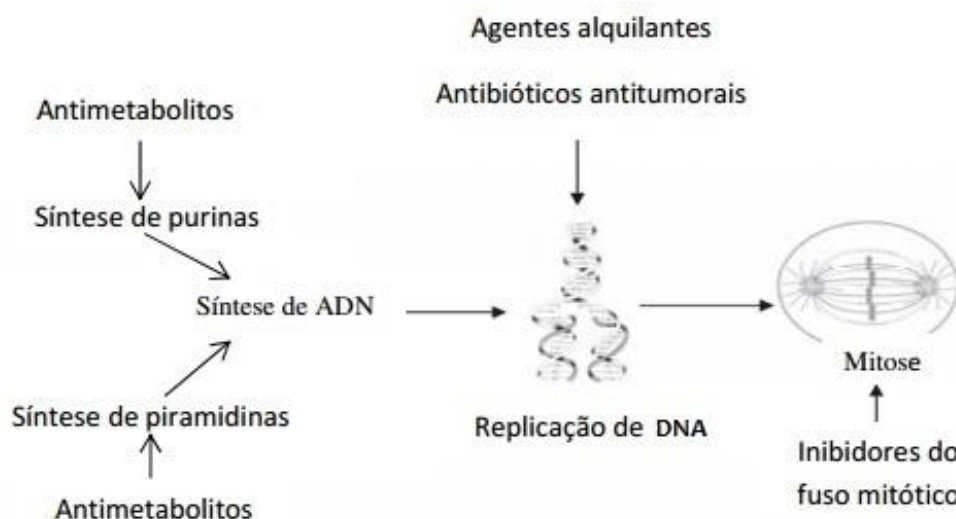


Figura 9. Alvos celulares da quimioterapia. Adaptada de ARGYLE et al., 2008.

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O uso de drogas isoladas (monoquimioterapia) mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia é de eficácia comprovada e tem como objetivos atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, utilizar a ação sinérgica das drogas, diminuir o

desenvolvimento de resistência às drogas e promover maior resposta por dose administrada. A quimioterapia pode ser utilizada em combinação com a cirurgia e a radioterapia (BRASIL, 2015d). A quimioterapia é classificada de acordo com suas finalidades em:

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

Os quimioterápicos atuam no ciclo celular (Fig. 10), interferindo nas diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução (MACHADO, 2000; OLIVEIRA e ALVES, 2002). A integridade do DNA é fundamental para a proliferação celular adequada. Por isso, altos níveis de danos ao DNA são detectados por proteínas envolvidas no *checkpoint* do ciclo celular, cuja ativação induz a parada do ciclo celular para evitar a transmissão de DNA danificado durante a divisão celular (CHEUNG-ONG et al., 2013). Lesões no DNA que ocorrem durante a fase S da replicação estão entre as mais severas de todas. Se o DNA danificado não puder ser devidamente reparado, esse dano pode resultar na morte da célula (SPENCE e JONHSTON, 2001). As células cancerosas geralmente têm DNA desespiralizado, o que reduz a capacidade de sinalizar e reparar algum dano. Assim, elas podem ignorar os pontos de verificação do ciclo celular. Isso permite que as células alcancem altas taxas de proliferação, bem como predispõe à danos no DNA (CHEUNG-ONG et al., 2013). Assim, o objetivo das drogas anticâncer é atingir o DNA, promovendo, assim, o desenvolvimento de numerosos compostos, tais como a cisplatina, doxorubicina, 5-fluorouracil (BANDYOPADHYAY et al., 2010).

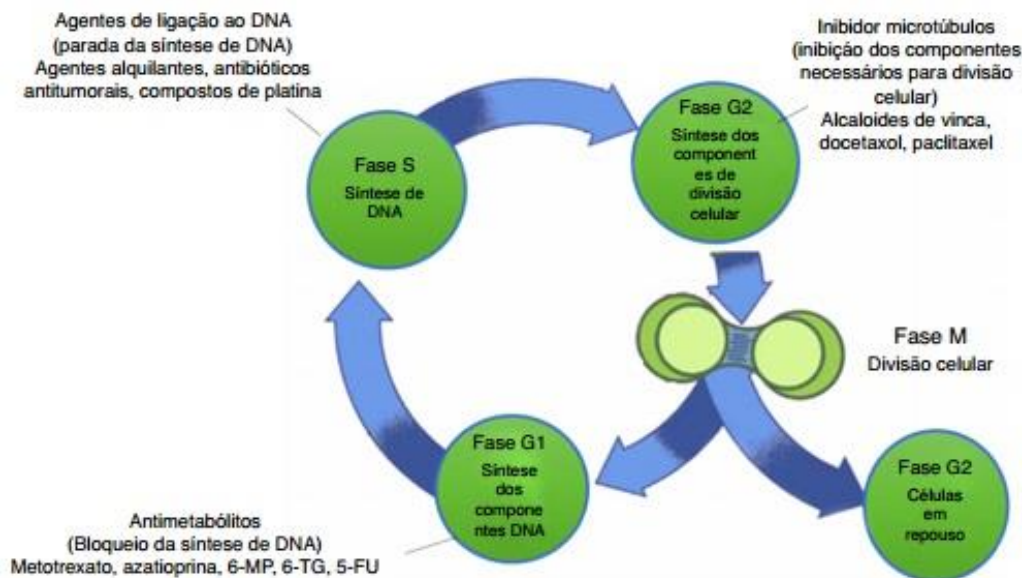


Figura 10. Atividades dos agentes quimioterápicos antineoplásicos em relação à fase do ciclo celular. Adaptada de KABLE, 2014.

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

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

Alquilantes

Os agentes alquilantes são os mais antigos e um dos grupos de fármacos mais utilizados no tratamento antitumoral. São compostos capazes de substituir, em uma molécula, um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Ligam-se covalentemente ao DNA de modo a impedir a desespiralização de sua dupla hélice, interferindo na replicação e/ou transcrição, processos essenciais para a divisão celular. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo

celular de modo inespecífico. Dentre os agentes alquilantes, os quimioterápicos a base de platina são amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, como leucemia, linfomas, tumores de cabeça e pescoço, doença de Hodgkin (LOKICH e ANDERSON, 1998; SIDDIK, 2005; SCHMITT, FREZZA e DOU, 2013; BOWDEN, 2014; BRASIL, 2015d).

A ligação destes compostos de platina ao DNA é considerada o passo crítico para a sua atividade antitumoral, pois provoca a distorção na estrutura desta molécula, incluindo alterações nos processos de compactação da dupla hélice, que impede a replicação e a transcrição, resultando assim no aumento da morte celular (apoptose) e no bloqueio do ciclo celular na fase G2 (ALMEIDA et al., 2006; ANG, MYINT e LIPPARD, 2010). A principal via citotóxica desses compostos caracteriza-se pela formação de ligações cruzadas intercadeias ou pontes intercadeias de DNA, entre duas guaninas adjacentes (GG) ou entre guanina e adenina (AG), tendo como efeito principal a inibição da replicação do DNA (FRANCESCO, RUGGIERO e RICCARDI, 2002, DEEPA, KOLANDAIVEL e SENTHILKUMAR, 2013). O risco de tumores secundários resultantes do tratamento com estes agentes aumenta possivelmente devido aos efeitos mutagênicos nas células normais (WU et al., 2011).

Apesar dos efeitos colaterais observados, os complexos de platina ainda são os fármacos de escolha no tratamento de aproximadamente 50 a 70% dos pacientes tratados com medicamentos antitumorais (HARPER et al., 2010). Apenas quatro drogas de platina estão liberadas pelos órgãos de controle para uso clínico, dentre as quais podemos citar: a cisplatina, a carboplatina, a oxaliplatina ((JUNG e LIPPARD, 2007; WHEATE et al., 2010; ALI et al., 2013) (Fig. 11).

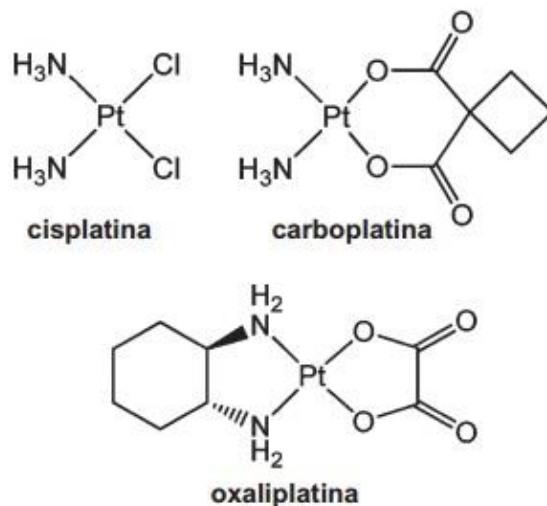


Figura 11. Estrutura química dos derivados de platina: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina. Adaptada de ANG, MYINT e LIPPARD, 2010.

Antibióticos

São um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA e inibam a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. Apesar de apresentarem tal variação, possuem em comum anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos. Uma das principais classes de antibióticos antitumorais são as antraciclinas, quimioterápicos mais bem estudados e utilizados no tratamento de muitas neoplasias malignas (TAKEMURA e FUJIWARA, 2007; BRASIL, 2015d).

Dentre as drogas mais usadas nesse grupo destaca-se a doxorubicina (Fig. 12), que foi isolada pela primeira vez em 1960, em ensaios clínicos a partir da bactéria *Streptomyces peucetis* var. *Caesius* e ainda é um agente fundamental na quimioterapia de primeira linha. É indicada no tratamento de vários tipos de câncer, tais como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma de células transicionais de bexiga urinária, carcinoma de mama, neuroblastoma, tumor de Wilms, carcinoma ovariano, carcinoma tireóideo, carcinoma prostático, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, sarcoma de Ewing (TAKEMURA e FUJIWARA, 2007; CHOW, DONG e DEVESA, 2010; Medline Plus, 2015).

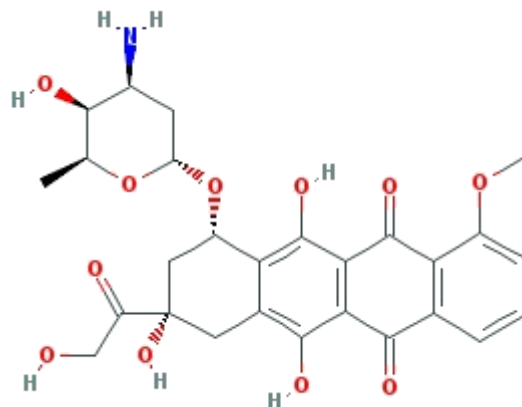


Figura 12. Estrutura química, em 2D, da doxorubicina. Adaptada de: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31703#section=Top>. Acesso em: 15 de Jan. de 2016.

Os mecanismos de ação da doxorubicina podem ocorrer através de: (1) intercalação na cadeia de DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; (2) formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando danos ao DNA ou peroxidação lipídica; (3) ligação e alquilação do DNA; (4) ligação cruzada do DNA; (5) interferência no DNA levando à separação das fitas duplas; (6) efeito direto na membrana; (7) lesões no DNA através da inibição da topoisomerase II; (8) indução da apoptose em resposta à inibição da topoisomerase II (TAKEMURA e FUJIWARA, 2007).

Antimetabólitos

Os antimetabólitos afetam as células inibindo bioquimicamente a síntese do DNA, por atuar na fase S do ciclo celular, impedindo, desta forma, a multiplicação celular. Esta inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas, à produção de ácido timidílico e a outras etapas da síntese de ácidos nucleicos (INCA, 2015). Os principais compostos desses grupos são os análogos de pirimidina (5-fluorouracil (5-FU), capecitabina, floxuridina e gencitabina) e de purina (6-mercaptopurina, 8-azaguanina, fludarabina e cladribina). O 5-fluorouracil é um antimetabólito vastamente utilizado no tratamento de tumores gastrointestinais e de cabeça e pescoço (Fig.13) (SÁ et al., 2009; CHEUNG-ONG K, GIAEVER G e NISLOW, 2013).

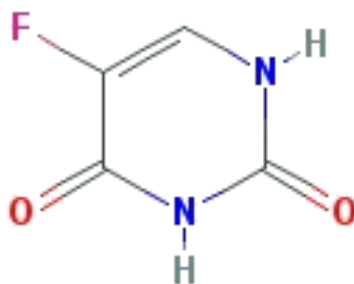


Figura 13. Estrutura química, em 2D, da 5-FU. Adaptada de: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Fluorouracil#section=Top>. Acesso em: 15 de Jan. de 2016.

Taxanos

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

O paclitaxel (derivado da casca das plantas *taxus brevifolia* e *taxus bacatta*) foi a primeira droga da família, descoberto no ano de 1967, contudo devido à necessidade de uma grande quantidade de matéria prima, sua comercialização se tornou inviável. Diante disso, no início da década de 80 foi desenvolvido o docetaxel, um derivado semi-sintético do paclitaxel (Fig. 14). Tanto o paclitaxel como o docetaxel possuem o mesmo mecanismo de ação, ou seja, ambos promovem ligação estável com a tubulina e inibem a despolimerização dos microtúbulos. Seu mecanismo de ação independe da presença de quaisquer cofatores (BRUNO e SANDERIK, 1993; WALL e WANI, 1995; ROWINSKY, 1997; SOUZA, 2004).

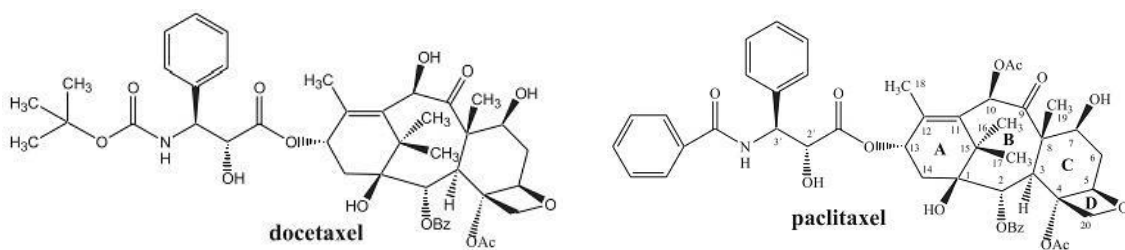


Figura 14. Estrutura química do docetaxel e paclitaxel. Adaptada de SOUZA, 2004.

Os taxanos rapidamente mostraram-se eficazes no tratamento do câncer e permanecem como escolha na abordagem do câncer de pulmão, para esquemas quimioterápicos de resgate e para tratamento de doença metastática ou localmente avançada (FOSSELLA, LEE e BERILLE, 1995). Ainda, estão sendo amplamente utilizados como primeira escolha em diversos outros tipos de tumores malignos como mama, próstata, esôfago, estômago e em tumores de cabeça e pescoço (CORTES e PAZDUR, 1995; KAYE, 1995). Para o câncer de próstata, por exemplo, representam a única classe de quimioterápicos com reconhecida atividade e impacto na sobrevida global dos pacientes (FUJIMOTO et al., 2010; SERPA NETO et al., 2011; OSANTO e VAN POPPEL, 2012). A tabela 1 apresenta as principais classes de antineoplásicos com seus respectivos mecanismos de ação, bem como os principais tipos de cânceres sobre os quais atuam e os principais fármacos utilizados em cada grupo.

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

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

Apesar de a quimioterapia ser o tratamento mais administrado no combate as neoplasias, seu sucesso é limitado, devido à resistência a droga desenvolvida pelas células tumorais e aos efeitos colaterais, produzidos em virtude da citotoxicidade às células normais (KUMAR, KAUR e SILAKARI, 2014).

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

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

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

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

Nesse sentido, torna-se importante a busca por novos compostos com atividade antineoplásica e mais seletivos às células tumorais (DANTAS et al., 2015), bem como, identificar alvos terapêuticos mais específicos para o combate a essa doença. Dentre esses, o estresse oxidativo tem sido reconhecido como um alvo específico do tumor para o desenho de novos agentes anticâncer (CAIRNS, HARRIS e MAK, 2011).

2.6 COMPOSTOS DE SELÊNIO

O selênio (Se), elemento 34 da tabela periódica dos elementos químicos, foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius. É considerado um semimetal com massa atômica de 78,96 g mol⁻¹ e pontos de ebulição e fusão de 685 °C e 217 °C, respectivamente. Na natureza, o Se apresenta amplo estado de oxidação que varia de -2 até +6, proporcionando-lhe um complexo

comportamento químico, o que permite sua combinação com 22 outros elementos (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ e CHARLET, 2009; BOYD, 2011).

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

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

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

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

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

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

Já é bem estabelecido na literatura que o Se é um cofator essencial de várias enzimas, entre elas as deiodinases, tiroxina redutases e glutathione peroxidases (enzimas responsáveis pela conversão de H_2O_2 em H_2O), atua, também, na ativação de outros antioxidantes de baixo peso molecular como, a coenzima Q10 e as vitaminas C e E, importantes para manter a homeostase do organismo. (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2008; RAYMAN, 2012; MEHDI *et al.*, 2013; WEEKLEY, *et al.*, 2013; FERNANDES e GANDIN, 2014).

O Se desempenha um papel fundamental no equilíbrio do estado redox da célula e na remoção de EROs, o que contribui para seu efeito anti-inflamatório. Seu poder antioxidante é possivelmente mediado pelas enzimas glutathione peroxidases (GPx) e sua ação ocorre no espaço extracelular e no citosol, em associação com membranas celulares e especificamente no trato gastrointestinal (FIELD, JOHNSON, SCHLEY, 2002; ARTHUR, MCKENZIE, BECKETT, 2003). Além de sua relevante função antioxidante, os compostos de selênio estão envolvidos em importantes processos em quase todos os tecidos e tipos celulares, inclusive naqueles envolvidos nas respostas imunológicas inatas e adaptativas, na síntese dos hormônios tireoidianos T3 e T4 e na prevenção de doenças crônicas (MAGGINI, *et al.*, 2007; HOFFMANN e BERRY, 2008). Vários outros benefícios têm sido atribuído ao selênio, incluindo a prevenção de desordens metabólicas, remoção de vírus, resistência bacteriana e a infecções parasitárias, bem como destruição de células neoplásicas, atuando, desta forma, na prevenção do câncer (PETRIE, KLASSEN, KAY, 1989; ARTHUR, MCKENZIE, BECKETT, 2003; SHRIMALI, *et al.*, 2008).

Vários mecanismos foram propostos para a atividade anticâncer do selênio, que incluem seus efeitos sobre as defesas antioxidantes (selenoenzimas), morte celular programada, reparo do DNA, detecção de agentes cancerígenos, sistema imunológico, neoangiogênese, regulação da proliferação celular e invasão de células tumorais (WHANGER, 2004; ZENG e COMBS, 2008).

A associação entre selênio e câncer tem sido estudada há mais de 25 anos e as evidências disponíveis confirmam que o selênio (testado isoladamente ou em conjunto com outros agentes antioxidantes) tem efeitos antitumorais, prevenindo angiogênese e metástase em câncer de mama, próstata, colorretal, melanoma, fígado, pulmão, entre outros (CHEN, PRABHU e MASTRO, 2013; VINCETI et al., 2014). Compostos que contêm selênio no seu nível de oxidação +4 (selenito, selol, entre outros) possuem elevada atividade como um sequestrador de radicais livres e, conseqüentemente, como um agente antitumoral (Fig. 15) (RAHDEN-STARON, SUCHOCKI e CZECHOT, 2010; SUCHOCKI et al., 2007).

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

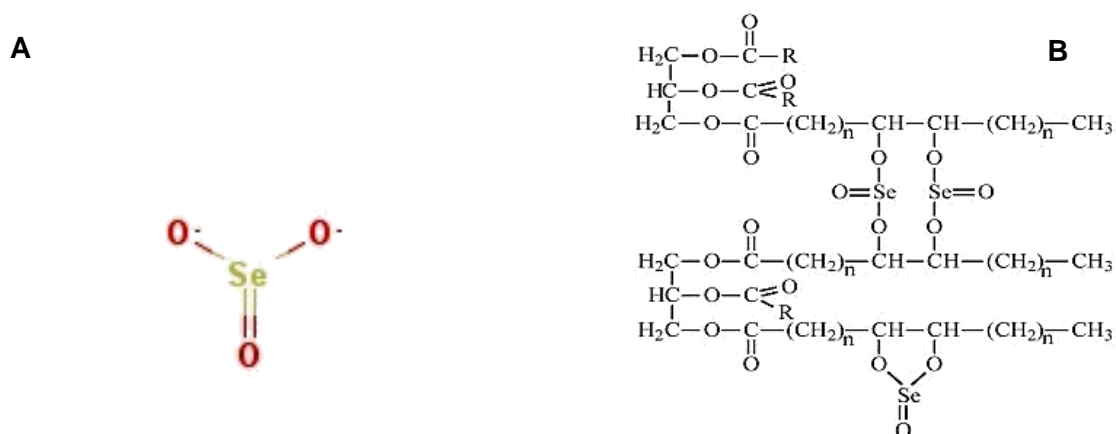


Figura 15. A) Estrutura, química, em 2D, do selenito. Adaptada de: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/273878731#section=2D-Structure>. Acesso em: 15 de Jan. de 2016. B) Estrutura química do selol. Adaptada de SUCHOCKI et al., 2007.

Pinto e colaboradores (2007) descreveram a selenometionina como um agente quimioterápico de baixa toxicidade, capaz de inibir o crescimento de tumores em um modelo de carcinoma colorretal, ao regular negativamente a expressão da proteína Bcl-xL, aumentando a expressão de Bax e Bad e ativando a caspase-9 (YANG et al., 2009).

O ebselen, um organoselênio bastante estudado quanto aos seus efeitos em diversas doenças, apresentou propriedades quimiopreventivas capazes de inibir o crescimento de células humanas de câncer mamário e colón (ENGMAN et al., 1997) e induzir a apoptose na linhagem celular hepática HepG2 (YANG et al., 2000).

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

Ainda não se sabe o exato mecanismo de ação do selênio, mas tem sido proposto que exerça ação antitumorigênica por meio da inibição do crescimento celular pela regulação da p53, danos no DNA e apoptose, sendo este último o

mecanismo mais aceito na literatura (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; GROMADZINSKA et al., 2008).

