UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GIOVANA BICUDO GOMES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE SELÊNIO-COMPOSTOS EM MODELO TRIDIMENSIONAL DE CÂNCER DE CÓLON *IN VITRO*

CAMPO GRANDE – MS
2024

GIOVANA BICUDO GOMES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE SELÊNIO-COMPOSTOS EM MODELO TRIDIMENSIONAL DE CÂNCER DE CÓLON *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como parte das exigências para a obtenção do título de Doutorado.

Orientadora: profa. Dra. Renata Perdomo Trentin

CAMPO GRANDE – MS
2024

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

ATA DE DEFESA DE TESE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DOUTORADO

Aos vinte e sete dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e quatro, às oito horas, na Google Meet, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Renata Trentin Perdomo (UFMS), Ana Rita Coimbra Motta de Castro (UFMS), DANIELE BRUSTOLIM (UFBA), Danielle Bogo (UFMS) e Euclesio Simionatto (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: GIOVANA BICUDO GOMES, CPF 02171871105, do Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE SELÊNIOCOMPOSTOS EM MODELO TRIDIMENSIONAL DE CÂNCER DE CÓLON IN VITRO" e orientação de Renata Trentin Perdomo. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dra. RENATA TRENTIN PERDOMO (Interno)

Dra. ANA RITA COIMBRA MOTTA DE CASTRO (Externo)

Dra. DANIELE BRUSTOLIM (Externo)

Dr. EUCLESIO SIMIONATTO (Externo)

Dra. DANIELLE BOGO (Externo)

Dr. ADRIANO CESAR DE MORAIS BARONI (Interno) (Suplente)

Dra. SIMONE SCHNEIDER WEBER (Externo) (Suplente)

RESULTADO FINAL: Aprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença

Assinaturas:

Documento assinado eletronicamente por **Danielle Bogo**, **Professora do Magistério Superior**, em 03/07/2024, às 19:53, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Renata Trentin Perdomo**, **Professora do Magistério Superior**, em 03/07/2024, às 21:38, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Euclésio Simionatto**, **Usuário Externo**, em 05/07/2024, às 19:20, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Ana Rita Coimbra Motta de Castro**, **Professora do Magistério Superior**, em 06/07/2024, às 08:20, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Giovana Bicudo Gomes**, **Usuário Externo**, em 08/07/2024, às 20:22, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4933047** e o código CRC **91208658**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.016277/2022-13 SEI nº 4933047

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus queridos familiares, e principalmente à minha avó Anália (*in memoriam*) que sempre foi um fenômeno de simpatia e alegria.
Ao meu tio Canísio que superou seu câncer de cólon em plena pandemia.

AGRADECIMENTOS

À Deus e às sete linhas da umbanda por minha constante evolução como ser humano, pelas maravilhas e pela força que me guia.

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela estrutura e possibilidades de sempre ampliar meus conhecimentos.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul da FACFAN (UFMS) e a todos os professores credenciados pela oportunidade de evoluir pessoal e profissionalmente.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul pela bolsa concedida. Aos órgãos de fomento Fundect, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Dra. Renata Trentin Perdomo pelo apoio, acolhimento e confiança. Todos esses anos de convivência e aprendizado, obrigada pela oportunidade e amizade.

À professora Dra. Mônica Cristina Toffoli Kadri pela gentileza em todas as vezes que necessitei de seu auxílio e apoio.

Ao Dr. Jamal Rafique, Dra. Saba Simbal e Dr. Eduardo Benedetti Parissoto pelo fornecimento dos compostos utilizados e pela parceria na pesquisa.

Ao Laboratório de Cultura de Celular Avançado, onde desenvolvi meu trabalho.

Ao Laboratório Multiuso do LAC, onde desenvolvi as análises de microscopia fluorescente.

Ao Laboratório Multiuso da FAMEZ, onde foi permitido o uso do citômetro de fluxo. Agradeço a técnica Bianca Acácio pela disponibilidade e auxílio nas leituras de citometria.

Aos membros da banca de qualificação por aceitarem participar e pelas contribuições, especialmente a Profa. Dra. Daniele Brustolim e a Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz pelo direcionamento e acolhimento.

Aos membros da banca de defesa pela participação, aos professores doutores Ana Rita Coimbra Motta de Castro, Daniele Brustolim, Danielle Bogo e Euclesio Simionatto pelas importantes contribuições, interesse e disponibilidade.

Aos meus familiares pelo amor e apoio – minha mãe Dora Maria, minha tia Julieta. Meu tio Canísio, minha prima Josane por todo suporte de uma vida inteira.

Aos amigos que me alegram e me fortalecem a cada dia – Angel, Dabson, Ed, João Paulo, Karen, Karoline, Luca, Rasleny, Renata, Suny e Zuza.

Às empresas que me acolheram e acreditaram no meu potencial Oxisolda, Diagnolab e MS saúde. Aos colegas de trabalho que torceram por mim, meu muito obrigada.

RESUMO

O selênio apresenta importante função antioxidante que se relaciona em prevenção celular, proteção cardíaca, reprodução, controle metabólico de hormônios, suporte cognitivo, além de efeito farmacológico anticâncer e anti-inflamatório. A ação destes compostos de selênio nas vias metabólicas gera a intensificação de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio que refletem no aumento da peroxidação e a reatividade destes subprodutos metabólicos favorece eventos de morte celular. Neste estudo a atividade antiproliferativa *in vitro* nas linhagens de células de câncer de cólon (Caco-2 e HT-29) cultivadas em monocamada e em modelo tridimensional foi analisada após tratamento com concentrações dos compostos de selênio com núcleo de atividade biológica indólicos e outro composto imidazo-pirimidínico, denominados respectivamente MRK-104 e MRK-107. Através de metodologias colorimétrica, enzimática, fluorescência e turbidimetria foi possível a identificação, avaliação e diferenciação de diversas características celulares que permeiam a via de sinalização intrínseca de apoptose e estresse oxidativo. As respostas antiproliferativas dos selênio-compostos nas linhagens de câncer de cólon Caco-2 e HT-29 no tempo de 48 horas pelo teste colorimétrico de sulforrodamina B apresentam GI_{50} de 1,1-13 μM, para MRK-104 e MRK-107, de forma seletiva pois não apresentaram efeito antiproliferativo em fibroblastos humanos imortalizados (GI_{50} em HFF1 > 635 μM). As células de cólon no modelo 3D, marcadas com agente fluorescente de DNA, nas concentrações de tratamento de GI_{50} e o dobro da concentração de GI_{50} dos selênio-compostos em 48 horas induziram parada de ciclo celular na fase G0/G1 em ambas linhagens de 72,15% (Caco-2) a 89,12% (HT-29). Além disso, os Se-compostos ativam caspase-3 em 24 horas e provocam perturbações da homeostase redox que indicam danos de membrana celular e fragmentação de DNA pela reação de peroxidação lipídica no ensaio de TBARS. Os compostos demonstraram atividade antiproliferativa e seletiva, demonstrando potencial para continuidade dos estudos visando atividade anticâncer.