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

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

2.7 ENSAIOS *IN SILICO*, *IN VITRO*, *IN VIVO* E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O termo *in silico* foi cunhado como analogia às frases familiares *in vitro* e *in vivo*, é uma expressão usada para designar “executado no computador ou por simulação computacional”. Uma grande parte da tecnologia *in silico* foi desenvolvida pela indústria farmacêutica para uso na descoberta de medicamentos (RAUNIO, 2011).

Vários tipos diferentes de métodos *in silico* foram desenvolvidos e aplicados na indústria acadêmica e farmacêutica para modelar o desenvolvimento de testes de hipóteses farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas. Esses métodos incluem bancos de dados, diferentes tipos de métodos quantitativos entre estrutura e atividade (SAR/QSAR), farmacóforos (subunidades moleculares essenciais ao reconhecimento molecular primário que permitem as melhores interações supramoleculares entre um biorreceptor e um fármaco), modelos de homologia e outras abordagens de modelagem molecular, mineração de dados, ferramentas de análise de dados usando computadores,

etc. Ao se explorar, por exemplo, bancos de dados é possível retirar várias informações que auxiliam na compreensão do comportamento de determinado grupo de compostos e é possível gerar modelos computacionais que são utilizados para prever a atividade de moléculas que carecem de dados experimentais, como dados de ensaios *in vitro* e *in vivo* (COOK, 2010; MERLOT, 2010; FOURCHES, 2014; GASTEIGER, 2016).

Os ensaios *in silico*, em especial a quimioinformática, aplica a química computacional a métodos de química teórica para se calcular a estrutura e propriedades de moléculas; a modelagem molecular, que usa gráficos 3D e técnicas de otimização para ajudar a compreender a natureza e ação de compostos químicos e proteínas; e o planejamento de fármacos auxiliado por computador, que diz respeito ao uso de técnicas computacionais para auxiliar na descoberta e planejamento de novas moléculas bioativas (HINCHLIFFE, 2004; YOUNG, 2009; WILLETT, 2011; WILD, 2013).

Apesar de suas aplicações serem ilimitadas, a quimioinformática é uma área mais voltada para a avaliação da segurança de compostos químicos para fins ambientais e no processo de planejamento e desenvolvimento de fármacos. Contribui para a redução do custo do desenvolvimento de novas moléculas; diminuição do número de animais utilizados em ensaios experimentais. Além disso, pode aumentar a eficiência do processo de pesquisa e desenvolvimento, pois diminui resíduos gerados, visto que compostos mais improváveis de terem sucesso são descartados antes de seguirem para ensaios experimentais (CRONIN, 2010; VARNEK e BASKIN, 2011; FOURCHES, 2014).

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

A primeira tentativa de cultivar tecidos ocorreu no século XIX, há mais de 100 anos (BACELAR e SOUSA, 2004; CURI e PERES, 2005). Ao longo dos anos, a biotecnologia para a produção de tecidos, bem como para o cultivo celular *in vitro* apresentou um notável crescimento (COSTA, MIGUEL, ROSA,

2010). Atualmente a técnica de cultivo celular *in vitro* é aplicada para uma grande variedade de finalidades, dentre as quais podemos citar: produção de Imunobiológicos e vacinas para uso humano, desenvolvimento de novos farmacoterápicos, análises de citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas, caracterização de modelos biológicos importantes, testes farmacêuticos, entre outros (TAKATA et al., 1994; UNCHERN, 1999; YOKOMIZO, 2001; MORAIS, AUGUSTO, CASTILHO, 2008; CALDAS, 2010; BRETAS, 2011; LANDRY et al., 2013).

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

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

O desenvolvimento da técnica de cultivo celular *in vitro* aliada ao estabelecimento de linhagens celulares tornou-se essencial para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos na formação de neoplasias, bem como na realização de testes com fármacos, objetivando estabelecer doses ou mesmo, a descoberta de novas substâncias (CALDAS, 2010; ELLIOTT et al., 2011; BARBOSA et al., 2015). As duas etapas envolvidas no processo de

desenvolvimento de fármacos baseiam-se, resumidamente, no estudo de compostos para o tratamento de doenças. A primeira etapa, também chamada de estudos pré-clínicos, tem como objetivo principal a avaliação farmacológica em sistemas *in vitro* e *in vivo* para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades e dos efeitos adversos do fármaco em desenvolvimento. A segunda etapa, ou estudos clínicos, corresponde à pesquisa conduzida em pacientes, ou em voluntários sadios, geralmente, destinada a avaliar um novo tratamento (LOMBARDINO e LOWE, 2004; FERREIRA et al., 2009; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010; LIMA et al., 2003).

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

Em complemento aos ensaios *in vitro*, os ensaios *in vivo* apresentam também inúmeras vantagens, como a complexidade de se trabalhar com órgãos e sistemas, atualmente impossível ou difícil de reproduzir *in vitro*. Com o desenvolvimento contínuo de novos produtos químicos e farmacêuticos, os animais de laboratório tornaram-se ferramentas importantes e bem estabelecidas para a geração de dados toxicológicos *in vivo*. Originalmente, experimentos *in vivo* visavam prever toxicidade sistêmica aguda (TRAKA e MITHEN, 2011; SACHANA e HARGREAVES, 2018).

A principal razão cientificamente justificada para estudos em animais é a identificação de perigos. Foi demonstrado que a concordância de estudos em animais que apoiam o uso humano e caracterizam o potencial de eventos adversos tem grande valor social, particularmente no desenvolvimento de medicamentos. Esses testes têm alto valor científico quando usados para prever possíveis efeitos em humanos, especialmente em questões de segurança, e é exatamente por isso que são necessários. A taxa de concordância relatada em estudos com animais que preveem possíveis implicações em seres humanos é de 71% verdadeira em 90% dos casos examinados (OLSON et al., 2002).

Entre as novas abordagens na descoberta de novas drogas, o zebrafish (*Danio rerio*) é cada vez mais usado como organismo modelo em estudos bioquímicos, fisiológicos e toxicológicos. Muitas vias genéticas envolvidas no desenvolvimento de vertebrados, câncer, diabetes e outras condições são evolutivamente conservadas e muito semelhantes às de mamíferos, incluindo seres humanos. O curto período de desenvolvimento, a relativa facilidade de modificações genéticas e a transparência das larvas tornam o peixe-zebra um organismo modelo atraente para a pesquisa toxicológica (BARRIUSO, NAGARAJU e HURLSTONE, 2015; SCHLEGEL e GUT, 2015).

Os estudos de toxicologia não clínica são utilizados para prever uma janela terapêutica entre exposições eficazes e tóxicas, orientar os limites superiores de dosagem clínica com base nessas exposições e fornecer dados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (MUNOS, 2009). Diante disso, larvas de zebrafish podem ser usadas como modelo para os primeiros ensaios de toxicidade com o objetivo de identificar candidatos a medicamentos tóxicos, permitindo que moléculas mais seguras sejam testadas em modelos de mamíferos. O modelo embrionário e larval oferece ainda um refinamento ao desenho de estudos com animais, porque os embriões são fertilizados externamente e são transparentes desde as primeiras horas/dias de vida. Isso permite a observação não invasiva de toxicidades e talvez a recuperação (CASSAR, 2020).

As características biológicas conservadas entre os vertebrados, a facilidade de criação, a alta taxa de fecundidade, o reduzido tamanho, o rápido desenvolvimento e jovens transparentes são algumas das principais vantagens na utilização do zebrafish para estudos toxicológicos. Embora existam algumas grandes diferenças relacionadas à anatomia e fisiologia associadas a uma espécie aquática, a maioria dos órgãos do zebrafish desempenha as mesmas funções que seus colegas humanos e exibe fisiologia bem conservada (MACRAE e PETERSON, 2015; SANTORIELLO e ZON, 2012). Somando-se a isso, O genoma do peixe foi sequenciado e a comparação com a dos humanos revela que 70% dos genes humanos têm um homólogo em zebrafish e 82% de homologia com os genes humanos associados à doenças. Essa elevada taxa de homologia permite a aplicação estratégica desse modelo experimental na

avaliação da toxicidade de diversos compostos, pois pode-se esperar que os mecanismos moleculares interajam com os xenobióticos de maneiras parecidas (HOWE et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral, *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de compostos derivados do selênio em células leucêmicas e de câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar uma triagem virtual usando descritores Dragon e um algoritmo Random Forest para identificar as moléculas com as maiores probabilidades de atividade biológica;
- ✓ Analisar a atividade citotóxica do composto orgânico de selênio nas linhagens celulares HL-60 (leucemia) e MCF-7 (câncer de mama), linfócitos e monócitos (PBMC);
- ✓ Avaliar a ação do composto na integridade da membrana e potencial de membrana mitocondrial;
- ✓ Estabelecer o provável tipo de morte celular (apoptose ou necrose) associado ao composto;
- ✓ Avaliar a ativação das caspases efetoras 3/7.
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do composto em zebrafish;

4. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; CHAOS, A.; ALDANA, M. et al. Floral morphogenesis: stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. **PLoS One**.3:e3626, 2008.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

ANDERS, C.; CAREY, L. A. Understanding and treating triple-negative breast cancer. **Oncology** (Williston Park), v. 22, n. 11, p. 1233-1239; discussion 1239-40, 1243, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2015. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/campanhas/dia-nacional-de-combate-ao-cancer/2015/estimativa-2016-incidencia-de-cancer-no-brasil>; Acesso em 26 de Jul de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2019.

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*, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

BREEN, K. A.; GRIMWADE, D.; HUNT, B. J. The pathogenesis and management of the coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 156 (1), p. 24-36, 2012.

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

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

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

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

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

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

BARRIUSO, J.; NAGARAJU, R.; HURLSTONE, A. Zebrafish: A new companion for translational research in oncology, **Clin. Cancer Res.**, v. 21, p. 968–975, 2015.

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

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

CASSAR, S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chem. Res. Toxicol.** v. 33, p. 95–118, 2020.

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

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

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

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

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

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

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

CIGUDOSA, J. C.; PARSA, N. Z.; LOUIE, D. C. et al. Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. *Genes, Chromosomes Cancer*. 25:123-133, 1999.

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

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

COOK, D. Improving drug safety using computational biology. *IDrugs* v. 13, p. 85–89, 2010.

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

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

CRONIN, M. T.; Em Recent Advances in QSAR Studies; Puzyn, T., Leszczynski, J., Cronin, M. T., eds.; **Springer: Dordrecht**, cap. 1, 2010.

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

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

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

DAVID, S.; MATHEWS, V. Mechanisms and management of coagulopathy in acute promyelocytic leukemia. *Thromb Res*. 164, p. 82-88, 2018.

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

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

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

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

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

ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A. Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. **J. Pharm. Sci**, v.100, n.1, p.59.74, 2011.

ENGMAN, L.; COTGREAVE, I.; ANGULO, M.; TAYLOR, C. W.; PAINE-MURRIETA, G. D.; POWIS, G. Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. **Anticancer Res**, v. 17, p. 4599–4605, 1997.

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

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

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

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

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

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, New York, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, Apr. 2019

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

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

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

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

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

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

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E. and REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010.

FOURCHES, D. Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine; Gorb, L., Kuz'min, V., Muratov, E., eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, cap. 16, 2014.

FRAGA, M. F.; BALLESTAR, E.; VILLAR-GAREA, A. et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*.37:391-400, 2005.

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

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

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

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

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: achievements and challenges, a personal view. **Molecules**. v. 21, n. 2, 2016.

GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct; 388 (10053):1659-1724. Doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).

GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? **Int J Surg Pathol**, v. 17, n. 4, p. 285-302, 2009.

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

GOELZ, S. E.; VOGELSTEIN, B.; HAMILTON, S. R.; FEINBERG, A. P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **Science**.228: 187-191, 1985.

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

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

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

GRIMWADE, D.; HOWE, K.; LANGABEER, S. et al. Establishing the presence of the t(15, 17) in suspected acute promyelocytic leukemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. **British Journal of Haematology**. 1996;94:557-73.

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

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

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

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

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

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

HARTMANN, L. C.; LINDOR, N. M. The role of risk-reducing surgery in hereditary breast and ovarian cancer. **N Engl J Med.**, v. 374, n. 5, p. 454-468, 2016.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127 – 129, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.

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

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

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

HINCHLIFFE, A. Molecular Modelling for Beginners. **Journal of Chemical Education**, v. 81, n. 11, 2004.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* v. 496 (7446), p. 498–503, 2013.

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

LAND, H. J.; BRADSTOCK, K.; SUPPLE, S. G.; CATALANO, A.; COLLINS, M.; HERTZBERG, M. et al. All-transretinoic acid, idarubicin, and IV arsenic trioxide as initial therapy in acute promyelocytic leukemia (APML4). v. 120, p. 1570-1580, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479–489, 1997.

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

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

LO-COCO, F.; HASAN, S. K. Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. 2014;27(1):3-9.

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

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

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

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

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

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

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

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discovery** v. 14 (10), p. 721–31, 2015.

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

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

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

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

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

MATLASHEWSKI, G. et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. **EMBO J.** 3:3257, 1984.

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

McLEAN, R. C.; LOGUE, J. The individual and combined effects of obesity and type 2 diabetes on cancer predisposition and survival. **Curr Nutr Rep.** 2015;4(1):22-32.

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

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

MILNE, R. L.; ANTONIOU, A. C. Modifiers of breast and ovarian cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Endocr Relat Cancer**, v 23, n.10, p. T69-T84, 2016.

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

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

MERLOT, C. Computational toxicology – a tool for early safety evaluation. **Drug Discov.** Today v. 15, p. 16–22, 2010.

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

MITRI, Z.; CONSTANTINE, T. and O'REGAN, R. The HER2 receptor in breast cancer: pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. **Chemother Res Pract**, 2012: 743193, 2012.

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

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

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

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

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

NAGARAJ, G.; ELLIS, M. J.; MA, C. X. The natural history of hormone receptor-positive breast cancer: attempting to decipher an intriguing concept. **Oncology (Williston Park)**, v. 26, n. 8, p. 696-700, 2012.

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

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

MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nat. Rev. Drug Discovery** v. 8 (12), p. 959–968, 2009.

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

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

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

OLSON, H. et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 32, n. 1, p. 56-67, 2000.

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

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

PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, v. 27, n. 8, p. 1160-1167, 2009.

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

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

POLLOCK, J. National Cancer Institute in 2006; The National Women's Health Information Centre website in 2006. National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program, Centers for Disease Control and Prevention in 2006.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 28:1057-1068, 2010.

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

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

RAUNIO, H. In silico toxicology – non-testing methods. **Frontiers Pharmacology**, v. 2, n. 33, 2011.

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

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

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

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

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

ROBBINS e COTRAN. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. Ed. Elsevier, 7ª edição, 2005.

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

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

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

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

RYBAROVA, S. et al. Expression of MDR proteins in breast cancer and its correlation with some clinical and pathological parameters. *Neoplasma*, v. 53, n. 2, p. 128-135, 2006.

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

SACHANA, M.; HARGREAVES, A. J. Toxicological Testing: In Vivo and In Vitro Models. **Veterinary Toxicology**, p. 145–161, 2018.

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

SANTORIELLO, C.; ZON, L. I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J. Clin. Invest.* v. 122 (7), p. 2337–2343, 2012.

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

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

SCHLEGEL, S.; GUT, P. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology, **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, p. 2249–2260, 2015.

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

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

SETO, M.; HONMA, K.; NAKAGAWA, M. Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Sci.*101:573-578, 2010.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 31: 27-36, 2010.

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

SHTIVELMAN, E.; LIFSHITZ, B.; GALE, R. P.; CANAANI, E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 315:550-554, 1985.

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

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. **Cancer statistics**. 2016, *CA Cancer J Clin*. 2016; 66: 7 – 30.

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

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

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n.14, p. 8418-8423, 2003.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.

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

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

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (ed.). World cancer report 2014. **Lyon: IARC Press**, 2014. 1010 p

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

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

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

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

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

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

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

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

TANG, Y. et al. Classification, treatment strategy and associated drug resistance in breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 5, p. 335-343, 2016.

TRAKA, M. H.; MITHEN, F. R. Plant science and human nutrition: challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. **Plant Science and Human Nutrition**, 23, p. 2483 – 2497, 2011.

THÉ, H.; PANDOLFI, P. P.; CHEN, Z. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein Targeted Cure. **Cancer Cell**. 2017;32:552-60.

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

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

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

VARNEK, A.; BASKIN, I. I. Chemoinformatics as a theoretical chemistry discipline. *Mol. Inform.*, v. 30, p. 20-32, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **Brit J Nutr** v. 91, p. 11–28, 2004.

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

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

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

WILD, D. *Introducing cheminformatics: an intensive self-guided study*, 2nd ed., McGraw-Hill Open Publishing, 2013.

WILLETT, P. *Chemoinformatics: a history*. **Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci**, 1, p. 46-58, 2011;

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

World Health Organization. *Global Health Observatory*. Geneva: World Health Organization; 2018. who.int/gho/database/en/. Accessed June 22, 2019.

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

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

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

YANG, C. F.; SHEN, H. M.; ONG, C. N. Intracellular thiol depletion causes mitochondrial permeability transition in ebselen-induced apoptosis. **Arch Biochem Biophys**, v. 380, p. 319–330, 2000.

YANG, Y. et al. The anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice. **Oncol Res**, v. 18, p. 1–8, 2009.

YOUNG, D. C. Computational drug design: A guide for computational and medicinal chemists, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, v. 14, 2009.

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

ZENG, H.; COMBS, G. F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **J Nutr Biochem**, v.19, p. 1–7, 2008.

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

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




ARTIGO CIENTÍFICO I

**Virtual screening and assessment of anticancer
potential of selenium-based compounds against HL-60
and MCF7 cells**

(Artigo publicado no periódico Future Medicinal Chemistry)

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Virtual screening and assessment of anticancer potential of selenium-based compounds against HL-60 and MCF7 cells

Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz¹, José Alixandre de Sousa Luis², Diego de Sousa Dantas³, Lúcia Cristina Pereira Arruda⁴, Ellen Cordeiro Bento da Silva¹, João Manoel de Sousa Silva², Helivaldo Diogenes da Silva Souza⁵ , Renata Priscila Costa Barros⁶, Luciana Amaral de Mascena Costa¹, Petrónio Figueiras de Athayde Filho⁵, Luciana Scotti⁶ , Marcus Tullius Scotti^{*,6}  & Manoel Adrião Gomes Filho¹

¹Department of Animal Morphology & Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmaõs, Zip code: 52171900, Recife – Pernambuco, Brazil

²Education & Health Center, Federal University of Campina Grande, Cuite – Paraíba 58175000, Brazil

³Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – Pernambuco 50670901, Brazil

⁴Department of Veterinary, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmaõs, Recife – Pernambuco 52171900, Brazil

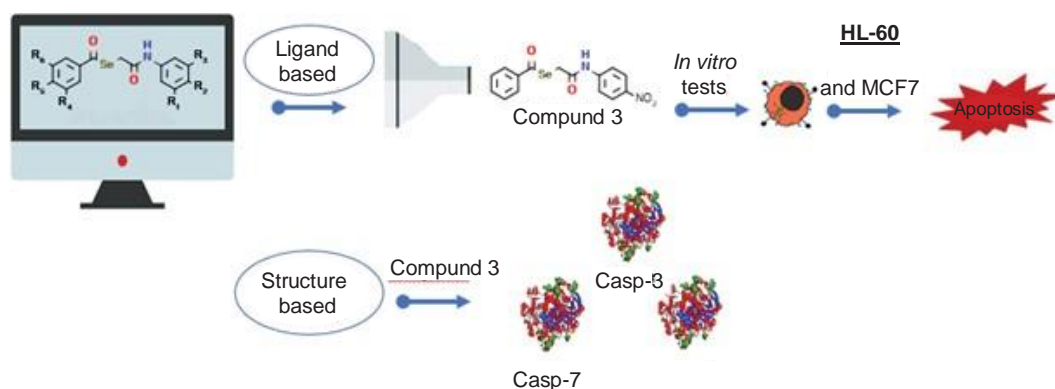
⁵Research Laboratory in Biofuels & Organic Synthesis, Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, Campus I – Lot. Cidade Universitária, João Pessoa – Paraíba 58051900, Brazil

⁶Postgraduate Program in Natural & Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, Campus I – Lot. Cidade Universitária, João Pessoa – Paraíba 58051900, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 83 99869 0415; mtscotti@gmail.com

Aim: Selenium-based compounds have antitumor potential. We used a ligand-based virtual screening analysis to identify selenoglycolicamides with potential antitumor activity. **Results & Conclusion:** Compounds **3**, **6**, **7** and **8** were selected for *in vitro* cytotoxicity tests against various cell lines, according to spectrophotometry results. Compound **3** presented the best cytotoxicity results against a promyelocytic leukemia line (HL-60) and was able to induce cell death at a frequency similar to that observed for doxorubicin. The docking study showed that compound **3** has good interaction energies with the targets caspase-3, 7 and 8, which are components of the apoptotic pathway. These results suggested that selenium has significant pharmacological potential for the selective targeting of tumor cells, inducing molecular and cellular events that culminate in tumor cell death.

Graphical abstract:



First draft submitted: 13 April 2020; Accepted for publication: 9 September 2020; Published online: 27 November 2020

Keywords: anticancer activity • HL-60 cells • MCF7 cells • organoselenium • selenoglycolicamides • virtual screening

newlands
press

Cancer is the second-leading cause of death, worldwide, accounting for 13% of total deaths, which represents approximately eight million deaths annually. Recent studies have shown that 13 million new cases of cancer are diagnosed each year and this number has been estimated to reach 17 million by the end of this decade [1–3]. For the year 2030, some reports have estimated 27 million cases will be diagnosed, associated with 17 million deaths and a total of 75 million people will be living with cancer. This increase is most likely to affect the populations of low- and middle-income countries [4].

Cancer treatments primarily aim to cure the disease, prolong survival and improve the quality of life of affected individuals [5,6]. Among the various available cancer treatments, chemotherapy is the most common and up to 70% of tumors will require chemotherapy at some point during the disease course, either alone or in combination with other types of therapy [7,8]. Although chemotherapy is the most common cancer treatment, its success is limited by the development of drug resistance among tumor cells and the incidence of side effects, due to cytotoxic effects against healthy cells [9].