Palavras Chaves: morte celular, selênio-compostos, esferoide, câncer

ABSTRACT

Selenium has an important antioxidant function that is related to cellular prevention, cardiac protection, reproduction, metabolic control of hormones, cognitive support, in addition to anti-cancer and anti-inflammatory pharmacological effects. The action of these selenium compounds on metabolic pathways generates the intensification of reactive species to oxygen and nitrogen, which results in increased peroxidation and the reactivity of these metabolic by-products favors cell death events. In this study, the in vitro antiproliferative activity in colon cancer cell lines (Caco-2 and HT-29) cultivated in a monolayer and in a three-dimensional model was analyzed after treatment with concentrations of selenium compounds with an indole core of biological activity and another compound imidazo-pyrimidine, respectively called MRK-104 and MRK-107. Through colorimetric, enzymatic, fluorescence and turbidimetry methodologies, it was possible to identify, evaluate and differentiate several cellular characteristics that permeate the apoptosis and oxidative stress signaling pathway. The antiproliferative responses of selenium compounds in colon cancer lines Caco-2 and HT-29 within 48 hours by the sulforhodamine B colorimetric test show GI_{50} of 1.1-13 μM, for MRK-104 and MRK-107, of selectively as they did not present an antiproliferative effect on immortalized human fibroblasts (GI_{50} in HFF1 > 635 μM). Colon cells in the 3D model, labeled with fluorescent DNA agent, at treatment concentrations of GI_{50} and double the GI_{50} concentration of selenium compounds at 48 hours induced cell cycle arrest in the G0/G1 phase in both cell lines 72.15% (Caco-2) to 89.12% (HT-29). Furthermore, Se-compounds activate caspase-3 within 24 hours and cause disturbances in redox homeostasis that indicate cell membrane damage and DNA fragmentation by the lipid peroxidation reaction in the TBARS assay. The compounds demonstrated antiproliferative and selective activity, demonstrating potential for continuing studies aimed at anticancer activity.

Keywords: cell death, selenium-compounds, spheroid, cancer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Progressão tumoral do câncer de cólon pela mutação da proteína APC..24
Figura 2. Microscopia óptica de culturas únicas de Caco-2 e HT-29 após 24 horas (Barra de escala: 20 μm).....25
Figura 3. Sinalização oncogênica com alterações de CCR heterocelulares com ampla gama de opções de sinalização. 27
Figura 4. Esquema das fases do ciclo celular e marcadores do ciclo celular.....28
Figura 5. Comunicação celular múltipla no epitélio colônico e no adenocarcinoma do cólon com interações ativadas entre células heterotípicas. 30
Figura 6. Características de culturas 3D representadas por esferoides tumorais. 32
Figura 7. Vias que oferecem locais potenciais para terapia direcionada ao câncer colorretal.....34
Figura 8. Efeito do nível elevado de EROS em células normais e cancerígenas.....37
Figura 9. A sequência do processo apoptótico avaliado via quimioluminescência....39
Figura 10. Mecanismos de mortes celulares não canônicas mais evidenciados em células de câncer de cólon. 40
Figura 11. Biotransformação da doxorrubicina, majoritariamente metabolizada a doxorrubicinol pelas enzimas carbonil redutase 1 e 3 (CBR1, CBR3). 42
Figura 12. Efeitos pró-oxidativos e alvos a jusante dos compostos de selênio. 44
Figura 13. Estrutura de indol e imidazol. Ao protonar o indol é convertido de um composto aromático para um antiaromático, o que não ocorre no caso do imidazol. 46
Figura 14. Calcogenação indol e a imidazo[1,2-a]piridina catalisado por KIO_3 a 100°C por 12 horas. 48
Figura 15. Selênio-compostos, fórmula, peso molecular e suas estruturas. 49
Figura 16**.** Análise regressiva não-linear do ensaio de SRB em células de câncer de cólon, Caco-2 e HT-29 tratadas com Se-compostos (MRK-104 e MRK-107) no tempo de 48h nas concentrações de 0,1;1;10 e 100 μM (*** p < 0,0001). 60
Figura 17. Índice de seletividade obtido na cultura de monocamada entre a citotoxicidade encontrada nas linhagens HFF-1 e NHI/3T3 no tratamento de MRK-104 e MRK-107 em 48h. Os resultados são apresentados como média ±DP (* p <0,05, ** p<0,001, *** p < 0,0001), ns= não há significância). 61

Figura 18. Ensaio de viabilidade e recuperação celular de MRK-104 e MRK-107 nas linhagens Caco-2 e HT-29 (0,1-919 μM) em 48h foi lavado e após 48h comparado com a viabilidade celular de 48 h; porcentagem de viabilidade das células Caco-2 e HT-29 após tratamento c com MRK-104 e MRK-107 em 48 h; (* p <0,05, ** p<0,001, *** p < 0,001). 62
Figura 19. Morfologia da linha celular Caco-2 após 48 horas de cultivo em meio de crescimento contendo os tratamentos com MRK-104, MRK-107, DOX e NT. Ampliação de 1000x. 63
Figura 20. Morfologia da linha celular HT-29 após 48 horas de cultivo em meio de crescimento contendo os tratamentos com MRK-104, MRK-107, DOX e NT. Ampliação de 1000x. 64
Figura 21. Ensaio de sobrevivência clonogénica (A) após tratamento de células Caco-2 com GI_{50} e 2x GI_{50} de MRK-104 e MRK-107. (B) Gráfico de colônias coradas com cristal violeta e quantificadas pelo ImageJ. Os valores são representados como a média ± DP (*** p <0,0001, relativo ao grupo controle). 65
Figura 22. Monitoramento baseado em imagem da cicatrização de feridas em tempo 0 e 3 dias após o tratamento de 48h com MRK-104 (11,4 e 22,8 μM/13 e 26 μM), MRK-107 (2,4 e 4,8 μM/ 1,13 e 2,26 μM), Doxorrubicina (3,68 μM) e não tratado nas linhagens Caco-2 e HT-29 com 1,5x 10^6 células em cada um dos 12 poços. 66
Figura 23. Ensaios de estresse oxidativo com DCFH-DA nas linhagens Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h. 68
Figura 24. Ensaios de caspase 3 e 7, Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 24 h. Ampliação de 50x. 69
Figura 25. Ensaios de quantificação de morte celular pelo kit Anexina V e IP nas linhagens Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 24 h. MRK-104 (11,4 e 22,8 μM/13 e 26 μM), MRK-107 (2,4 e 4,8 μM/ 1,13 e 2,26 μM), Doxorrubicina (3,68 μM) e não tratado nas linhagens Caco-2 e HT-29 com 5 x 105 células em cada poço. 70
Figura 26. Ensaio de morte celular com coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo em resposta aos compostos MRK-104 e MRK-107 em monocamada de células Caco-2 e HT-29 o grupo controle negativo (células viáveis): o núcleo circular uniformemente distribuído no centro da célula. MRK-104, MRK-107 e DOX (células apoptóticas precoces): o núcleo mostrou fluorescência verde-amarelada. (A) Corante