Studies have shown that selenium, either alone or in combination with other antioxidants, may have anti-tumor effects, preventing angiogenesis and metastasis in breast, prostate, colorectal, melanoma, liver and lung cancers [10,11]. Selenium increases the resistance of noncarcinogenic cells against stress and acts as a pro-oxidant in neoplastic cells, making them more sensitive to selenium toxicity than normal cells, decreasing their growth and activity [12,13]. Inorganic compounds that contain selenium in its +4 oxidation form (selenite) display high free radical scavenger activity, consequently, may function as antitumor agents [14]. Organic selenium-containing compounds are better tolerated, but differ in their anticancer activities, depending on dosage and their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties [2]. Due to the growing need to develop new and more effective anticancer compounds, a pharmacological therapeutic window may exist for the use of selenium-derived compounds during cancer treatment [12,13].

In recent decades, several pharmaceutical industries and research groups have developed drugs using computational tools in a process called computer-aided drug design. Several useful methods exist for the identification of new bioactive chemotypes, including multiple cytotoxicity cell line tests and specific functional assay, which can be performed for large chemical collections that include millions of commercial compounds during the search for novel drugs [15,16]. As this methodology starts from libraries with thousands of compounds, a virtual screening is initially carried out using Dragon descriptors and a Random Forest (RF) algorithm (a machine learning method) so that the most promising ligands can be selected. Thus, this method aims to reduce time and expenses in the drug design process [17–19]. So, this study aimed to perform a virtual screening, using a series of 15 selenoglycolicamides, to identify those molecules with the highest activity probabilities, to synthesize the most promising molecules, and to evaluate the antitumor potential, *in vitro*, of the selected compounds against acute promyelocytic leukemia and human breast adenocarcinoma cell lines, in addition to establishing the cytotoxicity of these compounds against healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Materials & methods

Chemistry

In the computational study we used, compounds 2–16, which were derived from selenium, and of these, we resynthesized four compounds (3, 6–8), according to the methodology described by Luis et al. (Figure 1) [20].

General procedure for the preparation of selenoglycolicamides

The synthesis was initiated with the preparation of an aqueous solution (6 ml) of sodium borohydride (0.0139 mol) which was added to a suspension of selenium (0.0063 mol) in 6 ml of water contained in a 50 ml flask. The reaction was exothermic, and the release of hydrogen gas was observed. The next step was the addition, slowly, of acryloyl chloride (0.0063 mol) at a temperature of 30°C, the mixture was stirred for 60 min at room temperature when 2-chloro-*N*-arylacetamides (0.0063 mol) was added, in small portions. Within a few minutes, solid precipitates were formed. The mixture was agitated for an additional 2 h, at room temperature. Then, the reaction mixture was extracted with dichloromethane (3 × 25 ml). The organic phase was filtered on a porcelain plate containing a silica gel and then concentrated under reduced pressure, providing the final products, which were recrystallized in ethanol [20].

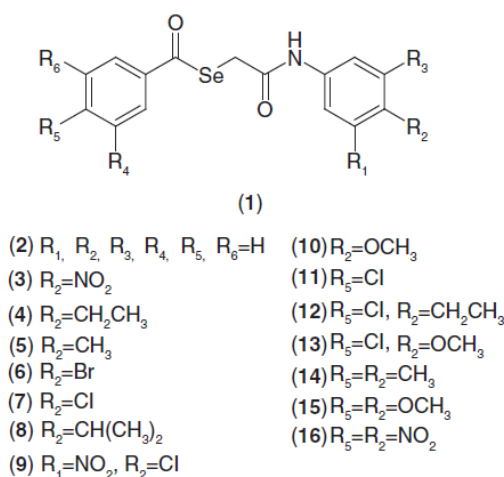


Figure 1. Compounds in the selenoglycolicamides series.

Dataset

Data collection & curation

The experimental data were obtained from the ChEMBL database (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). The dataset included a wide variety of cytotoxicity information for several organic compounds, which were tested against HL-60 (acute promyelocytic leukemia) and MCF7 (human breast adenocarcinoma) cell lines. The dataset for the HL-60 cell line included 38,881 chemical records, whereas the MCF7 dataset included 33,660 chemical records with defined chemical structures. After curation, the final HL-60 and MCF7 datasets resulted in 36,827 and 30,326 organic chemicals, respectively, with previously determined half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values. All experimental cytotoxicity values were expressed as molar units (mol l⁻¹), and then, the logarithmically transformed data (pIC₅₀) were used.

The compounds were classified according to the pIC₅₀ values, resulting in the classification of 18,098 active compounds (pIC₅₀ ≥ 4.5) and 5229 inactive compounds (pIC₅₀ ≤ 4.5) for HL-60 cells and 14,662 active compounds (pIC₅₀ ≥ 4.5) and 15,664 inactive compounds (pIC₅₀ ≤ 4.5) for MCF7 cells. Our databank includes the compounds 2–16. Our research group has been developing a workflow that was previously described [21–23]. For the selection of our data sets, chemical compounds with undefined or missing structures were not considered for modeling. In this process, some specific chemotypes were normalized, such as nitro and aromatic groups by using ChemAxon Standardizer (JChem, 16.1.11.0, 2016, ChemAxon, Budapest, Hungary, <http://www.chemaxon.com>). Inorganic salts, organometallic compounds and mixtures were also removed. HiT quantitative structure–activity relationships (QSAR) [24] was used to remove duplicates and JChem to generate 3D structures.

Model development & validation

In the present work, Dragon v.7.04 software [19] was used to calculate molecular descriptors in order to extract chemical information from different representations of molecules. These descriptors are numerical variables used to quantify the structural information of a chemical compound [21].

For the construction of our model, all descriptors calculated by Dragon v.7.04 were imported into the KNIME 3.14.1 software (KNIME 3.14.1 the Konstanz Information Miner Copyright, 2003–2019), (www.knime.org) [25]. Then, the data were stratified into two groups, a training group with 80% of the compounds and another test group with 20% with maintenance of the same proportion of active and inactive compounds in both groups. The data were subjected to a process of cross-validation by using ten stratified groups and selected at random, but with the maintenance of distributions and variables of activity classes. Descriptors were selected, and a model was generated, using the training set and the RF algorithm [25], using the WEKA nodes [26]. The parameters selected for the RF algorithm included the following settings: number of trees to build = 1900; seed for random number generator = 1,909,501,934,341. The internal and external performances of the selected models were analyzed for sensitivity (true positive rate or active rate), specificity (true negative rate or inactive rate) and accuracy (overall predictability). In addition, the sensitivity and specificity of the receiver operating characteristic (ROC) curve were found to describe the true performance with increased clarity and accuracy. The plotted ROC curve shows the true positive (active) rate, either versus the false positive rate or versus sensitivity (1: specificity). In a two-class classification, when the variable being investigated cannot be distinguished between the two groups (i.e., when no difference exists between the two distributions), the area under the ROC curve equals 0.5 and coincides with the diagonal. When there is a perfect separation between the values for two groups (i.e., no overlapping distributions), the area under the ROC curve equals 1, reaching the upper left corner of the plot [27].

Docking

The target proteins, caspase 3 (5I9B) [28], caspase 8 (1QDU) [29] and caspase 7 (1F1J) [30] were downloaded from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). These three proteins are classified as hydrolases. The root-mean-square deviation was calculated to analyze the distance between the ligand and the protein fitting site at the time of redocking and when the value is between 0–2 ° Å, the study is considered valid [31].

Compound 3 was subjected to molecular coupling, using Molegro Virtual Docker v. 6.0.1. All water molecules were excluded from the structures of each enzyme. The enzymes and compounds were prepared using the predefined parameters. For the coupling procedure (ligand-enzyme), a grid with a 15-° Å radius and 0.30 resolution was used, covering the binding site, as defined by Blanchard et al. [29]. A model was generated to estimate the fit between the ligand and the enzyme, based on the expected characteristics, using the Moldock scoring (GRID) and search algorithms [32]. To visualize the interactions between the molecule and the active sites of the proteins, Discovery Studio Visualizer 2018 software was used.

Biological activity

Cell culture

HL-60 (promyelocytic leukemia) and MCF-7 (breast adenocarcinoma) cell lines were used in this study. The cells were maintained in RPMI 1640 (HIMEDIA™, Mumbai, India) medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma–Aldrich®, São Paulo, Brazil). The cells were incubated in a humidified incubator, with 5% CO₂ and 95% air, at 37 °C.

Antiproliferative activity

Cellular cytotoxicity was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay (Sigma–Aldrich Co., MO, USA). Briefly, HL-60, MCF7 and PBMCs cells were seeded in 96-well plates, at a concentration of 7×10^4 cells per well and exposed to eight increasing concentrations (1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 17.0, 34.0, 69.0 and 138.0 µM) of compounds 3 and 6–8. Doxorubicin treatment (1.34 µM) was used as a positive control, whereas the negative control received an equal volume of culture medium. After 24 h of incubation at 37 °C, in a 5% atmosphere of CO₂, 20 µl of MTT (5mg/ml) was added to the wells corresponding to treatments with compounds 3 and 6–8 and the positive control. After 3 h of incubation at 37 °C, the plate was centrifuged, the supernatant was discarded and 100 µl of DMSO was added. Then, the plate was shaken for 5 min, to completely solubilize the formazan crystals and the absorbance was evaluated using a plate spectrophotometer (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, MA, USA), at a 570-nm wavelength [33]. The assay was performed in triplicate and the concentration that inhibits 50% of cell growth (IC₅₀) was calculated using GraphPad Prism software, version 5.0.

Researching new chemotherapeutic agents, an important factor to be analyzed is the question of selectivity, that is, the compound under study must have greater cytotoxicity for a tumor cell than for a healthy cell. Then, to evaluate this parameter, the MTT cytotoxicity assay was performed against cancer cell lines and PBMCs and the results were compared. PBMCs were obtained from human peripheral blood, in vacuum tubes containing an anticoagulant (EDTA). Cell isolation was performed using the discontinuous Percoll gradient technique, as described by Mousinho [34]. All procedures followed the ethical protocols provided by the Research Guidelines (Brazilian Law 466/12, National Health Council) under authorization number 3,741,386. The data are presented as IC₅₀ values, with 95% CI, obtained by nonlinear regression.

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

For the following methods, HL-60 cells were plated at a concentration of 5×10^5 cells per well and incubated for 24 h with compound 3, at concentrations of 8.0; 17.0, and 34.0 µM, based on the established IC₅₀ value. Doxorubicin (1.34 µM) was used as a positive control, whereas the culture medium alone was added to the negative control. Then, the cells were collected, centrifuged at 2000 r.p.m. for 5 min and the pellets were resuspended in 100 µl phosphate-buffered saline (PBS), followed by the addition of 0.5 µl of 2'-7'-dichlorofluorescein (0.048 mg/ml) and 0.5 µl IP (0.17 mg/ml), which were incubated for 10 min at 37 °C. Samples were analyzed using a flow cytometer (ImageStreamX Mark II, amnis®). Two independent experiments were performed in duplicate.

Morphological analysis by differential staining with acridine orange/ethidium bromide

After exposure to compound 3, at concentrations of 8.0, 17.0 and 34.0 µM, HL-60 cells were collected and centrifuged at 2000 r.p.m. for 5 min. The pellets were resuspended in 25 µl PBS, followed by the addition of 2 µl aqueous acridine orange/ethidium bromide (100 µg/ml) solution and incubation for 5 min [35]. A 5 µl aliquot was placed on a slide, covered with a coverslip and examined by a fluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany; 400×), using a 485–520 nm filter. Three hundred events were quantified for each sample, which were classified as either viable

cells, apoptotic cells or necrotic cells. Three independent experiments were performed in duplicate.

Analysis of mitochondrial membrane potential

After exposure to compound 3, at concentrations of 8.0, 17.0 and 34.0 μM , HL-60 cells were collected and centrifuged at 2000 r.p.m. for 5 min. The pellets were resuspended in 25 μl PBS, followed by the addition of 5 μl of JC-1 (0.15 mM in DMSO) and incubation for 10 min at 37°C. A 5 μl aliquot was placed on a slide, covered with a coverslip and examined by a fluorescence microscope (Carl Zeiss, 400 \times), in a 485–520 nm filter [36]. Three hundred cell events were quantified for each sample, which were classified as depolarized (stained green) and polarized (stained orange). Two independent experiments were performed in duplicate.

Quantification of caspases 3 & 7 by flow cytometry

The quantification of caspases 3 and 7 was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 5×10^6 cells/ml HL-60 cells were plated in 6-well plates and incubated for 24 h with compound at concentrations of 8.0, 17.0 and 34.0 μM , according to the calculated IC₅₀ value, doxorubicin (1.34 μM) as a positive control and an equal volume of culture medium as the negative control. After incubation, the contents of each well were transferred to 1.5 ml polypropylene microtubes and 1 μl CellEvent® caspase-3 and -7 Green Detection Reagent (Life Technologies, CA, USA) was added and incubated for 25 min at 37°C. Then, 1 μl SYTOX® AADvanced™ (Life Technologies) was added and incubated for 5 min at 37°C. Samples were analyzed using a flow cytometer (ImageStreamX Mark II, Amnis, CA, USA). Two independent experiments were performed.

Statistical analysis

All experiments were performed two or three-times for each group. All data showed symmetrical distributions, and the results are expressed as the mean \pm the standard error of the mean. Statistical analyses were performed by analysis of variance, followed by the Student–Newman–Keuls test and Tukey's test (caspases 3 and 7). Cytotoxicity is expressed as the mean IC₅₀ value and the IC₅₀ value was calculated by logistic regression, using GraphPad Prism® software, version 5.0 Demo. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results & discussion

Structural characterization of the compounds 3, 6–8

The NMR data obtained for the resynthesized compounds were compared with those obtained previously by our group [20]. The data obtained are described below.

N-(4-Nitrophenyl)benzoselenoglycolicamide (3)

Yield: 76%. White solid with m.p. 193°C. ¹H NMR – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.80 (s, 1H, NH); 8.18 (d, J = 9.2 Hz, 2H, H-10 and H-12); 7.96 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H-3 and H-3'); 7.76–7.62 (m, 3H, H-5 to H-9 and H-13); 7.55 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-4 and H-4'); 3.82 (s, 1H, H-6). ¹³C NMR – (50 MHz, CDCl₃, δ): 197.6 (C-1); 137.7 (C-2); 129.3 (C-3 and C-3'); 127.8 (C-4 and C-4'); 135.3 (C-5); 28.1 (C-6); 168.7 (C-7); 143.9 (C-8); 119.3 (C-9 and C-13); 125.4 (C-10 and C-12); 143.6 (C-11).

N-(4-Bromophenyl)benzoselenoglycolicamide (6)

Yield: 80%. White solid with m.p. 166–167°C. ¹H NMR – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.44 (s, 1H, NH); 7.94 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-3 and H-3'); 7.69 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-5); 7.53 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-4 and H-4'); 7.49 (s, 4H, H-9, H-10, H-12 and H-13); 3.73 (s, 2H, H-6). ¹³C NMR – (50 MHz, CDCl₃, δ): 197.1 (C-1); 137.3 (C-2); 129.3 (C-3 and C-3'); 127.8 (C-4 and C-4'); 134.7 (C-5); 28.3 (C-6); 168.5 (C-7); 137.8 (C-8); 121.5 (C-9 and C-13); 132.1 (C-10 and C-12); 117.4 (C-11).

Table 1. Summary of the training, internal cross-validation, and test results and the corresponding matched results, which were obtained using the Random Forest algorithm on the total set of 36,827 compounds tested against HL-60 cells (29,461 in the training set and 7366 in the test set).

	Validation			Test		
	Samples (n)	Match (n)	Match (%)	Samples (n)	Match (n)	Match (%)
Active	14,478	10,645	73.53	3620	2655	73.34
Inactive	14,983	10,894	72.71	3746	2772	73.99
Overall	29,461	21,539	73.11	7366	5427	73.68

Table 2. Summary of the training, internal cross-validation, and test results and the corresponding matched results, which were obtained using the Random Forest algorithm on the total set of 30,326 compounds tested against MCF7 cells (24,260 in the training set and 6066 in the test set).

	Validation			Test		
	Samples (n)	Match (n)	Match (%)	Samples (n)	Match (n)	Match (%)
Active	11,729	8653	73.77	2933	2194	74.80
Inactive	12,531	9488	75.72	3133	2428	77.50
Overall	24,260	18,141	74.78	6066	4622	76.20

N-(4-Chlorophenyl)benzoselenoglycolicamide (7)

Yield: 76%. White solid with m.p. 152°C. ¹H NMR – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.31 (s, 1H, NH); 7.98 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-3 and H-3'); 7.69 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-5); 7.54–7.52 (m, 4H, H-4, H-4', H-9 and H-13); 7.29 (d, 2H, J = 8.5 Hz, H-10 and H-12); 3.79 (s, 2H, H-6). ¹³C NMR – (50 MHz, CDCl₃, δ): 196.7 (C-1); 137.8 (C-2); 129.3 (C-3 and C-3'); 129.1 (C-4 and C-4'); 134.7 (C-5); 28.2 (C-6); 168.4 (C-7); 136.8 (C-8); 121.1 (C-9 and C-13); 127.7 (C-10 and C-12); 129.3 (C-11).

N-(4-Isopropylphenyl)benzoselenoglycolicamide (8)

Yield: 75%. White solid with m.p. 111°C. ¹H NMR – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.29 (s, 1H, NH); 7.82 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-3 and H-3'); 7.53 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-5); 7.44 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-4 and H-4'); 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-9 and H-13); 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-10 and H-12); 3.79 (s, 2H, H-6); 2.87 (sep, 1H, CH[CH₃]₂); 1.24 (d, 6H, CH[CH₃]₂). ¹³C NMR – (50 MHz, CDCl₃, δ): 196.8 (C-1); 138.2 (C-2); 129.2 (C-3 and C-3'); 127.7 (C-4 and C-4'); 134.9 (C-5); 28.3 (C-6); 168.2 (C-7); 135.9 (C-8); 120.2 (C-9 and C-13); 126.6 (C-10 and C-12); 145.3 (C-11); 33.9 (CH[CH₃]₂); 24.3 (CH[CH₃]₂).

Computational study

The study was developed using a computer with an i7 processor, running at 2.6 GHz and equipped with 8 GB of RAM. With this equipment and the aid of the Dragon v.7.04 software, all 1,024 descriptors were calculated quickly (~60 min), so that it allowed to classify the compounds as active (A) or inactive and then used as input data, together with dependent variables (binary classification) for the KNIME program (v. 3.14.1), where the RF model was generated.

Table 1 summarizes the statistical indices of the RF model for the training, cross-validation and test sets that were generated for each compound tested against HL-60 cells. Table 2 shows the same information for compounds tested against MCF7 cells. For the training set, the learning machine model returned the same hit rates for inactive and active compounds, which were 100%. For HL-60 cells, the specificities (true-positive rates [compounds predicted to be active]) for the cross-validation and test sets were determined to be 73.53 and 73.34%, respectively, and the sensitivities (true-negative rates [compounds predicted to be inactive]) were 72.71 and 73.99%, respectively (Table 1). In the model for MCF7 cells, the specificities for the cross-validation and test sets were 73.77 and 74.80%, respectively, and the sensitivities were 75.72 and 77.50%, respectively (Table 2).

For both HL-60 and MCF7 cell RF models, ROC plots were generated for the cross-validation and test sets, which plotted the true-positive (active) rates against the false-positive rates, resulting in area under the curve values

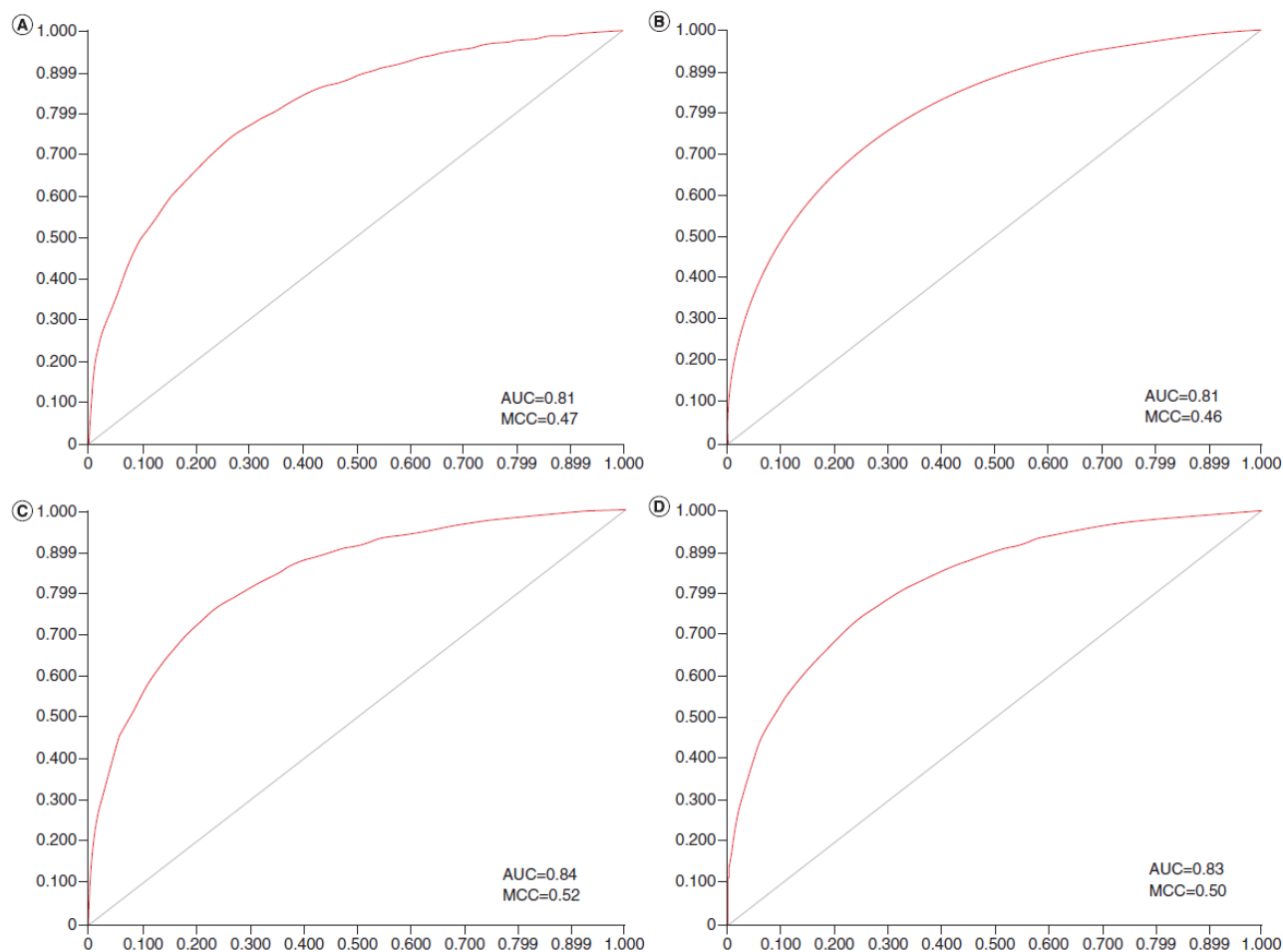


Figure 2. Receiver operating characteristic plots generated by the selected Random Forest models for the cross-validations and test sets and the area under the curve and Matthews Correlation Coefficient values. (A) Cross-validation set for HL-60, (B) Test set for HL-60, (C) Cross-validation set for MCF7, (D) Test set for MCF7.

of approximately 0.81 (Figure 2A) and 0.81 (Figure 2B) for the HL-60 cross-validation and test sets, respectively and values of 0.84 (Figure 2C) and 0.83 (Figure 2D), respectively, for the MCF7 cells, which were all significantly higher than 0.5 (Figure 2).