LA/BE na linhagem Caco-2 após tratamento de 48 h. (B) Corante LA/BE na linhagem HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h. 72
Figura 27. Moldes 3D de agarose micromoldada em placa de 12 poços e sua densidade celular ao ser semeada.....73
Figura 28. Padronização da cultura em moldes de esferoides até atingir interação célula-célula/ célula-matriz. 73
Figura 29. Cultura em monocamada e em moldes de esferoides na linhagem Caco-2 tratadas com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e 2xGI_{50}, Dox e células não tratadas.....74
Figura 30. Índice de esfericidade de cultura em moldes de esferoides na linhagem Caco-2 tratadas com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e os dobros da GI_{50}, Dox e células não tratadas. (* p <0,05, ** p<0,001, *** p < 0,0001).....74
Figura 31. Marcador de estresse oxidativo quantificado por TBARS (nmol/mg) em esferoides tratados com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e os dobros da GI_{50}, Dox e células não tratadas nas linhagens celulares Caco-2 e HT-29.....75
Figura 32.Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em esferoides tratados com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e os dobros da GI_{50}, Dox e células não tratadas nas linhagens celulares Caco-2 e HT-29. 76
Figura 33. Quantificação da atividade de caspase-3 analisado por citometria de fluxo nas linhagens Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-107, DOX e NT em 24 h. 77
Figura 34. Ensaio de morte celular com coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo em resposta aos compostos MRK-104, MRK-107, DOX e controle negativo em esferoides de células Caco-2 e HT-29. 78
Figura 35. Viabilidade celular de esferoides de acordo com a intensidade de fluorescência em RGB da coloração pelo ensaio com LA/BE. 79
Figura 36. Ensaios de anexina V e PI em células Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h em modelos 2D e 3D. 80
Figura 37. Ensaios de anexina V e PI em células Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h em modelos 2D e 3D. 80
Figura 38. Diagrama esquemático do tratamento de Caco-2 e HT-29, onde os Se-compostos aumentam os níveis de estresse oxidativo, permeabilidade celular e desencadeiam processos antiproliferativos.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. A atividade antiproliferativa dos Se-compostos contra um painel de linhagens celulares pelo ensaio de Sulforrodamina B após tratamento de 48 horas. 59
Tabela 2. Índice de seletividade obtido na cultura de monocamada entre a atividade antiproliferativa encontrada nas linhagens HFF-1, NHI/3T3, Caco-2, HT-29 e HepG2 no tratamento de Selênio-compostos em 48h. Os resultados são apresentados como média ±DP.....60
Tabela 3. Índice de proliferação celular em Caco-2 e HT-29 em 48h de tratamento com GI_{50} e DGI_{50} de MRK-104 e MRK-107, DOX e não tratados; (a) = $p < 0,001$ em comparação ao grupo de controle negativo. 67

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do Índice de Seletividade. 51
Equação 2. Cálculos do Índice de Esfericidade. 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC Proteína polipose adematosa

ATP Adenosina tri fosfato

BCL-2 Linfoma de células B2

Ca^{++} Cálcio

CAT Catalase

CCR câncer de cólon

CDKs quinases dependentes de ciclinas

C-erbB2 Oncogene membro da família dos fatores de crescimento epidérmico

CN Controle negativo

CKIS proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclinas

DCC Receptor de netrina gene supressor de câncer colorretal

DMSO Dimetilsulfóxido

DMEM Meio essencial mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DOX Doxorrubicina

EROs Espécies reativas de oxigênio

Fe^{++} Ferro

FITC fluorocromo isotiocianato de fluoresceína

GI50 Concentração em que há 50% da inibição de proliferação celular e desconsidera o tempo zero de crescimento celular