The Matthews Correlation Coefficient (MCC) values for the cross-validation and test sets were 0.47 (Figure 2A) and 0.46 (Figure 2B), respectively, for the HL-60 RF model and 0.52 (Figure 2C) and 0.50 (Figure 2D), respectively, for the MCF7 RF model. Because an MCC value of 1 represents a perfect prediction, whereas 0 represents a random prediction and -1 represents total disagreement between the prediction and the observation, the RF models for both cells showed significant MCC values.

Table 3 shows the activity predictions, with respective probabilities (p), which were calculated using the RF model for compounds 2–16 against HL-60 and MCF7 cells. For values of $p \geq 0.5$, the molecule was considered to be active (A), whereas for $p < 0.5$, the molecule was considered to be inactive (I).

Docking study

Our *in vitro* results suggested that compound 3 caused cytotoxic effects, due to the activation of the apoptotic pathway. Therefore, we conducted a docking study examining the binding between compound 3 and some caspases, which are a group of proteases that are capable of cleaving other proteins. Two major groups of caspases have been identified: the initiators (such as caspases 8 and 9), which cleave inactive proforms of effector caspases, and the

Table 3. Prediction of activity, with their respective probabilities (p), calculated using the RF model for compounds 2–16 against HL-60 and MCF7 cells.

Compound	HL-60		MCF7	
	Activity	p-value	Activity	p-value
2	I	0.47	I	0.45
3	A	0.67	A	0.55
4	I	0.42	I	0.48
5	I	0.45	I	0.46
6	A	0.59	A	0.62
7	A	0.56	A	0.54
8	A	0.54	A	0.54
9	I	0.47	A	0.53
10	I	0.46	A	0.51
11	I	0.45	A	0.50
12	I	0.48	A	0.53
13	I	0.45	A	0.56
14	I	0.46	I	0.46
15	A	0.51	I	0.49
16	I	0.49	I	0.48

Table 4. Activation sites for caspases 3 and 8.

	Caspase-3	Caspase-8
S ₁	Arg 64 Arg 207 Gln 161 Ser 205 Ser 213	Arg 179 Arg 341 Gln 283 Ser 339 Thr 347
S ₂	Trp 206 Leu 168 Tyr 204	Tyr 340 Tyr 290 Val 338
S ₃ –S ₄	Trp 206 Arg 207 Ser 209 Trp 214 Asn 208	Tyr 340 Arg 341 Pro 343 Trp 348 Asn 342

Adapted from [29].

Table 5. Interaction energies between compound 3 and caspases 3 and 8, at each active site.

	Compound 3	
	Caspase-3 (kcal/mol)	Caspase-8 (kcal/mol)
S ₁	-115.22	-116.22
S ₂	-114.76	-107.41
S ₃ –S ₄	-108.97	-112.85

effectors (such as caspases 3 and 7), which cleave other protein substrates, triggering the apoptotic process. For this docking study, we used caspases 3, 7 and 8.

The active sites of caspase 3 and caspase 8 were defined through a bibliographic review, using information from Blanchard et al. [29] and these data are summarized in Table 4.

Molecular docking was performed for each of the active sites in caspases 3 and 8, to identify which site compound 3 interacts with best and, consequently, in which stage of the apoptosis cascade compound 3 exerts its effects. Table 5 shows the interaction energies between compound 3 for each of the active sites identified in the two analyzed caspases.

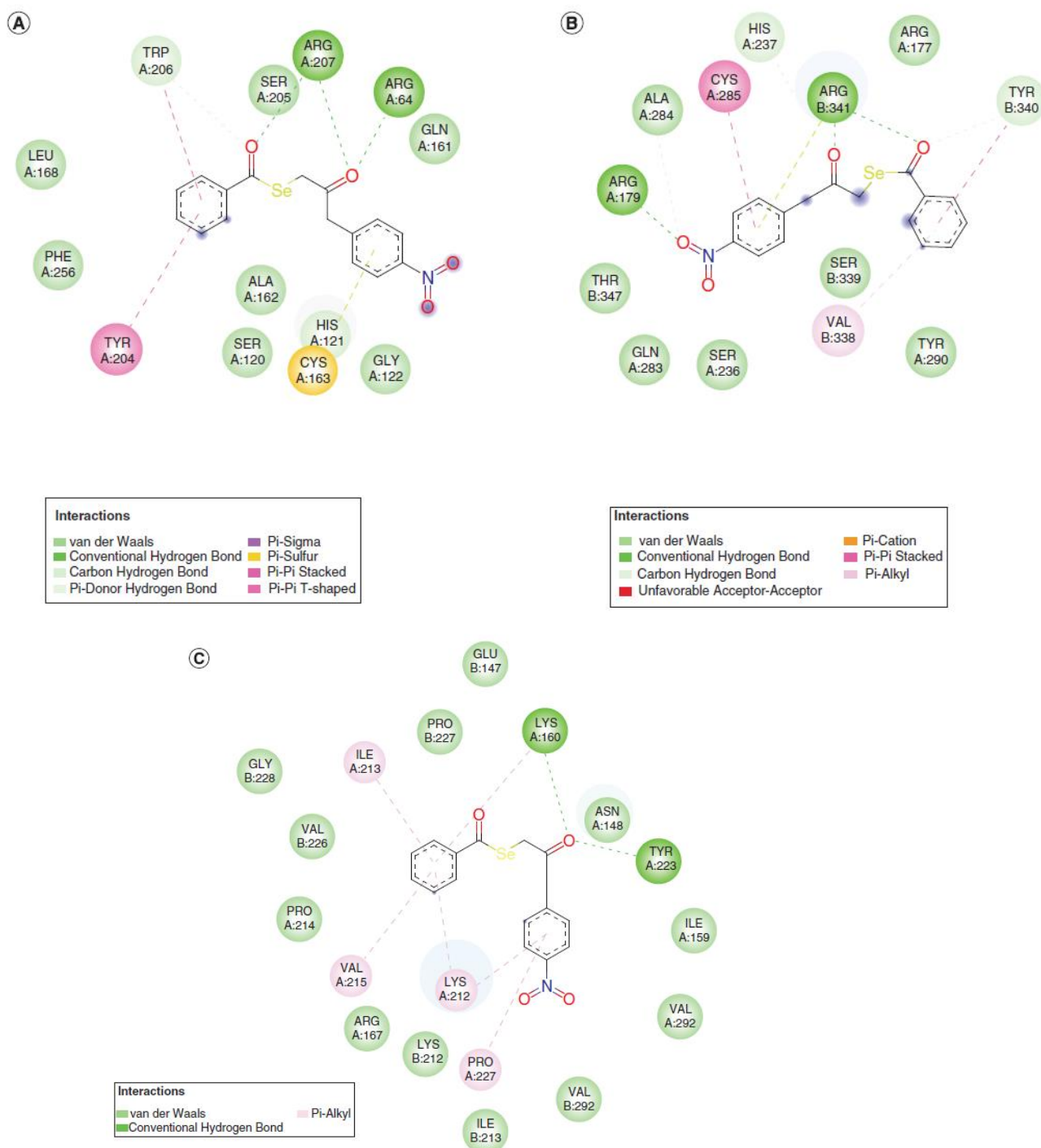


Figure 3. Molecular interactions between compound 3 and caspase 3 and caspase 8 at the S1 active sites on both molecules. (A) Caspase 3 active site S1. (B) Caspase 8 active site S1. (C) Molecular interactions between compound 3 and the caspase 7 active site.

These results demonstrate that the greatest probability of activity for compound 3 occurs through interaction with the active site S1 in both caspases, which are involved in the first stage of the apoptosis activation pathway. Figure 3 shows the interactions between compound 3 and the active site S1 in both caspase 3 and caspase 8.

Based on a bibliographic review, the active site of caspase 7 was also identified, according to a study by Witkowski and Hardy [30]. The active site is summarized in Table 6.

Table 6. Activation site in caspase 7.

	Caspase-7
L20 – L2	Glu 196 Iso 195 Lys 212 Iso 213 Pro 214 Val 215

Adapted from [30].

Table 7. The mean and standard error of the mean for the cytotoxic activity of selenoglycolicamides in HL-60, MCF7 and peripheral blood mononuclear cells compared with doxorubicin.

ID	IC ₅₀ (μg/ml)/pIC ₅₀			SI	
	HL-60	MCF7	PBMC	HL-60	MCF7
3	3.42 ± 0.14/5.0	11.18 ± 2.40/4.5	238.8 ± 1.40/3.2	69.8	21.4
6	7.52 ± 1.82/4.7	27.67 ± 1.33/4.2	102.0 ± 39.99/3.6	13.6	3.7
7	8.64 ± 1.18/4.6	93.52 ± 3.23/3.6	286.3 ± 45.71/3.1	33.1	3.1
8	6.48 ± 1.27/4.7	37.68 ± 6.63/4.0	136.4 ± 25.35/3.4	21.0	3.6
Dox	0.52 ± 0.13/6.0	5.77 ± 1.42/5.0	NT	NT	NT

SI = IC₅₀ PBMC/IC₅₀ HL-60 or MCF7. pIC₅₀ = -logIC₅₀ (IC₅₀ in mol/l).
Dox: Doxorubicin; NT: Not tested; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; SI: Selectivity index.

In the molecular docking, analysis, compound 3 was found to be most likely to interact with this active site, with an energy of -118.06 kcal/mol, interacting with the residues Lys 212, Iso 213, Pro 214 and Val 215, as shown in Figure 3. These results suggested that compound 3 has the ability to interact effectively with the activating sites of both initiator and effector caspases, which may be responsible for the activity against the studied tumor cell lines.

Biological activity

Assessment of the cytotoxic activity of the compound & the determination of cell viability

The development of compounds that can be used to treat cancer has been the subject of much research. Chemotherapeutic options must have potential antitumor activity, but with low toxicity in normal cells or even protective activity against other cancer treatments [37]. Thus, after performing the ligand-based approach and analyzing the results, we chose molecules that were classified as ‘Active’ in the models for both cell lines, resulting in the selection of compounds 3, 6, 7 and 8 for the cytotoxicity tests.

Table 7 shows that compound 3 exhibited greater cytotoxicity in tumor cells compared with PBMCs ($p < 0.05$), with greater cytotoxicity against tumor cells than doxorubicin, as demonstrated by the lower IC₅₀ value (9.41 ± 0.39) ($p < 0.05$).

The tested molecules were all selective for tumor cells, with cytotoxic doses in tumor cells that were nearly 70-fold lower than the cytotoxic doses in PMBCs. In addition to displaying cytotoxic activity against tumor cells, chemotherapeutic drugs or other substances being evaluated for cancer treatment must be selective for tumor cells over healthy cells. The selectivity index is a mathematical quantity that expresses this relationship and a value greater than two is significant and acceptable for chemotherapeutic drugs. To determine the selectivity index, the ratio between the IC₅₀ value for nontumor cell lines and the IC₅₀ value for tumor cell lines is calculated [38].

Among the selenium compounds with selectivity for tumor cells and antiproliferative activity that have previously been described in the literature, inorganic compounds, such as selenite (SeO_3^{2-}) have been emphasized. Selenite has inhibitory activity in the micromolar range, which has been widely documented in several different tumor types. Moreover, organic compounds, including selenium glutathione, selenium amino acid derivatives, methylseleninic acid, selenides, diselenides, selenium cyanates, selenium-conjugated heterocyclic groups and selenium nanoparticles have also demonstrated antitumor activity [39].

Figure 4 shows cell viability graphs for compounds 3, 6, 7 and 8 in the tested cell lines. The compounds promoted decreased HL-60 and MCF7 cell viability at the tested concentrations. However, only compound 3 did not result in a significant reduction in the viability of PBMC cells at any of the tested concentrations.

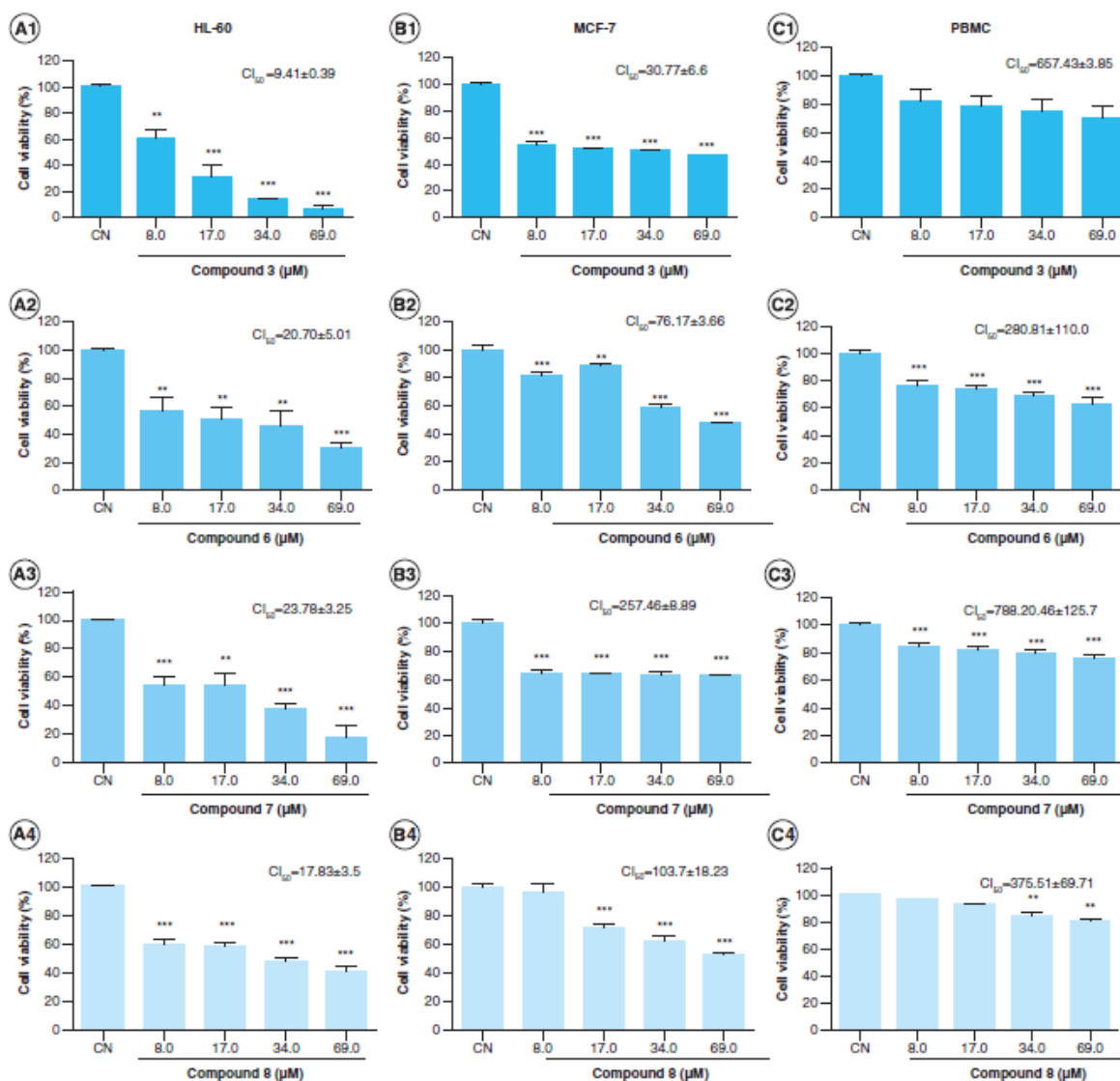


Figure 4. Assessment of cellular viability (%) in the HL-60 cell line (A1–A4); MCF7 cell line (B1–B4) and PBMCs (C1–C4), after 24 h of incubation with compounds 3, 6, 7 and 8, at four different concentrations each. IC₅₀ values are expressed in μM. Data were compared with negative control (nontreated group) by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test.

p < 0.01; *p < 0.001.

ANOVA: Analysis of variance; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell.

Compound 3 showed the best cytotoxic activity, with a dose-dependent decrease in the cell viability of HL-60 cells and an IC₅₀ value of approximately 9.41 μM (Figure 4A1). Among the essential parameters that must be observed during the development of new cancer drugs, the balance between therapeutic and toxicological effects is an important consideration. Many drugs have cytotoxic activity but are not selective against tumor cells and may also affect nontumor cells [40]. The vast majority of chemotherapeutic agents do not selectively or exclusively attack tumor cells, displaying high cytotoxicity against normal cells, causing significant side effects that especially affect the hematopoietic (bone marrow), germinal, hair follicle, gastrointestinal tract and central nervous system tissues, triggering symptoms such as nausea and vomiting. Therefore, the search for drugs that act specifically against tumor cells is essential for reducing the adverse effects of treatment and facilitating better patient progression [41].

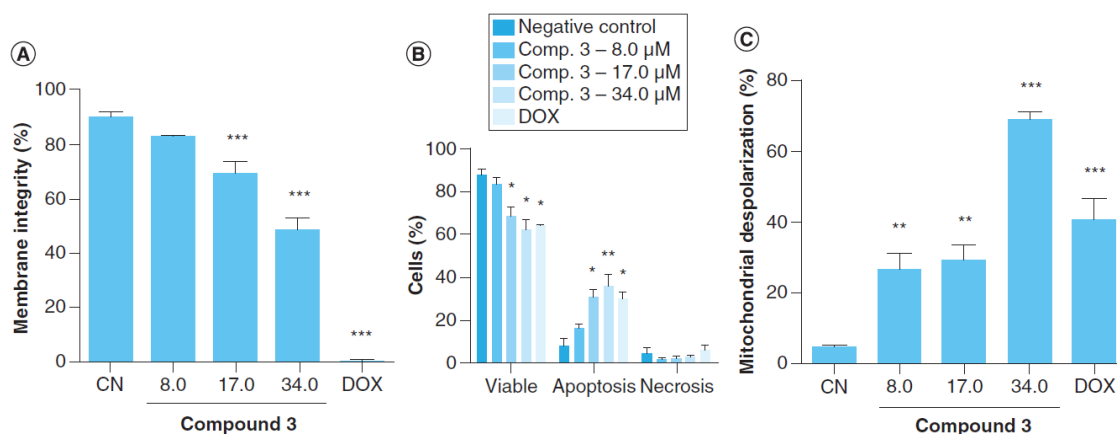


Figure 5. (A) Assessment of the membrane integrity in HL-60 cells after incubation with different concentrations of the selenium-based compound for 24 h. (B) The percentage of cell viability and the proportions of necrotic and apoptotic HL-60 cells, treated with different concentrations of compound 3, for 24 h. (C) Assessment of mitochondrial depolarization, using the JC-1 assay, in HL-60 cells incubated with different concentrations of compound 3 for 24 h. Data are expressed as the mean \pm SEM and were compared with the negative control by ANOVA, followed by Student–Newman–Keuls test. DOX (1.34 μ M). ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.**

ANOVA: Analysis of variance; DOX: Doxorubicin; SEM: Standard error of the mean.

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

After 24 h of treatment with the selenium compound at concentrations of 17.0 and 34.0 μ M, a significant decrease ($p < 0.001$) in the percentage of cells with intact plasma membranes was observed, relative to the percentage observed in the negative control (nontreated group). Compared with doxorubicin (positive control), treatment with all concentrations of the compound showed higher percentages of cells with intact membranes, indicating that this compound caused less damage to HL-60 cell membranes than doxorubicin ($p < 0.001$). The compound promotes the loss of membrane integrity at concentrations above its IC_{50} (Figure 5A).

Loss of plasma membrane integrity is a characteristic of cell death and is associated with structural and functional changes, which may occur during late apoptosis or necrosis [42,43].

Investigation of cytotoxicity acridine orange/ethidium bromide assay

The results showed that, compared with the negative control, compound 3 decreased cell viability at concentrations of 17.0 and 34.0 μ M ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). At the 8.0 μ M concentration, less cytotoxicity was observed compared with that induced by doxorubicin ($p < 0.05$). Increased proportions of apoptotic cells were observed at concentrations greater than 17.0 μ M ($p < 0.05$). No differences in the proportions of necrotic cells were observed among groups, indicating that the compound does not exert cytotoxic effects through necrosis ($p > 0.05$) (Figure 5B).

Compound 3 induced apoptosis in a concentration-dependent manner ($p > 0.05$), at a similar or higher frequency as observed for doxorubicin, which widely used in clinical oncology. The induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs is advantageous because cells can be eliminated by the immune system, without triggering an inflammatory response [44].

Our results corroborate previous studies that suggested the anticarcinogenic activity of selenium against various tumor cell lines, through the induction of apoptosis, associated with cell cycle arrest and mediated by the release of reactive oxygen species and DNA damage [45,46]. Although the exact mechanisms that mediate antitumor activity are not completely understood, several plausible mechanisms have been proposed previously and indicate the clinical advantages of using selenium for the treatment of cancer [39].