GPX glutationa peroxidase

GSH Glutationa reduzida

HO• Radical hidroxil

HOCl Hipoclorito

H_2O Água

H_2O_2 Peróxido de hidrogênio

IS Índice de seletividade

IP's estruturas imidazo[1,2-a]piridina

IP índice de proliferação marcado por ki-67

PI Iodeto de propídeo

Ki-67 antígeno humano codificado pelo gene MKI67

K-RAS proteína iniciadora na transdução de sinal para proliferação

Log Fase exponencial

MAPK Proteína quinase específica ativada por mitogênio

MDA Malondialdeído

MEC Matriz extracelular

MMPs Metaloproteinases de matriz

MOMP Permeabilização da membrana externa mitocondrial

MPO Mieloperoxidase

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

$NO2^{+}$ Nitronio

NRTKs Não receptoras tirosina-quinases

$^{\bullet}NO$ Óxido nítrico

$O = NOOCO_2^{-}$ Nitrato de nitrosoperoxicarbonato

O_2 Oxigênio molecular

$O_2^{\bullet}$ Ânion superóxido

O_3 Ozônio / trioxigênio

$^{\bullet}OH$ Radical Hidroxil

ONO Peroxinitrito

O_2NOCO_2- Nitrocarbonato anion

PBS Solução salina fosfatada

PC Proteína Carbonilada

P21 Proteína reguladora da transição entre fase G1 para S do ciclo celular

P27 inibidor de KIP1, atua inibindo CDKs

P53 gene supressor tumoral

PDGF Receptor de fator de crescimento mediado por plaquetas

Rb Proteína do retinoblastoma

$RO^{\bullet}$ Radicais alcoxil

ROOH Hidroperóxidos orgânicos

ROS Radicais sulfonil

RPMI 1640 Roswell Park Memorial Institute 1640

RTKs Receptoras tirosina-quinases

SFB Soro fetal bovino

SOD Superóxido dismutase

SRB Sulforrodamina B

TBA Ácido tiobarbitúrico

TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA Ácido Tricloro Acético

TME Transição mesenquimal epitelial

TNF α Fator de necrose tumoral

T0 Tempo zero de tratamento

$^1O_2$ Oxigênio singlete

2D bidimensional ou monocamada

3D Tridimensional

7AA-D 7 Aminoactinomicina D

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21
2. REVISÃO DA LITERATURA 23
   2.1. Câncer de cólon 23
   2.2. Linhagens celulares Caco-2 e HT-29 24
   2.3. Marcadores moleculares 26
      2.3.1. Direcionamento de análise 26
      2.3.2. Índice de proliferação 27
   2.4. Ciclo celular 29
   2.5. Microambiente tumoral 29
   2.6. Cultura celular 3D 31
   2.7. Quimioterapia ao CCR 33
   2.8. Seletividade 34
   2.9. Estresse oxidativo 35
   2.10. Morte celular 37
   2.11. Doxorrubicina 41
   2.12. Selênio e metabólitos 43
   2.13. Histórico dos compostos pirimidínicos 45
3. OBJETIVOS 47
   3.1. OBJETIVO GERAL 47
   3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 47
4. MATERIAL E MÉTODOS 48
   4.1. Síntese de MRK-104 e MRK-107 48
   4.2. Reagentes químicos, anticorpos, células e equipamentos 48
   4.3. Preparo das amostras 49
   4.4. Linhagens celulares 49
   4.5. Citotoxicidade em monocamada (2D) 50
   4.6. Cálculo do índice de seletividade (IS) 51
   4.7. Recuperação/Reversibilidade pelo ensaio de SRB 51
   4.8. Observação da morfologia das células 52
   4.9. Ensaio clonogênico 52
   4.10. Ensaio de cicatrização 52
   4.11. Marcação com ki-67 53
   4.12. Marcação com 2',7' diacetato de diclorofluoresceína 53

4.13. Marcação com Caspase 3/7 54
4.14. Marcação com Laranja de acridina e iodeto de propídeo 54
4.15. Anexina V FITC....54
4.16. Geração e tratamento de esferoides....55
4.17. Índice de esfericidade na linhagem Caco-2 55
4.18. Atividade antiproliferativa em modelo de cultura de células tridimensional (3D) 56
4.19. Ciclo celular 56
4.20. Caspase-3 (filtro PE)....57
4.21. Marcadores de estresse oxidativo 57
4.21.1. Marcador de dano oxidativo por lipoperoxidação 58
4.22. Análise estatística 58
5. RESULTADOS 59
5.1. Atividade antiproliferativa dos Se-compostos para as linhagens celulares ..59
5.2. Índice de seletividade....60
5.3. Viabilidade/Recuperação 61
5.4. Observação da morfologia das células 62
5.5. Ensaio clonogênico 64
5.6. Ensaio de migração (cicatrização de feridas)....65
5.7. Índice de proliferação (KI-67) 67
5.8. Estresse oxidativo 67
5.9. Caspase 3 e 7 69
5.10. Análise de apoptose em monocamada 70
5.11. Morte celular por coloração diferencial LA/BE em monocamada....71
5.12. Padronização da cultura de células tridimensional com células de câncer de cólon Caco-2 e HT-29 73
5.13. Verificação de esfericidade na linhagem Caco-2 em 3D 74
5.14. Marcador de estresse oxidativo: TBARS em 3D....75
5.15. Ciclo celular em 3D....76
5.16. Caspase-3 em 3D 76
5.17. Morte celular por coloração diferencial LA/BE em 3D....78
5.18. Anexina V + FITC....79
5.19. Esquema de atividade dos compostos MRK-104 e MRK-107 80
6. DISCUSSÃO....82
7. PERSPECTIVAS 88
8. Conclusão....88