Assessment of mitochondrial membrane depolarization

Compound 3, at all tested concentrations, promoted greater mitochondrial membrane depolarization than the negative control ($p < 0.05$). At a concentration of 34.0 μ M, the compound caused greater depolarization than doxorubicin, which was used as a positive control ($p < 0.001$). The results for all concentrations tested are shown in Figure 5C.

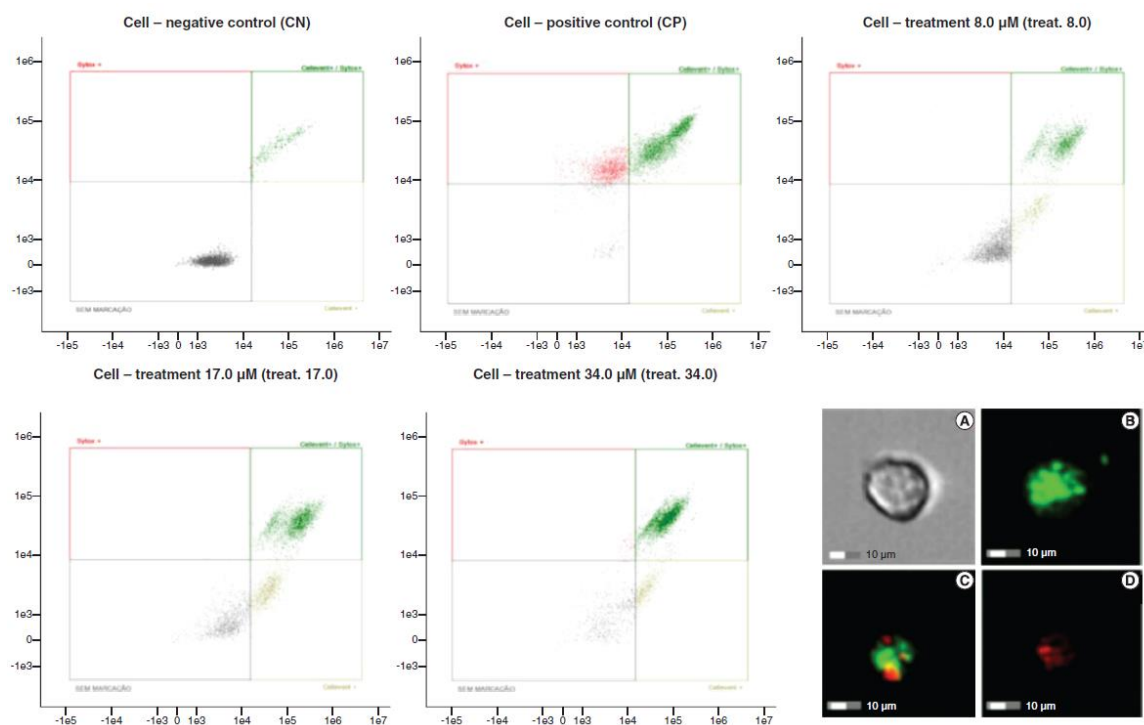


Figure 6. Determination of caspase 3 and caspase 7 expression levels. The negative control (CN) is characterized by the predominance of living cells (gray quadrant), evidenced by the low expression of caspases 3 and 7. The positive control (CP) shows the high expression of caspases (green quadrant), indicating the activation of the apoptotic cell death pathway, followed by necrotic events (red quadrant). Treatment with 8.0 μM compound 3 (Treat. 8.0) shows the predominance of live cells (gray quadrant), accompanied by low caspase expression (green and brown quadrants); treatment with 17.0 μM compound 3 (Treat. 17.0) shows a preponderance of apoptotic events, demonstrated by caspase expression (green and brown quadrants), followed by living cells (gray quadrant). Necrotic cells were not observed. Treatment with 34.0 μM compound 3 (Treat. 34.0) shows high caspase expression (green and brown quadrants). (A) Living cell. (B) Initial apoptosis. (C) Late apoptosis. (D) Necrosis. CN: Untreated cells, cultured with culture medium.

Because the primary role for mitochondria is the maintenance of bioenergetic and metabolic cell functions, and due to the relationship between mitochondria and apoptosis, the evaluation of mitochondrial membrane potential in cells exposed to antitumor drugs is essential to demonstrate the activation of an intrinsic apoptotic pathway [47–49].

Thus, compound 3, which was tested in this study, promoted the depolarization of the mitochondrial membrane at similar or higher rates than the positive control, confirming that the compound promotes apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway.

Cytometric analysis of caspase 3 & caspase 7 expression

The expression levels of caspases 3 and 7 in cells negative control, positive control and cell treated with 8.0, 17.0 and 34.0 μM Compound 3 are shown in Figure 6.

No significant differences in the activation of caspases 3 and 7 were observed between compound 3 and doxorubicin ($p > 0.05$). At concentrations of 17.0 and 34.0 μM , the activation levels were similar and superior to that of doxorubicin, respectively (Figure 7A). Compound 3 induced the expression of caspases in a concentration-dependent manner.

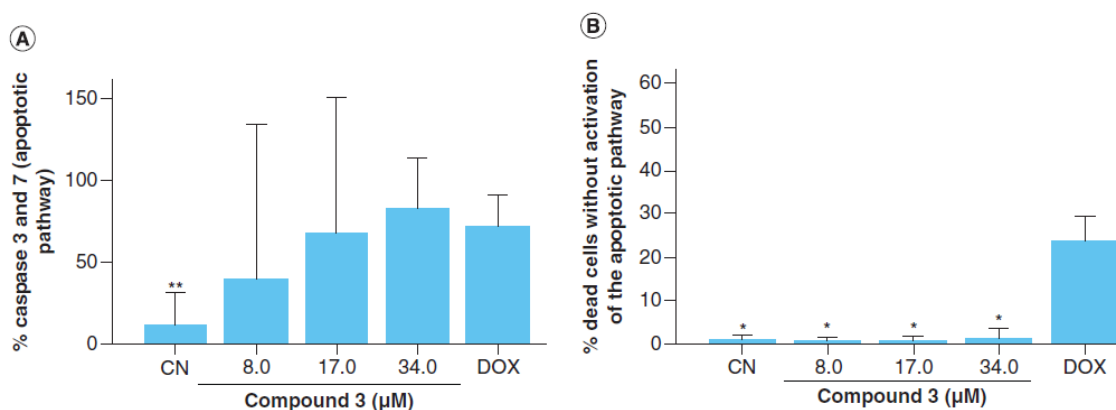


Figure 7. (A) Assessment of caspase 3 and 7 expression levels by flow cytometry. HL-60 cells were incubated with different concentrations of the selenium-based compound for 24 h. **(B)** Percentage of HL-60 tumor cells killed without the activation of the apoptotic pathway. Cells were exposed to different concentrations of compound **3** for 24 h. Data are presented as the mean \pm SEM and were compared with the positive control by ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test. DOX (1.34 μ M).

** $p < 0.01$.

ANOVA: Analysis of variance; CN: Untreated cells, cultured with culture medium; DOX: Doxorubicin; SEM: Standard error of the mean.

Compound **3** caused cell death, likely through the activation of the apoptotic pathway (Figure 7A & B). Doxorubicin manifested a high degree of cell death, likely due to necrosis ($p < 0.05$) (Figure 7B). Observing these findings, it can be inferred that the mechanism of cell death exerted by compound **3** is more advantageous and may cause less side effects if administered to a patient when compared with Doxorubicin, because the induction of the apoptosis process causes the membrane plasmatic dying cell remains intact, which prevents the release of pro-inflammatory cytokines in the circulating tissue [50,51]. On the other hand, in the necrosis process, cell death occurs in a disorderly manner, causing serious injuries due to the rupture of the cell membrane, which generates a inflammatory response and some harm to the patient [52–54].

Apoptotic signaling occurs through independent pathways (intrinsic and extrinsic) that converge on caspase activation, which act as regulators of the initiation and execution of apoptosis [47,51]. Caspases 3, 6 and 7 are known as executors because once activated, they promote DNA fragmentation and cell death through the apoptotic pathway [49,55]. Apoptosis in clinical practice has been targeted for the potential to use programmed cell death therapeutically and to better understand the mechanisms of resistance to radiotherapy and chemotherapy [56,57].

Selenium has been reported in several studies as a possible protective factor against different cancers. Selenium-derived compounds increase the resistance of noncarcinogenic cells to stress and act as a pro-oxidants in neoplastic cells, making them more sensitive to selenium toxicity than normal cells, slowing their growth and activity. Thus, a pharmacological therapeutic window may exist for the use of selenium-derived compounds in cancer treatments [12,13].

The exact mechanism of selenium action is not yet known; however, it may promote antitumorigenic effects and inhibit cell growth through p53 regulation, which promotes DNA damage and apoptosis [48,58].

The results of this study showed that selenium has significant pharmacological potential, selectively acting against HL-60 cells and inducing cellular and molecular events that culminate in tumor cell death, likely through apoptosis

Conclusion

In this study, we conducted a ligand-based virtual screening assay, using a machine learning RF model, to determine the antitumor potential of 15 selenoglycolicamides. The *in silico* study allowed us to determine that the selenoglycolicamides **3**, **6**, **7** and **8** were the most promising potential molecules for cancer treatment, presenting activity against HL-60 and MCF7 tumor cells. Compound **3** presented the best cytotoxicity results for the promyelocytic leukemia line (HL-60) and caused a dose-dependent decrease in cell viability. The tested compounds showed selective cytotoxicity against tumor cells (HL-60 and MCF7) relative to nontumor cells (PBMCs), an essential characteristic for the development of chemotherapeutic agents. The pattern of cell death induced by compound **3** was evaluated by flow cytometry and fluorescence microscopy, indicating the activation of caspases 3 and 7 at frequencies similar to that induced by doxorubicin, a drug widely used in the oncology clinic. The results suggested that compound **3** has significant pharmacological potential to act selectively against tumor cells, inducing

molecular and cellular events that culminate in HL-60 cell death. Our results suggested that the anticancer activity of selenium compounds exert their effects through the activation of the intrinsic apoptotic pathway, which is mediated by intracellular signals in response to various stress conditions, such as chemotherapy drugs [58]. The depolarization of the mitochondrial membrane, caused by the compound, suggests a rupture of the mitochondrial external permeability, allowing proteins that are normally confined in the intramembrane space to leak into the cytosol. These proteins include apoptogenic factors, such as cytochrome C, which plays a crucial role in the activation of mitochondria-dependent death in the cytosol. Cytochrome C triggers the formation of the apoptosome complex, including the recruitment of initiator and effector caspases, such as caspases 3 and 7. In addition, a docking study showed that compound **3** has good interaction energies with Caspase 3, 7 and 8, which participate in the apoptotic cell death pathway.

Future perspective

Based on the results obtained in this study, we intend to develop new selenium derivatives, from different series, to contribute to the development of new synthetic strategies for cancer treatment, which may identify agents that are more potent and more selective than those currently in use. We intend to deepen our studies to elucidate the mechanisms of action of these compounds at the molecular level. Future work may include studies to improve the toxicity profile of selected drugs and tests of toxicity in animal models (both rodents and nonrodents).

Summary points

- Selenium-based compounds are important due and several assays demonstrated their antitumor potential and low cytotoxicity against normal cells.
- We created a database containing 15 selenoglycolicamides and evaluated their potential antitumor activities in HL-60 and MCF7 cells, through ligand-based virtual screening. A diverse set of structures were selected from the ChEMBL databanks, consisting of 36,827 structures in HL-60 cells and 30,326 structures in MCF7 cells with tested antitumor activities, which were classified according to their pIC₅₀ values, to generate and validate a Random Forest model that shows high statistical index values.
- Compound **3** presented the best cytotoxicity results for the promyelocytic leukemia line (HL-60) and showed a dose-dependent decrease in cell viability. The tested compounds showed selective cytotoxicity against tumor cells (HL-60 and MCF7 cells) relative to nontumor cells (PBMCs), an essential characteristic for the development of chemotherapeutic agents.
- Compound **3** was able to induce cell death at a frequency similar to or higher than that induced by doxorubicin, a drug widely used in the oncology clinic. In addition, a docking study showed that compound **3** has good interaction energies with the target proteins, caspases 3, 7 and 8, which participate in the apoptotic cell death pathway. The results suggested that selenium has significant pharmacological potential to act selectively against tumor cells, inducing molecular and cellular events that culminate in tumor cell death.

Acknowledgments

The authors thank the research and administrative staff in the Federal Rural University of Pernambuco (Brazil) for their assistance.

Financial & competing interests disclosure

The authors acknowledge CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; 88887.122971/2016-00) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

1. Sanmartin C, Plano D, Palop JA. Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini Rev. Med. Chem.* 8(10), 1020–1031 (2008).

• **Describes epidemiological data on cancer worldwide.**

2. Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 13(8), 9649–9672 (2012).
3. Forman D, Ferlay J, Stewart BW, Wild CP. The global and regional burden of cancer. *World Cancer Rep.* 1, 16–53 (2014).
4. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 166(5), 1069–1080 (2012).
5. Murad AM, Katz A. *Oncologia: Bases Clínicas do Tratamento*. Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil, 41–42 (1996).
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5), 646–674 (2011).
7. Bonassa EMA, Gato MIR. *Terapêutica Oncológica Para Enfermeiros e Farmacêuticos*. Atheneu, São Paulo, Brazil, 644–645 (2012).
8. Siegel R, DeSantis C, Virgo K *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 62(4), 220–241 (2012).
9. Kumar R, Kaur M, Silakari O. Physiological modulation approaches to improve cancer chemotherapy: a review. *Anticancer Agents Med. Chem.* 14(5), 713–749 (2014).

• **Describes studies that report antitumor activity of some compounds containing selenium.**

10. Vinceti M, Wei ET, Malagoli C, Bergomi M, Vivoli G. Adverse health effects of selenium in humans. *Rev. Environ. Health* 16(4), 233–260 (2001).
11. Chen Y-C, Prabhu KS, Mastro AM. Is selenium a potential treatment for cancer metastasis? *Nutrients* 5(4), 1149–1168 (2013).
12. Margaret PR. Selenium and human health. *Lancet* 379(9822), 1256–1268 (2012).
13. Weekley CM, Aitken JB, Finney L, Vogt S, Witting PK, Harris HH. Selenium metabolism in cancer cells: the combined application of XAS and XFM techniques to the problem of selenium speciation in biological systems. *Nutrients* 5(5), 1734–1756 (2013).
14. Rahden-Staron I, Suchocki P, Czczot H. Evaluation of mutagenic activity of the organo-selenium compound Selol by use of the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 699(1–2), 44–46 (2010).

• **Addresses the importance of computer-aided drug design in the development of new drugs.**

15. Mangiatordi GF, Trisciuzzi D, Alberga D *et al.* Novel chemotypes targeting tubulin at the colchicine binding site and unbiasing P-glycoprotein. *Eur. J. Med. Chem.* 139, 792–803 (2017).
16. Trisciuzzi D, Alberga D, Mansouri K *et al.* Docking-based classification models for exploratory toxicology studies on high-quality estrogenic experimental data. *Future Med. Chem.* 7(14), 1921–1936 (2015).
17. Scotti L, Scotti MT. *In silico* studies applied to natural products with potential activity against Alzheimer's disease. In: *Computational Modeling of Drugs Against Alzheimer's Disease*. Springer, NY, USA, 513–531 (2018).
18. Scotti L, Júnior FJBM, Ishiki HM *et al.* Computer-aided drug design studies in food chemistry. In: *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*. Elsevier, MA, USA, 261–297 (2018).
19. Silva LM, Alves MF, Scotti L, Lopes WS, Scotti MT. Predictive ecotoxicity of MoA 1 of organic chemicals using *in silico* approaches. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 153, 151–159 (2018).

•• **Describes the synthetic methodology and data that helped characterize the compounds used in the study.**

20. Luis JAS, Souza HDS, Lira BF *et al.* Combined structure-and ligand-based virtual screening aiding discovery of selenoglycolicamides as potential multitarget agents against Leishmania species. *J. Mol. Struct.* 1198, 126872 (2019).

•• **Describes methodologies of good practice in data curation for use in virtual screening.**

21. Fourches D, Muratov E, Tropsha A. Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *J. Chem. Inf. Model.* 50(7), 1189–1204 (2010).
22. Fourches D, Muratov E, Tropsha A. Curation of chemogenomics data. *Nat. Chem. Biol.* 11(8), 535–535 (2015).
23. Fourches D, Muratov E, Tropsha A. Trust, but verify II: a practical guide to chemogenomics data curation. *J. Chem. Inf. Model.* 56(7), 1243–1252 (2016).
24. Muratov EN, Artemenko AG, Varlamova EV *et al.* Per aspera ad astra: application of Simplex QSAR approach in antiviral research. *Fut. Med. Chem.* 2(7), 1205–1226 (2010).
25. Breiman L. Random forests. *Mach. Learn. Springer, USA*, 45(1), 5–32 (2001).
26. Hall M, Frank E, Holmes G, Pfahringer B, Reutemann P, Witten IH. The WEKA data mining software: an update. *SIGKDD Explor.* 11(1), 10–18 (2009).
27. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143(1), 29–36 (1982).

•• **Relevant works to elucidate the results obtained in our *in vitro* studies of anticancer activity.**

28. Maciag JJ, Mackenzie SH, Tucker MB, Schipper JL, Swartz P, Clark AC. Tunable allosteric library of caspase-3 identifies coupling between conserved water molecules and conformational selection. *Proc. Natl Acad. Sci.* 113(41), E6080–E6088 (2016).
29. Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PRE *et al.* The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure* 7(9), 1125–1133 (1999).
30. Witkowski WA, Hardy JA. L2' loop is critical for caspase-7 active site formation. *Protein Sci.* 18(7), 1459–1468 (2009).
31. Onodera K, Satou K, Hirota H. Evaluations of molecular docking programs for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* 47(4), 1609–1618 (2007).
32. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* 49(11), 3315–3321 (2006).
33. Riss TL, Moravec RA, Niles AL *et al.* Cell viability assays. In: *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences (2016).
34. Mousinho KC. Estudo do potencial anticâncer de um derivado de Chalcona, 1-(4-Nitrofenil)-3-Fenilprop-2-En-1-Ona, *in vitro* e *in vivo*. *Master Dissertation* 1, 170 (2010).
35. Liu K, Liu P-c, Liu R, Wu X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Med. Sci. Monit.* 21, 15 (2015).
36. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 3, e430 (2012).
37. Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc. Nutr. Soc.* 64(4), 527–542 (2005).
38. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* 42(4), 377–387 (2007).
39. Fernandes AP, Gandin V. Selenium compounds as therapeutic agents in Cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1850(8), 1642–1660 (2015).

40. Mishra T, Khullar M, Bhatia A. Anticancer potential of aqueous ethanol seed extract of *Ziziphus mauritiana* against cancer cell lines and Ehrlich ascites carcinoma. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* e-pub (2011).
41. Riul S, Aguillar OM. Quimioterapia antineoplásica: revisão da literatura. *Rev. Min. Enferm.* 3(1/2), 60–67 (1999).
42. Leist M, Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 589–598 (2001).
43. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16(1), 3–11 (2009).
44. Liu J-j, Lin M, Yu J-y, Liu B, Bao J-k. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett.* 300(2), 105–114 (2011).
45. Gabel-Jensen C, Lunøe K, Gammelgaard B. Formation of methylselenol, dimethylselenide and dimethyldiselenide in *in vitro* metabolism models determined by headspace GC-MS. *Metallomics* 2(2), 167–173 (2010).
46. Wu M, Kang MM, Schoene NW, Cheng W-H. Selenium compounds activate early barriers of tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 285(16), 12055–12062 (2010).
47. Degli Esposti M. Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* 32(3), 493–495 (2004).
48. Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR *et al.* Selenium in human health and disease. *Antiox. Redox Sign.* 14(7), 1337–1383 (2011).
49. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* 112(6), 957–962 (2015).
50. Peng Z-f, Lan L-x, Zhao F *et al.* A novel thioredoxin reductase inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in HL-60 and K562 cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9(1), 16–21 (2008).
51. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol.* 9(1), 47–59 (2008).
52. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7(3), 253–266 (1973).
53. Vercammen D, Vandenabeele P, Beyaert R, Declercq W, Fiers W. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* 9(11), 801–808 (1997).
54. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr. Biol.* 9(17), S967–S961 (1999).
55. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv. Hematol.* 524308 (2012).
56. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407(6805), 810–816 (2000).
57. Debatin K-M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53(3), 153–159 (2004).
58. Gromadzińska J, Reszka E, Bruzelius K, Wąsowicz W, Åkesson B. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur. J. Nut.* 47(2), 29–50 (2008).

Artigo Científico II

**Evaluation of toxic effects *in silica*, *in vitro* and *in vivo*
of compounds derived from selenium**

Evaluation of toxic effects *in silica*, *in vitro* and *in vivo* of compounds derived from selenium

Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz^a, Diego de Sousa Dantas^b, José Alixandre de Sousa Luisa^c, Luciana Amaral de Mascena Costa^a, Tiago Queiroz da Mota Bittencourt^a, Matheus Victor Viana de Melo^a, Helivaldo Diogenes da Silva Souza^d, Petrônio Figueiras de Athayde Filho^d, Fabricio Oliveira Souto^e, Luciana Scotti^f, Marcus Tullius Scotti^f, Jaciana dos Santos Aguiar^b, Pabyton Gonçalves Cadena^a, Manoel Adrião Gomes Filho^a.

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

^bFederal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Zip code: 50670-901, Recife – Pernambuco, Brazil.

^cEducation and health Center, Federal University of Campina Grande, Zip code: 58175-000, Cuité - Paraíba, Brazil.

^dResearch Laboratory in Biofuels and Organic Synthesis, Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, Campus I - Lot. Cidade Universitaria, Zip code: 58051-900, João Pessoa - Paraíba, Brazil.

^eFederal University of Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Zip code: 50670-901, Recife – Pernambuco, Brazil.

^fPostgraduate Program in Natural and Bioactive Synthetic Products, Federal University of Paraíba, Campus I - Lot. Cidade Universitaria, Zip code: 58051-900, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

*Current address of corresponding author Dr. Ericka Fernanda Ferreira de Queiroz, Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Zip code: 52171-900, Recife – Pernambuco, Brazil. Tel.: +55-81-99825-6378;

E-mail: ericka.ffq@hotmail.com

Abstract

Selenium is recognized as an essential dietary element for mammalian and for different classes of living organisms, including archaea, algae, bacteria, and for many eukaryotes, has a variety of roles associated with protection from reactive oxygen species. In contrast to its essentiality, the history of selenium was first marked by its toxicity, which is certainly related to the fact that the range between deficiency, essentiality, and toxicity is narrow for selenium. Our objective was to evaluate the antitumor potential, *in silico*, *in vitro* and *in vivo* of compounds derived from selenium in the mammary adenocarcinoma cell line (MCF7) and we intend to establish the toxicity of the compound *in vivo* using zebrafish (*Danio rerio*) as experimental model. Our *in silico* tests have suggested that the selenium-derived compound under study can be tested as a potential molecule for the treatment of cancer, showing activity against MCF7 tumor cells. *In vitro* tests, the molecule responded quite satisfactorily, as it reduced the viability of tumor cells while preserving non-tumor cells. *In vivo*, the compound showed low toxicity, causing no mortality, teratogenic and morphological effects in animals, as well as no adverse effects on the cardiac system. Thus, our results suggest that selenium has significant pharmacological potential to act selectively against tumor cells, not being toxic for the early stages of animal development (zebrafish).

Keywords: Selenium, *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, anticancer activity, MCF7, zebrafish,

Introduction

For a long time Se was known as a highly toxic microelement and only in 1957 did its importance be described for adequate cellular metabolism, being recognized as an essential microelement of the diet for mammals and for different classes of living organisms, including archeas, bacteria, algae and for many eukaryotes, playing a variety of roles associated with protection against reactive oxygen species (ROSs) and hormonal regulation of the thyroid [1-7]. The metabolism of Se is still poorly understood, however the basic routes and

mechanisms of absorption of the mineral have already been described [8]. The mineral is unevenly distributed in the human body, the tissues with the highest amounts of Se are those from the thyroid gland, kidney, gonad, muscle, adrenal gland and liver [9]. Absorption occurs mainly in the duodenum and cecum and, in humans, excretion occurs primarily through urine [10].

The Se can be found in several forms, which can be divided into organic and inorganic. Organic forms can include derivatives of L-selenomethionine, Se-methyl-L-selenocysteine and L-selenocysteine. Inorganic forms can be selenite, selenate or elemental Se. All of these forms have significantly different absorption efficiencies, metabolism pathways and toxicity profiles [11].

Studies show that both forms of selenium, tested alone or in combination with other antioxidants, have anti-tumor effects by preventing angiogenesis and metastasis in breast, prostate, colorectal, melanoma, liver and lung cancers, among others [12,13]. The compound increases the resistance of non-carcinogenic cells to stress, besides acting as a pro-oxidant in neoplastic cells, turning them more sensitive to selenium toxicity than normal cells, decreasing growth and activity [14, 15]. Therefore, there may be a therapeutic window for the use of selenium-derived compounds in the treatment of cancer.

For the discovery and development of a drug, the pharmaceutical industry uses several techniques, among which we can mention: research *in silico*, *in vitro* and *in vivo*. *In silico* tests, especially chemoinformatics, apply computational chemistry to theoretical chemistry methods to calculate the structure and properties of molecules; molecular modeling, which uses 3D graphics and optimization techniques to help understand the nature and action of chemical compounds and proteins; and computer-aided drug planning, which relates to the use of computational techniques to assist in the discovery and planning of new bioactive molecules that lack experimental data, such as data from *in vitro* and *in vivo* assays [16-19].

The next two steps involved in the drug development process are based, briefly, on the *in vitro* and *in vivo* study of compounds for the treatment of diseases. This stage, also called pre-clinical studies, has as main objective the pharmacological evaluation *in vitro* and *in vivo* systems to obtain the greatest

possible knowledge about the properties and adverse effects of the drug in development. The last stage, or clinical studies, corresponds to research conducted on patients, or on healthy volunteers, usually aimed at evaluating a new treatment [20-23].

The development of the *in vitro* cell culture technique combined with the establishment of cell lines has become essential for the study of the biological mechanisms involved in the formation of neoplasms, as well as in the performance of tests with several compounds, aiming to establish safe doses or even, the discovery new substances [24-26].

In vitro study models are widely used in several experiments, as they can be controlled, reducing the possibility of error, in addition to being generally less expensive. Other advantages point to the speed in the search for results, compared to animal models, in addition to allowing the study of a greater number of combinations, with different parameters [27]. In addition to *in vitro* tests, *in vivo* tests also have numerous advantages, such as the complexity of working with organs and systems, which is currently impossible or difficult to reproduce *in vitro*. With the continuous development of new chemical and pharmaceutical products, laboratory animals have become important and well-established tools for the generation of toxicological data [28, 29].

Non-clinical toxicology studies are used to predict a therapeutic window between effective and toxic exposures, guide upper clinical dose limits based on these exposures and provide data on absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) [30]. Therefore, zebrafish larvae can be used as a model for the first toxicity tests in order to identify candidates for toxic drugs, allowing safer molecules to be tested in mammalian models. The embryonic and larval model also offers a refinement to the design of animal studies, because the embryos are fertilized externally and are transparent from the first days of life, this allows non-invasive observation of toxicities [31].

Thus, our objective is to evaluate the antitumor potential, *in silico*, *in vitro* and *in vivo* of compounds derived from selenium in the mammary adenocarcinoma cell line (MCF7) and we intend to establish the toxicity of the compound *in vivo* using zebrafish (*Danio rerio*) as experimental model.

2. Materials and Methods

2.1. Chemistry

In the study we used, compounds 2–10, which were derived from selenium, and of these, we resynthesized two compounds (3 and 6), according to the methodology described by Souza et al., 2019 (Figure 1) ³². These compounds were synthesized at the Bioenergy and Organic Synthesis Research Laboratory at the Federal University of Paraíba, Brazil, using selenoglycolic acid. Selenium compound was characterized by infrared spectroscopy (IR), hydrogen nuclear magnetic resonance (NMR 1H) and carbon-13 (NMR 13C).

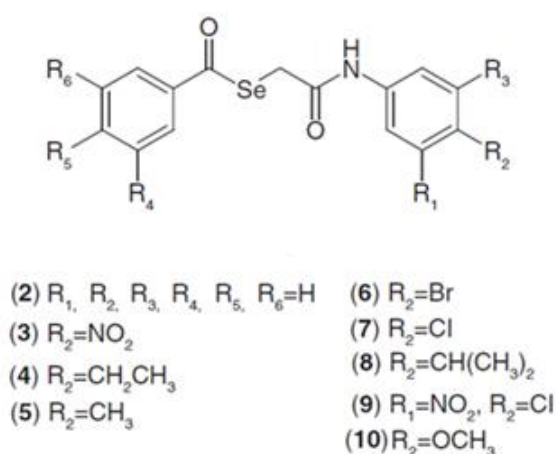


Figure 1. Compounds in the selenoglycolicamides series.

2.2 Dataset

Data collection & curation

The experimental data were obtained from the ChEMBL database (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). The dataset included a wide variety of cytotoxicity information for several organic compounds, which were tested against MCF7 (human breast adenocarcinoma) cell line. The dataset for the MCF7 cell line included 33.660 chemical records with defined chemical structures. After curation, the final MCF7 datasets resulted in 30.326 organic chemicals, with previously determined half-maximal inhibitory concentration

(IC50) values. All experimental cytotoxicity values were expressed as molar units (mol l⁻¹), and then, the logarithmically transformed data (pIC50) were used.

The compounds were classified according to the pIC50 values, resulting in the classification of 14.662 active compounds (pIC50 \geq 4.5) and 15.664 inactive compounds (pIC50 \leq 4.5) for MCF7 cells. Our databank includes the compounds 2–10. For the selection of our data sets, chemical compounds with undefined or missing structures were not considered for modeling. In this process, some specific chemotypes were normalized, such as nitro and aromatic groups by using ChemAxon Standardizer (JChem, 16.1.11.0, 2016, ChemAxon, Budapest, Hungary, <http://www.chemaxon.com>). Inorganic salts, organometallic compounds and mixtures were also removed. HiT quantitative structure–activity relationships (QSAR) [33] was used to remove duplicates and JChem to generate 3D structures.

Model development & validation

In the present work, Dragon v.7.04 software [34] was used to calculate molecular descriptors in order to extract chemical information from different representations of molecules. These descriptors are numerical variables used to quantify the structural information of a chemical compound [35].

For the construction of our model, all descriptors calculated by Dragon v.7.04 were imported into the KNIME 3.14.1 software (KNIME 3.14.1 the Konstanz Information Miner Copyright, 2003–2019), (www.knime.org) [36]. Then, the data were stratified into two groups, a training group with 80% of the compounds and another test group with 20% with maintenance of the same proportion of active and inactive compounds in both groups. The data were subjected to a process of cross-validation by using ten stratified groups and selected at random, but with the maintenance of distributions and variables of activity classes. Descriptors were selected, and a model was generated, using the training set and the RF algorithm [36], using the WEKA nodes [37]. The internal and external performances of the selected models were analyzed for sensitivity (true positive rate or active rate), specificity (true negative rate or inactive rate) and accuracy (overall predictability). In addition, the sensitivity and specificity of the receiver operating characteristic (ROC) curve were found to describe the true

performance with increased clarity and accuracy. The plotted ROC curve shows the true positive (active) rate, either versus the false positive rate or versus sensitivity (1: specificity). In a two-class classification, when the variable being investigated cannot be distinguished between the two groups (i.e., when no difference exists between the two distributions), the area under the ROC curve equals 0.5 and coincides with the diagonal. When there is a perfect separation between the values for two groups (i.e., no overlapping distributions), the area under the ROC curve equals 1, reaching the upper left corner of the plot [38].

2.3 Cell culture

MCF-7 breast cancer cell line was obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro (Brazil) and cultured in RPMI 1640 (HIMEDIATM, Mumbai, Índia) medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil). This cell line was incubated in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C and usually sub-cultured once every 3 days.

2.4 MTT assay

To determining the cytotoxicity of compounds 3 and 6 (derivatives from selenium) on the MCF-7 breast cancer cell line MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric assay was applied, obtained from Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil (13). MCF-7 cells was seeded in 96-well plates at a density of 2×10^4 cells per well and incubated for 24 h. Then, the cells were exposed to eight increasing concentration (0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 µg/mL) of compounds. After 24 hours of incubation at 37 °C and 5% atmosphere of CO₂ was added 20 µl MTT (5 mg/mL) at each well and further incubated for 3 h, next, the plates were centrifuged, supernatant discarded and 100 µL of DMSO added. For positive control, it was performed doxorubicin treatment (0.78 µg/mL), whereas negative control received equal volume of culture medium. Then the plates were shaken for 5 minutes to completely solubilize formazan crystals and absorbance were evaluated in a plate spectrophotometer (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, USA) at 570 nm wavelength [39]. The tests were performed in triplicate and, to calculate the concentration that inhibits 50% of cell growth (IC₅₀), the GraphPad Prism

software, version 5.0, was used. To investigate the selectivity of compounds for tumor cells compared to normal proliferating cells, the MTT assay was performed using PBMC (peripheral blood mononuclear cells) from healthy donors. PBMC cells were obtained from human peripheral blood, in vacuum tubes containing anticoagulant (EDTA). For cell isolation, it was employed discontinuous Percoll gradient technique, according to methodology of Mousinho (2010) [40]. The cytotoxicity in isolated cells was determined by the MTT reduction assay. All studies were performed in accordance with Research Guidelines (Law 466/12, National Council of Health, authorization number: 3.741.386). Data are presented as IC₅₀ values with 95% confidence intervals (CI 95%) obtained by nonlinear regression.

2.5 Analyses of cell death by flow cytometric

The annexin-V and PI double staining method was used to evaluate cell death (apoptotic or necrotic). MCF-7 cells were harvested with trypsin-EDTA and then stained with the FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocols. Then the cells were subjected to flow cytometric analysis with a flow cytometer model BD Accuri™ C6, BD Bioscience. In this assay, annexin-V would detect the translocation of phosphatidylserine from the inner leaflets to the outer leaflets of the plasma membrane, which is a key feature of apoptotic cells, whereas PI would detect necrotic cells with permeabilized plasma membrane.

2.6 *In vivo* experiments

Zebrafish

The experiments were carried out in the Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). All procedures involving zebrafish were approved by the ethics committee in the use of animals of the same University, protocol number 2728181120.

Adult zebrafish used in these experiments were obtained from a commercial supplier and maintained in aquariums (80 L) with artificial aeration

(11 mg/L DO), temperature $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and pH $7,5 \pm 0,5$. The adults animals were fed with adult zebrafish food (aquatic habitats).

Acute toxicity tests for selenium compound in *D. rerio* embryos followed OECD recommendations 236 (2013) [41]. *D. rerio* embryos were obtained using the Westerfield (2000) protocol [42]. Adults were placed in reproduction chambers in the proportion of 2 males for each female (2:1), with a photoperiod of 14/10 hours of light and dark, respectively and allowed to reproduce in the morning. The zebrafish embryos were collected from the breeding chambers and selected for viability and cell stage. Healthy embryos that successfully reached the 8-32 cell stage (e.g., within approximately 2h of fertilization) were selected to use in dosing experiments.

The eggs that showed embryo development were exposed to control and the concentrations of 5, 20, 35, 50 and 60 $\mu\text{g/L}$ of compound 3, all in quadruplicate, using a sterile 80 mL polystyrene reservoir ($n = 15$), with pH $7,5 \pm 0,5$ and temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$. The embryos were kept in incubators at 28°C with a photoperiod of 14/10 hours of light and dark respectively (BITTENCOURT, 2018; Patent BR 10201801504) [43]. The assay was based on the OECD testing guideline 236 on the Fish Embryo Acute Toxicity (FET), Test (OECD, 2013) [41].

The parameters evaluated were heart rate (HR) [44], mortality (M) and teratogenic effects. Mortality was determined daily, and the determination of embryo lethality was assayed according to OECD 236 [41]. The teratogenic effects and morphometry were evaluated at 24 –96 hpf (hours postfertilization). The terarogenic and mosrfometric effects analyzed were deformation of the spine (DS) and tail (Dcau), edema of the pericardium (EP) and yolk sac (YS), coagulation (Coag), absence of melanin (AM), generalized deformations (GD), body length (BL), head length (HL) and head-width (HW) [45] (Figure 2), images of the larvae were collected using an optical microscope BIO2B SSI with an LED bulb. The heart rate of the embryos was measured manually by counting the number of heartbeats (Nh) under an optical microscope (400x, 1000x) [44].

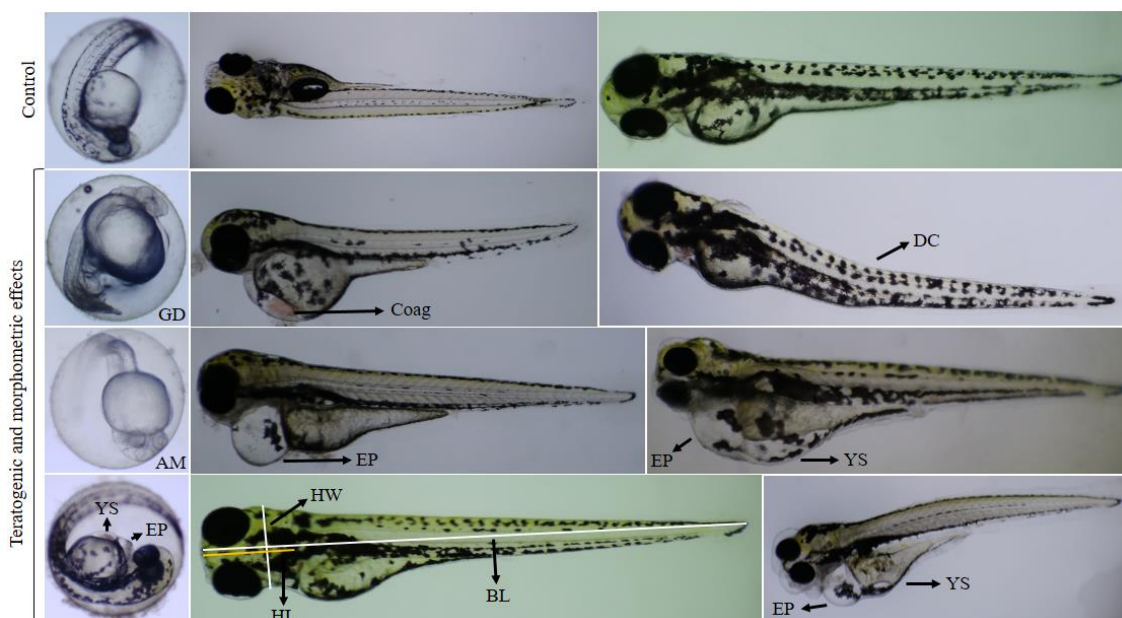


Figure 2. Teratogenic and morphometric effects evaluated in zebrafish embryos after exposure to compound 3 from 24 hpf to 96 hpf. DS - spinal deformation; Dcau - tail deformation; PE - pericardial edema; YS - yolk sac; Coag - coagulation; AM - absence of melanin; DG - generalized deformations; BL - body length; HL - head length; HW - head width.

2.7 Statistical analysis

All experiments were performed three or four-times for each group. All data showed symmetrical distributions, and the results are expressed as the mean \pm the standard error of the mean. Cytotoxicity is expressed as the mean IC50 value and the IC50 value was calculated by logistic regression, using GraphPad Prism[®] software, version 5.0 Demo. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The results of *in vivo* experiments were analyzed by one-way ANOVA. When the difference was significant, means were compared by the Tukey test with $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab, Northampton, MA USA).

3. Results

3.1 Structural characterization of the compounds 3 and 6

The NMR data obtained for the resynthesized compounds were compared with those obtained previously by our group [46]. The data obtained are described below.

N-(4-Nitrophenyl)benzoselenoglycolicamide (3) (Figure 3A)

Yield: 76%. White solid with m.p. 193°C. ¹H NMR – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.80 (s, 1H, NH); 8.18 (d, J = 9.2 Hz, 2H, H-10 and H-12); 7.96 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H-3 and H-3'); 7.76–7.62 (m, 3H, H-5 to H-9 and H-13); 7.55 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-4 and H-4'); 3.82 (s, H, 2H, H-6). ¹³C NMR – (50 MHz, CDCl₃, δ): 197.6 (C-1); 137.7 (C-2); 129.3 (C-3 and C-3'); 127.8 (C-4 and C-4'); 135.3 (C-5); 28.1 (C-6); 168.7 (C-7); 143.9 (C-8); 119.3 (C-9 and C-13); 125.4 (C-10 and C-12); 143.6 (C-11).

N-(4-Bromophenyl)benzoselenoglycolicamide (6) (Figure 3B)

Yield: 80%. White solid with m.p. 166–167°C. ¹H NMR – (200 MHz, CDCl₃, δ): 8.44 (s, 1H, NH); 7.94 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-3 and H-3'); 7.69 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-5); 7.53 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-4 and H-4'); 7.49 (s, 4H, H-9, H-10, H-12 and H-13); 3.73 (s, 2H, H-6). ¹³C NMR – (50 MHz, CDCl₃, δ): 197.1 (C-1); 137.3 (C-2); 129.3 (C-3 and C-3'); 127.8 (C-4 and C-4'); 134.7 (C-5); 28.3 (C-6); 168.5 (C-7); 137.8 (C-8); 121.5 (C-9 and C-13); 132.1 (C-10 and C-12); 117.4 (C-11).

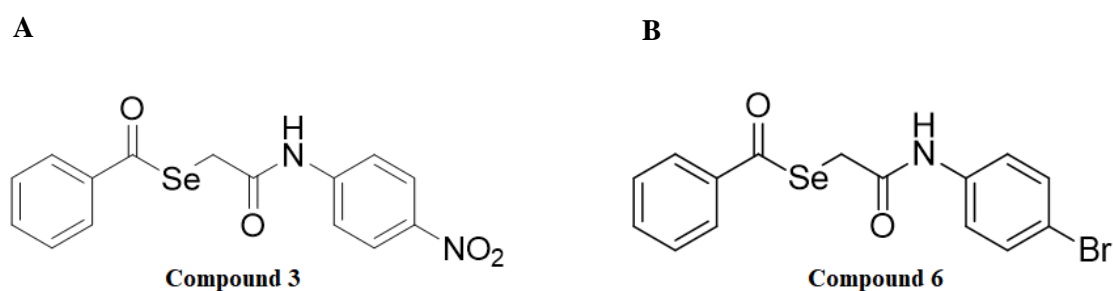


Figure 3. Molecules that were classified in the in silico tests as 'Active' and showed p values \geq 0.55, resulting in the selection of compounds 3 and 6 for the cytotoxicity tests.

3.2 Computational study

The computational study was developed using a computer with an i7 processor, running at 2.6 GHz and equipped with 8 GB of RAM. With this equipment and the aid of the Dragon v.7.04 software, all 1.024 descriptors were calculated quickly (~60 min), so that it allowed to classify the compounds as active (A) or inactive (I) and then used as input data, together with dependent

variables (binary classification) for the KNIME program (v. 3.14.1), where the RF model was generated.

Table 1 show the statistical indices of the RF model for the training, cross-validation and test sets that were generated for each compound tested against MCF7 cells. For the training set, the learning machine model returned the same hit rates for inactive and active compounds, which were 100%. For MCF7 cells, the specificities (true-positive rates [compounds predicted to be active]) for the cross-validation and test sets were determined to be 73.77 and 74.80%, respectively, and the sensitivities (true-negative rates [compounds predicted to be inactive]) were 75.72 and 77.50%.

Table 1. Summary of the training, internal cross-validation, and test results and the corresponding matched results, which were obtained using the Random Forest algorithm on the total set of 30.326 compounds tested against MCF7 cells (24.260 in the training set and 6.066 in the test set).

	Validation			Test		
	Samples (n)	Match (n)	Match (%)	Samples (n)	Match (n)	Match (%)
Active	11.729	8.653	73.77	2.933	2.194	74.80
Inactive	12.531	9.488	75.72	3.133	2.428	77.50
Overall	24.260	18.141	74.78	6.066	4.622	76.20

ROC plots were generated for the cross-validation and test sets, which plotted the true-positive (active) rates against the false-positive rates, resulting in area under the curve values of approximately 0.84 (Figure 4A) and 0.83 (Figure 4B) for the MCF7 cross-validation and test sets, respectively, which were all significantly higher than 0.5.

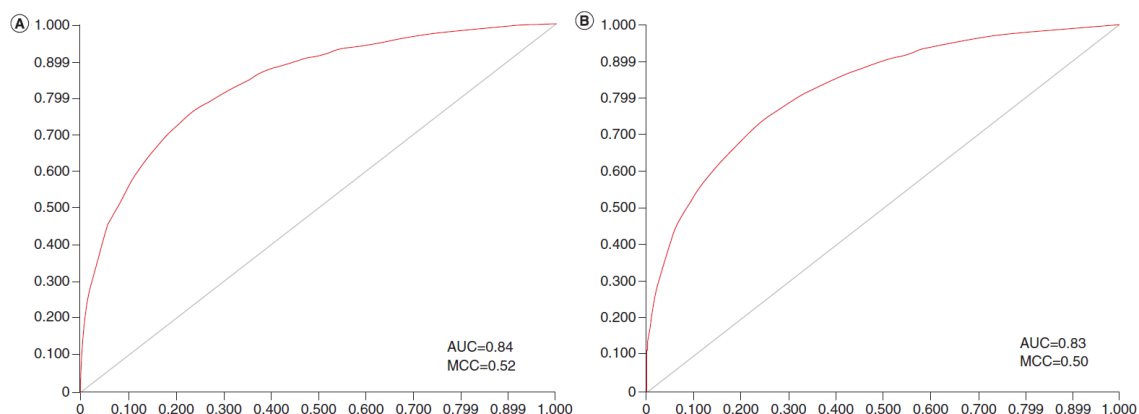


Figure 4. Receiver operating characteristic plots generated by the selected Random Forest models for the cross-validations and test sets and the area under the curve and Matthews Correlation Coefficient values. (A) Cross-validation set for MCF7, (B) Test set for MCF7.

The Matthews Correlation Coefficient (MCC) values for the cross-validation and test sets were 0.52 (Figure 4A) and 0.50 (Figure 4B), respectively, for the MCF7 RF model. Because an MCC value of 1 represents a perfect prediction, whereas 0 represents a random prediction and -1 represents total disagreement between the prediction and the observation, the RF models for both cells showed significant MCC values.

Table 2 shows the activity predictions, with respective probabilities (p), which were calculated using the RF model for compounds 2–10 against MCF7 cells. For values of $p \geq 0.05$, the molecule was considered to be active (A), whereas for $p < 0.05$, the molecule was considered to be inactive (I).

Table 2. Prediction of activity, with their respective probabilities (p), calculated using the RF model for compounds 2 – 10 against MCF7 cells.

Compounds	Activity	p-value
2	I	0.45
3	A	0.55
4	I	0.48
5	I	0.46
6	A	0.62
7	A	0.54
8	A	0.54
9	A	0.53
10	A	0.51

3.3 Cytotoxic activity of the compound & the determination of cell viability

The development of compounds that can be used to treat cancer has been the subject of much research. Chemotherapeutic options must have potential antitumor activity, but with low toxicity in normal cells or even protective activity against other cancer treatments [47]. Thus, after performing the computational tests and analyzing the results, we chose molecules that were classified as 'Active' and presented values $p \geq 0.05$, resulting in the selection of compounds 3 and 6 for the cytotoxicity tests.

Table 3 shows that compound 3 exhibited greater cytotoxicity in MCF7 tumor cells compared to PBMCs ($p < 0.05$). The analyzed molecules showed selectivity rates for tumor cells of 21.4 (compound 3) and 3.7 (compound 6) times lower than the cytotoxic doses in PBMCs. The selectivity index (SI) is a mathematical equation that expresses this relationship and a value greater than two is significant and acceptable for chemotherapeutic agents. To determine the selectivity index, the ratio between the IC₅₀ value for non-tumor cell lines and the IC₅₀ value for tumor cell lines is calculated [48].

Table 3. The mean and standard error of the mean for the cytotoxic activity of selenoglycolicamides in MCF7 and peripheral blood mononuclear cells compared with doxorubicin.

ID	IC ₅₀ (µg/mL)		SI
	MCF7	PBMC	
3	11.18 ± 2.40/4.5	238.8 ± 1.40/3.2	21.4
6	27.67 ± 1.33/4.2	102.0 ± 39.99/3.6	3.7
Dox	5.77 ± 1.42/5.0	NT	NT

SI = IC₅₀ PBMC/IC₅₀ MCF7. pIC₅₀ = -logIC₅₀ (IC₅₀ in mol/l).
Dox: Doxorubicin; NT: Not tested; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; SI: Selectivity index.

The figure 5 shows cell viability graphs for compounds 3 and 6 in the tested cell lines. The compounds promoted decreased MCF7 cell viability at all the tested concentrations. However, only compound 3 did not result in a significant reduction in the viability of PBMC cells at any of the tested concentrations ($p > 0.05$). The cytotoxic activity of compound 3 in MCF7 cells did not change in all tested doses, with no decrease in viability in a dose-dependent manner. Thus, after analyzing the results of the cytotoxicity test, we chose compound 3 for the following experiments.

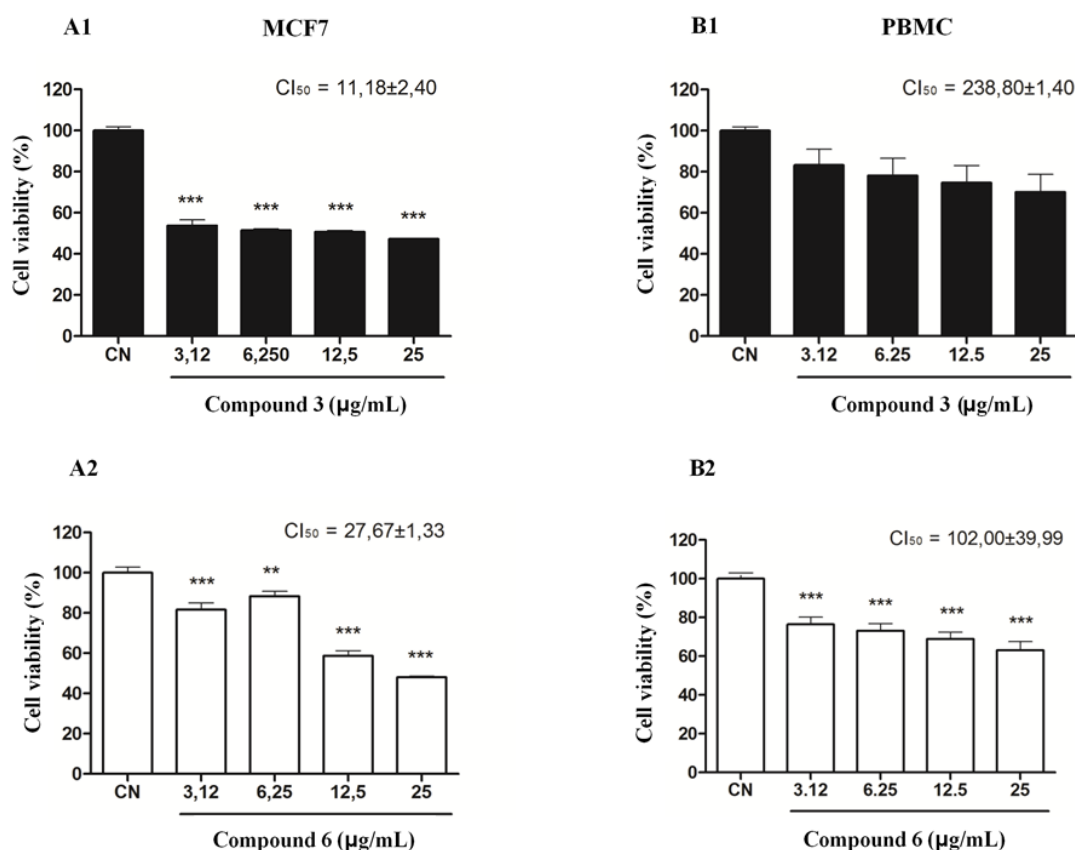


Figure 5. Assessment of cellular viability (%) in the MCF7 cell line (A1–A2); MCF7 and PBMCs (B1–B2), after 24 h of incubation with compounds 3 and 6, at four different concentrations each. IC_{50} values are expressed in $\mu\text{g/mL}$. Data were compared with negative control (nontreated group) by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

ANOVA: Analysis of variance; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell.

3.4 Analyses of cell death

To analyze the type of death induced by the compound, we used the double staining method with annexin V and propidium iodide (PI) (Thermo Fisher Scientific). Cells in the early stages of apoptosis were marked by annexin V, emitting green fluorescence as a result of their binding to phosphatidylserine residues, externalized in the plasma membrane at the beginning of the process. In late apoptosis, in addition to the exposure of phosphatidylserine, pores appear on the membrane making it permeable to PI, which causes the cell to have double labeling (annexin V + PI). The necrotic cells were marked intensely by PI that emits red fluorescence. Viable cells were not labeled with either annexin V or PI. As shown in figure 6, compound 3 at the studied concentrations (6.12, 12.25 and 25 $\mu\text{g/mL}$) caused a reduction in cell viability from the dosage of 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (p

<0.05). Cell death by necrosis and late apoptosis was observed at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and doxorubicin (positive control) ($p < 0.001$). We did not observe significant values of death due to apoptosis in any of the tested concentrations ($p > 0.05$).

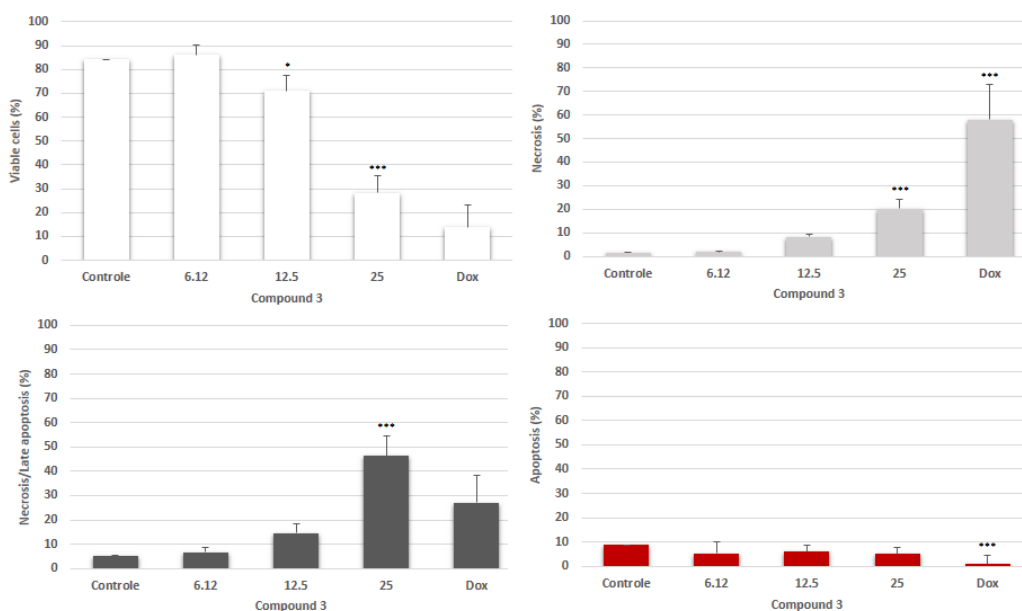


Figure 6. Annexin V / PI staining of MCF-7 cells treated with compound 3 at concentrations of 6.12, 12.5 and 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, over a 24-hour period. Data were compared with control (nontreated group) by one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

3.5 *In vivo* experiments – Zebrafish

All experiments carried out on the model with the zebrafish followed the recommendations of the standards established by OECD 236 (2013) [41]. The results of zebrafish exposure to the compound at concentrations 5, 20, 35, 50 and 65 $\mu\text{g}/\text{L}$ are shown in figure 7 and 8 A,B,C. Mortality was less than 10% after in all studied groups and the reason appeared to be blood coagulation [41]. This mortality was associated with teratogenic effects of compound 3. The Compound at the concentrations and times studied was not toxic to zebrafish in the early stages of development, thus not having significant teratogenic and morphological effects, with the exception of the dosage of 65 $\mu\text{g}/\text{L}$ and at the time of 24 hpf ($p > 0.05$) (figure 7 and 8 A,B,C). We considered animals dead when they did not hearbeat. We did not observe mortality or significant teratogenic

effects caused by the compound in all the concentrations evaluated and at times of 48, 72 and 96 hpf ($p > 0.05$).

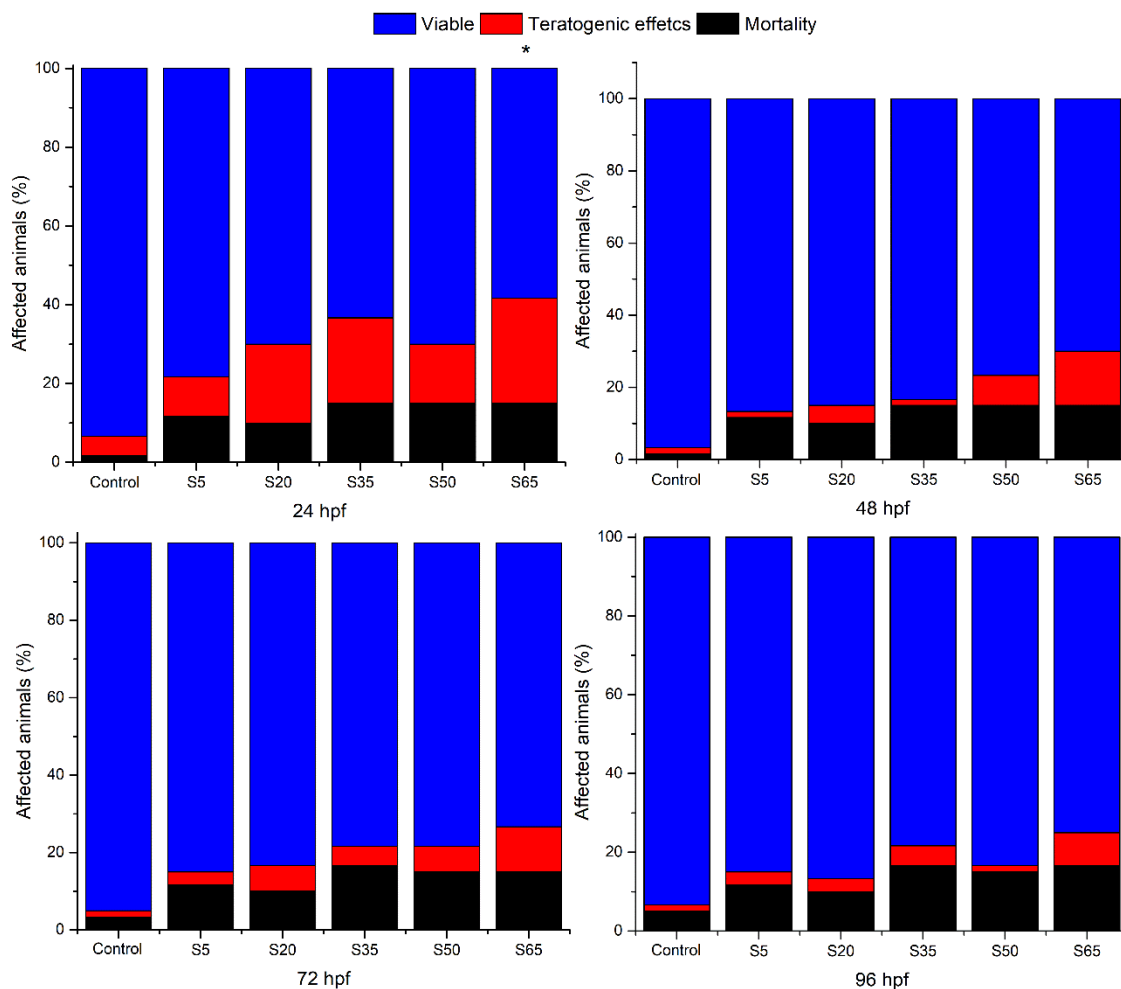


Figure 7. (Affected animals). Percentage of affected animals at 24 - 96 hpf. The reduction in the percentage of affected animals was considered significant when $* = p < 0.05$. Each experimental group was compared with the control group by one-way ANOVA (24 hpf $F(5,23) = 2.86$ $p = 0.04$, 48 hpf $F(5,23) = 2.53$ $p = 0.07$, 72 hpf $F(5,23) = 2.68$ $p < 0.06$, 96 hpf $F(5,23) = 1.95$ $p = 0.13$) followed by Tukey's test. Legend: S5-S65 – compound 3 at 5-65 $\mu\text{g/L}$.

Regarding heart rate, we did not observe a statistically significant decrease or increase in frequency between the groups exposed to the compound ($p > 0.05$) (figure 8 D). The increase in heart rate over time is related to the animal's developmental stage, since after 24 hpf many of them have hatched from eggs and can swim actively, a fact that naturally increases heart rate.

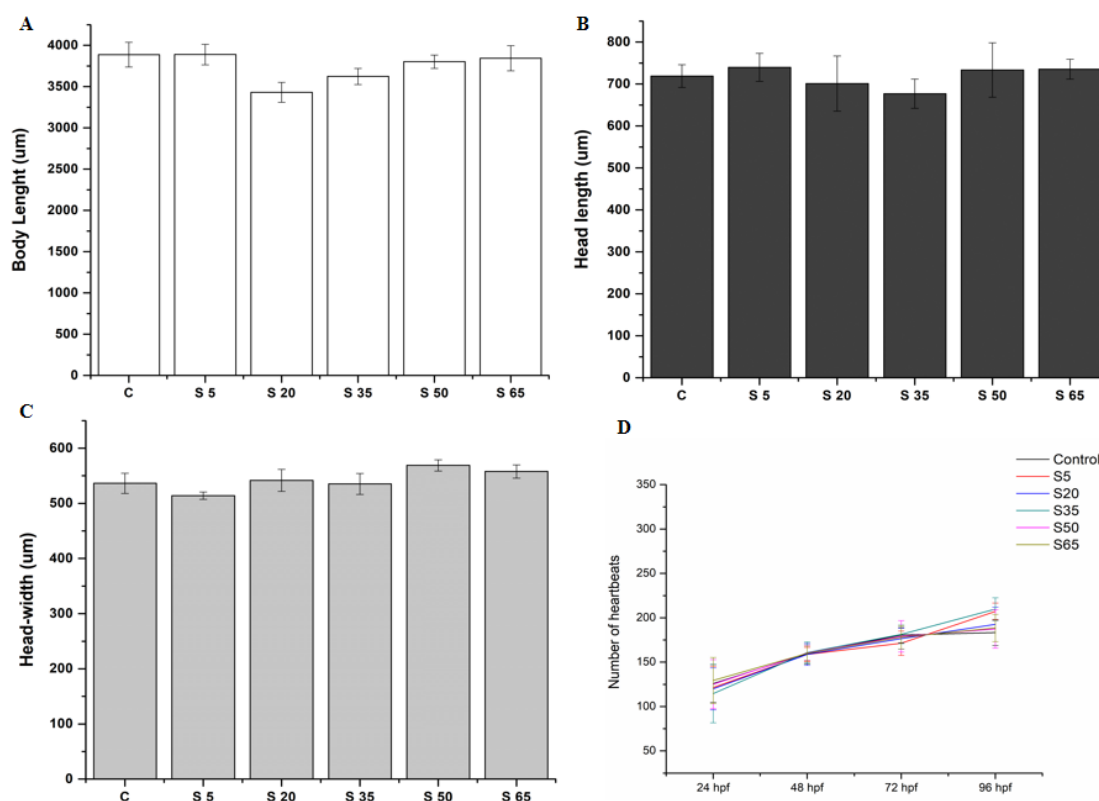


Figure 8. (A, B, C) Morphometry of zebrafish exposed to compound 3 at 96 hpf. Data are expressed as the mean \pm SD analyzed individually for each group compared to the control group using one-way ANOVA followed by Tukey's test. * = $p < 0.05$. One-way ANOVA results: Body length ($F(5, 22) = 3.40, p < 0.05$), Head-width ($F(5, 22) = 1.87, p > 0.05$), Head-length ($F(5, 22) = 1.02, p > 0.05$). (D) (Number of heartbeats). A heartbeat plot at 24 - 96 hpf reveals the same patterns of number of heartbeats between the zebrafish treated groups and control compared by two-way ANOVA (group ($F(5, 1272) = 1.86, p = 0.09$) and time ($F(3, 1272) = 915.26, p < 0.001$)). In all groups, the number of heartbeats increased with time. Legend: C - control; S5-S65 - compound 3 at 5-65 $\mu\text{g/L}$.

4. Discussion

In silico tests showed which molecules are active and inactive for the MCF7 cell line, with predictive values of sensitivity and specificity. Compounds 3 and 6 expressed the highest predictive values for the analyzed parameters and were selected for *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity tests. Several different types of *in silico* methods have been developed and applied in the academic and pharmaceutical industry to model the development of pharmacodynamic, pharmacokinetic and toxicological hypothesis tests. These methods include databases, different types of quantitative methods between structure and activity (SAR / QSAR), pharmacophores (molecular subunits essential for primary molecular recognition that allow for the best supramolecular interactions between

a bioreceptor and a drug), homology models and others molecular modeling approaches, data mining, data analysis tools using computers, etc [49-52].

When exploring databases, for example, it is possible to remove various information that help in understanding the behavior of a certain group of compounds and it is possible to generate computational models that are used to predict the activity of molecules that lack experimental data, such as data from *in vitro* and *in vivo* assays [49-52].

The selenium (Se) is recognized as an essential micronutrient of the diet for mammals and for different classes of living organisms, including archaea, algae, bacteria and for many eukaryotes, plays a variety of roles associated with protection against reactive oxygen species (ROS), anticancer activity, regulation thyroid hormone, etc [53-56].

The compound 3 showed greater cytotoxicity in tumor cells (MCF7) compared to non-tumor cells (PBMC), so the compound showed a high rate of selectivity for tumor cells when compared to PBMC, with cytotoxic doses 21 times lower. The balance between the therapeutic activity and the toxic effects of a compound is an important parameter in the evaluation of its usefulness as a pharmacological agent. Thus, the compound may have the potential to be used in antiproliferative therapies [57].

Several studies report the chemopreventive effect of several compounds derived from selenium such as benzylselenocyanate, methylselenocysteine, selenocysteine, selenomethionine, ebselen, etc [58-65]. Selenomethionine was described as a low-toxic chemotherapeutic agent able to inhibit tumor growth in a model of colorectal carcinoma by downregulating the expression of the protein Bcl-xL, increasing the expression of Bax and Bad and activating caspase-9 (intrinsic apoptotic pathway) [66]. Selenomethionine has been described as an inhibitor of the viability of human prostate cancer cells [67].

The methylselenocysteine and selenocysteine have been extensively studied as chemopreventive agents. Methylselenocysteine holds effective potential as a chemopreventive agent especially against mammary tumorigenesis [68]. Unni et al (2005) proved that methylselenocysteine blocks multiple pathways in mouse mammary tumor cells *in vitro* [69].

Studies indicate that the anticancer activity of selenium is related to several mechanisms that include its effects on antioxidant defenses (selenzymes), programmed cell death (apoptosis), carcinogen detoxification, DNA repair, immune system, neo-angiogenesis, regulation of cell proliferation and tumor cell invasion [70-71].

In this study, we found that the compound was not able to activate the apoptotic pathway of cell death in any of the studied concentrations, contradicting findings in the literature that associates the use of selenium with the activation of the pathway of apoptotic death. Several *in vitro* studies have indicated that oxidative stress can be a factor involved in selenium-induced toxicity and apoptosis in different types of cells in culture [72-75].

A mechanistic study of *in vitro* anticancer activity of selenocystine further revealed that reactive oxygen species play a key role in the signaling pathway of selenocystine-mediated apoptosis in susceptible cancer cells [76]. Apoptosis triggered by selenocystine involves caspase-independent apoptosis and activates reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation. Bcl-2 family members regulated the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria to the cytosol, which translocated into nucleus and induced chromatin condensation and DNA degradation and finally resulted in apoptotic cell death [77].

Zebrafish (*Danio rerio*) is increasingly used as a model organism in biochemical, physiological and toxicological studies. Many genetic pathways involved in vertebrate development, cancer, diabetes and other conditions are evolutionally conserved and very similar to the pathways in mammals including humans. Short developmental span, relative easiness of genetic modifications and transparency of the larvae make zebrafish an attractive model organism for toxicological research [78-80]. Zebrafish are already an established model for evaluation of the toxicological impact of selenium compounds [81-82].

In addition, the fish genome has been sequenced and the comparison with that of humans reveals that 70% of human genes have a zebrafish counterpart and 82% of homology with human genes associated with diseases. This high rate of homology allows for the strategic application of this experimental model in the

evaluation of the toxicity of several compounds, since molecular mechanisms can be expected to interact with xenobiotics in similar ways [83].

The exposure to compound 3 at the studied concentrations did not induce mortality or significant teratogenic and morphometric effects in zebrafish when compared to the control, except for the dosage of 65 µg/L and time of 24 h. We also did not observe changes in the heart rate of the animals. Our results are similar to those presented by Arnold et al (2015) who evaluated the effects of selenate, selenite and L-selenomethionine in zebrafish embryos and did not observe detectable effects of increased mortality and deformations in relation to the control for the selenate and selenite [84].

In this study, we observed that the compound, at a concentration of 65 µg/L and within 24 hours, had significant mortality rates and teratogenic effects, when compared to the control. Our findings suggest that in the first 24 hours of development, zebrafish is more susceptible to the toxic effects of the compound at a concentration of 65 µg/L.

Kalishwaralal et al. (2016) when analyzing the toxicity of selenium nanoparticles (SeNP) in zebrafish and at concentrations of 5, 10, 15, 20, 25 mg/ml did not observe significant mortality at the lowest dosages (5–10 mg/mL). However exposure of these embryos to higher concentrations of SeNP (20 and 25 mg/mL) resulted in a significant percentage of mortality compared to the control group 96 h after fertilization (hpf). There were also no significant malformations (pericardial edema and tail malformation) at the lowest concentrations (5-10 mg/mL). Zebrafish embryos exposed to 15-25 mg/ml SeNPs induced several developmental abnormalities that were observed and documented at 96 hpf [85].

5. Conclusion

In this study we analyzed in silica, *in vitro* and *in vivo* 9 molecules derived from selenium for toxicity, for *in vitro* experiments we used the mammary adenocarcinoma lineage (MCF7) and for *in vivo* tests we used zebrafish. Our results *in silico* allowed to classify the molecules in active and inactive. The compounds 3 and 6 showed the best probabilities of activity prediction for MCF7.

In vitro toxicity tests, the compound 3 showed greater cytotoxicity in tumor cells (MCF7) compared to non-tumor cells (PBMC), so the compound showed a high rate of selectivity for tumor cells when compared to PBMC, with cytotoxic doses 21 times lower. The balance between the therapeutic activity and the toxic effects of a compound is an important parameter in the evaluation of its usefulness as a pharmacological agent. Among essential parameters in the development of new cancer drugs, the balance between therapeutic and toxicological effects is an important issue to be considered. Many drugs have cytotoxic activity, but are not selective only to tumor cells and may also affect non-tumor cells [95]. Thus, the compound 3 may have the potential to be used in antiproliferative therapies. Our results showed a predominance of necrosis and late apoptosis as possible causes of the decrease in the viability of cancer cells.

Our results *in vivo* showed that the compound did not cause mortality, nor significant teratogenic and morphometric effects during the first 96 hours post-fertilization, when compared to the control. We did not observe an increase or decrease in the heart rate of the animals, which suggests that the compound does not affect the heart system.

Our *in silico* tests have suggested that the selenium-derived compound under study can be tested as a potential molecule for the treatment of cancer, showing activity against MCF7 tumor cells. *In vitro* tests, the molecule responded quite satisfactorily, as it reduced the viability of tumor cells while preserving non-tumor cells. *In vivo*, the compound showed low toxicity, causing no mortality, teratogenic and morphological effects in animals, as well as no adverse effects on the cardiac system. Thus, our results suggest that selenium has significant pharmacological potential to act selectively against tumor cells, not being toxic for the early stages of animal development (zebrafish).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

6. Acknowledgments

The authors thank the research and administrative staff in the Federal Rural University of Pernambuco (Brazil) for their assistance.

Financial & competing interests disclosure

The authors acknowledge CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; 88887.122971/2016-00) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

7. References

1. LABUNSKYY, V. M.; D. L. HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev*, v.94, p.739–777, 2014.
2. VALDIGLESIAS, V. et al. *In vitro* evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch Toxicol*, v.84, p.337–351, 2010.
3. LOBANOV, A. V.; HATWELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochem Biophys Acta (general subjects)*, v.1790, p.1424–1428, 2009.
4. STOCK, T.; ROTHER, M. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. *Biochem Biophys Acta Gen Subj*, v.1790, p.1520–1532, 2009.
5. ARAIE, H.; SHIRAIWA, Y. Selenium utilization strategy by microalgae. *Molecules*, v.14, p.4880–4891, 2009.
6. FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v.37, p.211–228, 1997.
7. SHAMBERGER, R. J. Selenium in the environment. *Sci Tot Environ*, v.17, p.59–74, 1981.
8. FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signaling*, v.14, n.7, p.1337-1383, 2011.
9. DICKSON, R. C.; TOMLINSON, R. H. Selenium in blood and human tissues. *Clin Chim Acta*, v.16, p.311-321, 1967.
10. MEHDI, Y. et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, v.18, n.3, p.3292-3311, 2013.
11. WEEKLEY, C. M.; HARRIS, H. H. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chem Soc Rev*, v.42, p.8870–8894, 2013.

12. VINCETI, M.; WEI, E. T.; MALAGOLI, C.; BERGOMI, M.; VIVOLI, G. Adverse health effects of selenium in humans. *Rev Environ Health*, v.16, n.4, p.233–260, 2001.
13. CHEN, Y-C.; PRABHU, K. S.; MASTRO, A. M. Is selenium a potential treatment for cancer metastasis? *Nutrients*, v.5, n.4, p.1149–1168, 2013.
14. MARGARET, P. R. Selenium and human health. *Lancet*, v.379, n.9822, p.1256–1268, 2012.
15. WEEKLEY, C. M.; AITKEN, J. B.; FINNEY, L.; VOGT, S.; WITTING, P. K.; HARRIS, H. H. Selenium metabolism in cancer cells: the combined application of XAS and XFM techniques to the problem of selenium speciation in biological systems. *Nutrients*, v.5, n.5, p.1734–1756, 2013.
16. HINCHLIFFE, A. Molecular Modelling for Beginners. *Journal of Chemical Education*, v.81, n.11, 2004.
17. YOUNG, D. C. Computational drug design: A guide for computational and medicinal chemists. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, v. 14, 2009.
18. WILLETT, P. Chemoinformatics: a history. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*, v.1, p.46-58, 2011;
19. WILD, D. Introducing cheminformatics: an intensive self-guided study, 2nd ed., McGraw-Hill Open Publishing, 2013.
20. LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug Discovery – then and now. *Nat Rev Drug Discovery London*, v.3, n.10, p.853-862, 2004.
21. FERREIRA, F. G. et al. Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado. *Revista Eletrônica de Farmácia, Goiás*, v.6, n.1, p.14-24, 2009.
22. GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Revista Estudos Avançados, São Paulo*, v.24, n.70, p.81-98, 2010.
23. LIMA, J. S. et al. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro*, v.16, n.4, p.225-233, 2003.
24. CALDAS, C. Vida, morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa. *Cienc Cult*, [online], São Paulo, v.62, n.2, p.17-18, 2010.
25. ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. A. Review of Three-Dimensional *n Vitro* Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. *J Pharm Sci*, v.100, n.1, p.59.74, 2011.
26. BARBOSA, B. S. et al. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma revisão. *Rev Bras Hig Sanid Anim*, v.2, n.2, p.334-347, 2015.

27. NEWSAM, J. M. et al. Screening soft materials for their effect on skin barrier function by high throughput experimentation. *J Mater Chem*, v.15, n.30, p.3061–3068, 2005.
28. TRAKA, M. H.; MITHEN, F. R. Plant science and human nutrition: challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. *Plant Science and Human Nutrition*, v.23, p.2483 – 2497, 2011.
29. SACHANA, M.; HARGREAVES, A. J. Toxicological Testing: *In Vivo* and *In Vitro* Models. *Veterinary Toxicology*, p.145–161, 2018.
30. MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discovery*, v.8, n.12, p.959–968, 2009.
31. CASSAR, S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem Res Toxicol*, v.33, p.95–118, 2020.
32. SOUZA, H. D. S.; SOUSA, R. P. F.; LIRA, B. F.; VILELA, R. F.; BORGES, N. H. P. B.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. D.; LIMA, E. O.; JARDIM, J. U. G.; SILVA, G. A. T.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synthesis, *in silico* study and antimicrobial evaluation of new selenoglycolicamides. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.30, p.188-197, 2019.
33. MURATOV, E. N.; ARTEMENKO, A. G.; VARLAMOVA, E. V. et al. Per aspera ad astra: application of Simplex QSAR approach in antiviral research. *Fut Med Chem*, v.2, n.7, 1205–1226, 2010.
34. SILVA, L. M.; ALVES, M. F.; SCOTTI, L.; LOPES, W. S.; SCOTTI, M. T. Predictive ecotoxicity of MoA 1 of organic chemicals using *in silico* approaches. *Ecotoxicol Environ Saf*, v.153, p.151–159, 2018.
35. FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *J Chem Inf Model*, v.50, n.7, p.1189–1204, 2010.
36. BREIMAN, L. Random forests. *Mach Learn Springer, USA*, v.45, n.1, p.5–32, 2001.
37. HALL, M.; FRANK, E.; HOLMES, G.; PFAHRINGER, B.; REUTEMANN, P.; WITTEN, I. H. The WEKA data mining software: an update. *SIGKDD Explor*, v.11, n.1, p.10–18, 2009.
38. HANLEY, J. A.; MCNEIL, B. J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, v.143, n.1, p.29–36, 1982.
39. FERNANDES, A. P.; GANDIN, V. Selenium compounds as therapeutic agents in Cancer. *Biochim Biophys Acta*, v.1850, n.8, p.1642–1660, 2015.
40. MOUSINHO, K. C. Estudo do potencial anticâncer de um derivado de chalcona, 1-(4-Nitrofenil)-3-fenilprop-2-em-1-ona, *in vitro* e *in vivo*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2010.

41. OECD. 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en>. Acesso em: 17 dez. 2020.
42. WESTERFIELD, M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), 4th ed. University of Oregon Press, Eugene, OR, 2000.
43. BITTENCOURT, T. Q. M. et al. Efeitos tóxicos de compostos de vanádio sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*). Arq Bras Med Vet Zootec, v.70, n.6, p.1877-1886, 2018.
44. YANG, Y. et al. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). J Hazard Mater, v.307, p.127–136, 2016.
45. JONAS, A.; SCHOLZ, S.; FETTER, E.; SYCHROVA, E.; NOVAKOVA, K.; ORTMANN, J.; BENISEK, M.; ADAMOVKY, O.; GIESY, J. P.; HILSCHEROVA, K. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular *in vitro* and zebrafish embryo assays. Chemosphere, v.120, p.321-327, 2015.
46. LUIS, J. A. S.; SOUZA, H. D. S.; LIRA, B. F. et al. Combined structure-and ligand-based virtual screening aiding discovery of selenoglycolicamides as potential multitarget agents against Leishmania species. J Mol Struct, 1198, 126872, 2019.
47. RAYMAN, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. Proc Nutr Soc, v.64, n.4, p.527–542, 2005.
48. HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods, v.42, n.4, p.377–387, 2007.
49. COOK, D. Improving drug safety using computational biology. IDrugs, v.13, p.85–89, 2010.
50. MERLOT, C. Computational toxicology – a tool for early safety evaluation. Drug Discov Today, v.15, p.16–22, 2010.
51. FOURCHES, D. Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine; Gorb, L., Kuz'min, V., Muratov, E., eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, cap.16, 2014.
52. GASTEIGER, J. Chemoinformatics: achievements and challenges, a personal view. Molecules. v.21, n.2, 2016.
53. DONALDSON, M. S. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. Nutr J, v.3; p.1–21, 2004.
54. WEI, W. Q.; ABNET, C. C.; QIAO, Y. L.; DAWSEY, S. M.; DONG, Z. W.; SUN, X. D.; FAN, J. H.; GUNTER, E. W.; TAYLOR, P. R.; MARK, S. D. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia

cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am J Clin Nutr*, v.79, p.80–85, 2004.

55. TRUMBO, P. R. The level of evidence for permitting a qualified health claim: FDA's review of the evidence for selenium and cancer and vitamin E and heart disease. *J Nutr* v135, p.354–356, 2005.

56. CZECZOT, H.; SCIBIOR, D.; SKRZYCKI, M.; PODSIAD, M. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Acta Biochim Pol* 53:237–241, 2006.

57. NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol*, v.85, p.1313–1359, 2011.

58. FOILES, P. G.; MIGLIETTA, L.; DOLAN, L. R.; EL-BAYOUMY, K.; RONAI, Z. Modulation of carcinogen-induced polyoma dna-replication by organoselenium and organosulfur chemopreventive agents. *Int J Oncol* 2:413–418, 1993.

59. FOILES, P.G.; FUJIKI, H.; SUGANUMA, M.; OKABE, S.; YATSUNAMI, J.; MIGLIETTA, L. M.; UPADHYAYA, P.; EL-BAYOUMY, K.; RONAI, Z. Inhibition of pkc and pka by chemopreventive organoselenium compounds. *Int J Oncol*, v.7, p.685–690, 1995.

60. FIALA, E. S.; JOSEPH, C.; SOHN, O. S.; EL-BAYOUMY, K.; REDDY, B. S. Mechanism of benzylselenocyanate inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res*, v.51, p.2826–2830, 1991.

61. NAYINI, J.; EL-BAYOUMY, K.; SUGIE, S.; COHEN, L. A.; REDDY, B. S. Chemoprevention of experimental mammary carcinogenesis by the synthetic organoselenium compound, benzylselenocyanate, in rats. *Carcinogenesis*, v.10, p.509–512, 1989.

62. GANTHER, H. E.; IP, C. Thioredoxin reductase activity in rat liver is not affected by supranutritional levels of monomethylated selenium *in vivo* and is inhibited only by high levels of selenium *in vitro*. *J Nutr*, v.131, p.301–304, 2001.

63. TIANFENG, C.; YUM-SHING, W. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother*, v.63, p.105–113, 2009.

64. YANG, Y.; HUANG, F.; REN, Y.; XING, L.; WU, Y.; LI, Z. S.; PAN, H. Z.; XU, C. M. The anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice. *Oncol Res*, v.18, p.1–8, 2009.

65. YANG, C. F.; SHEN, H. M.; ONG, C. N. Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch Biochem Biophys*, v.374, p.142–152, 2000.

66. YANG, Y.; HUANG, F.; REN, Y.; XING, L.; WU, Y.; LI, Z. S.; PAN, H. Z.; XU, C. M. The anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice. *Oncol Res*, v.18 p.1–8, 2009.
67. PINTO, J. T.; SINHA, R.; PAPP, K.; FACOMPRES, N. D.; DESAI, D.; EL-BAYOUMY, K. Differential effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on biomarkers in androgen responsive and androgen independent human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer*, v.120, p.1410–1417, 2007.
68. IP, C.; GANTHER, H. E. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. *Carcinogenesis*, v.13, p.1167–1170, 1992.
69. UNNI, E.; SINGH, U.; GANTHER, H. E.; SINHA, R. Se-methylselenocysteine activates caspase-3 in mouse mammary epithelial tumor cells *in vitro*. *Biofactors*, v.14, p.169–177, 2001.
70. WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Brit J Nutr*, v.91, p.11–28, 2004.
71. ZENG, H.; COMBS, G. F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem*, v.19, p.1–7, 2008.
72. KITAHARA, J.; SEKO, Y.; IMURA, N. Possible involvement of active oxygen species in selenite toxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol*, v.67, p.497–501, 1993.
73. SHEN, C. L.; SONG, W.; PENCE, B. C. Interactions of selenium compounds with other antioxidants in DNA damage and apoptosis in human normal keratinocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.10, p.385–390, 2001.
74. KIM, E. H.; SOHN, S.; KWON, H. J.; KIM, S. U.; KIM, M. J.; LEE, S. J.; CHOI, K. S. Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Can Res*, v.67, p.6314–6324, 2007.
75. XIANG, N.; ZHAO, R.; ZHONG, W. X. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Can Chem Pharmacol*, v.63, p.351–362, 2009.
76. TIANFENG, C.; YUM-SHING, W. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother*, v.63, p.105–113, 2009.
77. CHEN, T.; WONG, Y. S. Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. *Int J Biochem Cell Biol*, v.41, p.666–676, 2009.

78. SCHLEGEL, S.; GUT, P. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. *Cell Mol Life Sci*, v.72, p.2249–2260, 2015.
79. BARRIUSO, J.; NAGARAJU, R.; HURLSTONE, A. Zebrafish: A new companion for translational research in oncology. *Clin Cancer Res*, v.21, p.968–975, 2015.
80. DOLGOVA, N. V.; HACKETT, M. J.; MACDONALD, T. C.; NEHZATI, S.; JAMES, A. K.; KRONE, P. H.; GEORGE, G. N. AND PICKERING, I. J. Distribution of selenium in zebrafish larvae after exposure to organic and inorganic selenium forms. *Metallomics*, v.8 n.3, p.304-312, 2016.
81. THOMAS, J. K.; JANZ, D. M. In ovo exposure to selenomethionine via maternal transfer increases developmental toxicities and impairs swim performance in F1 generation zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*, v.152, p.20–29, 2014.
82. THOMAS, J. K.; WISEMAN, S.; GIESY, J. P. AND JANZ, D. M. Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*, v.130–131, p.112–122, 2013.
83. HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v.496, n.7446, p.498–503, 2013.
84. ARNOLD, M. C.; FORTE, J. E.; OSTERBERG, J. S.; DI GIULIO, R. T. Antioxidant rescue of selenomethionine-induced teratogenesis in zebrafish embryos. *Arch Environ Contam Toxicol*, v.70, p.311-320, 2015.
85. KALISHWARALAL, K.; JEYABHARATHI, S.; SUNDAR, K.; MUTHUKUMARAN, A. A novel one-pot green synthesis of selenium nanoparticles and evaluation of its toxicity in zebrafish embryos. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v.44, n.2, p.471-477, 2016.

5. CONCLUSÃO

Nossos testes *in silico* sugeriram que o composto derivado do selênio em estudo apresentou atividade frente as linhagens cancerígenas de HL-60 e MCF7 analisadas e pode ser testado como uma molécula potencial para o tratamento do câncer. Nos testes *in vitro*, a molécula respondeu de forma bastante satisfatória, pois reduziu a viabilidade das células tumorais e preservou as células não tumorais, sugerindo que o composto em estudo tem potencial farmacológico significativo para atuar seletivamente contra as células tumorais, induzindo eventos moleculares e celulares que culminam na morte das células tumorais. *In vivo*, o composto apresentou baixa toxicidade, não causando mortalidade, efeitos teratogênicos e morfológicos em animais, bem como nenhum efeito adverso no sistema cardíaco. Assim, nossos resultados sugerem que o selênio tem potencial farmacológico significativo para atuar seletivamente contra as células tumorais, não sendo tóxico para as fases iniciais do desenvolvimento no modelo animal utilizado - peixe-zebra.

ANEXO**ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO**

Future Medicinal Chemistry

Future Medicinal Chemistry

Virtual screening and assessment of anticancer potential of selenium-based compounds against HL-60 and MCF7 cells

Journal:	<i>Future Medicinal Chemistry</i>
Manuscript ID	FMC-2020-0110
Manuscript Type:	Research Article
Keywords:	Selenoglycolicamides, Organoselenium, Virtual Screening, HL-60 cells, MCF7 cells, anticancer activity

SCHOLARONE™
Manuscripts