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO 89
REFERÊNCIAS 90
APÊNDICE A – Artigo submetido 117

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cólon (CCR) corresponde a 10% dentre todos os canceres em relação a incidência mundial, essa porcentagem é equivalente a mais de 1 milhão de novos casos ao ano e sua mortalidade acomete mais de 500 mil pessoas ao ano [1; 2]. A triagem dos pacientes é recomendada para evitar o aumento do diagnóstico de pólipos adenomatosos responsável por mais de 80% de novos casos que progridem para o câncer colorretal, pensando neste fato, a prevenção e diagnóstico precoce carece de melhores estratégias para adesão aos cuidados [3; 4; 5]. Uma vez diagnosticado, os estágios desse câncer permitem abordagens cirúrgicas, imunológicas e medicamentosas com uso de quimioterápicos [6]. Em relação à abordagem medicamentosa, há peculiaridades que contribuem para a maior efetividade, como o uso das terapias alvo dirigidas combinadas (politerapias) e o uso de quimioterápicos com estruturas químicas preferencialmente de pequenas moléculas devido a possibilidade de interações moleculares mais direcionadas [7; 8]. Há uma associação protetora entre selênio e o câncer colorretal, assim como ações indiretas com atividades biológicas importantes mediadas por selenoenzimas como a selenometionina, glutationa peroxidase, tiorredoxina redutase e iodotironina desiodases que mantém pesquisas na busca por novas moléculas atividades biológicas mais efetivas para a indústria farmacêutica [9; 10].

O selênio orgânico possui um limite de consumação e gera efeitos adversos caso , contudo é conhecido pelos efeitos antioxidante [11], anti-inflamatório [12], antimutagênico [13], anticarcinogênico [14], antivirais [15], antibacterianos [16] e antifúngicos [17; 18]. Os efeitos quimiopreventivo são relacionados às selenoproteínas e os compostos de selênio por possuírem funções vitais, capacidade quimiopreventiva associada a suas propriedades antioxidantes diretas ou indiretas que sustentam o status redox intracelular para proteção de células saudáveis diante de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio (EROS) [19].

Estas EROS formam metabólitos que podem induzir a formação de canceres ao alcançar um determinado nível no organismo, no entanto, há níveis benéficos e responsáveis por papéis importantes na regulação de muitas funções biológicas [20]. Os níveis elevados podem aumentar a vulnerabilidade das células cancerígenas a vários indutores e então maximizar o efeito anticâncer por múltiplas vias devido a um estímulo no metabolismo da glicose, disfunção mitocondrial e atividade oncogênica [21;

[22]. É importante encontrar uma resposta clínica que induza a morte celular para matar seletivamente as células cancerígenas, promovendo a oxidação, causando danos ao DNA e gerando a eficácia da quimioterapia/radioterapia e de agentes moleculares direcionados, além de reverter a resistência às drogas das células cancerígenas [23; 24].

Desde 1970, estudos epidemiológicos de suplementação de selênio e ensaios clínicos apoiaram a hipótese de haveria uma relação inversa entre a ingestão de selênio e a incidência de câncer [25]. O selênio pode ser encontrado em verduras, carnes, alho, na castanha do Pará, demonstrando dinamismo em sua bioatividade e atuando em diversas proteínas funcionais, por essa razão, inspira protótipos de novas sínteses de bioativos funcionalizados com organocalcogênios [26]. Outros ativos muito utilizados em formulações medicamentosas são os compostos indol e imidazol, são conhecidos por atividades biológicas versáteis incluindo a atividade anticâncer [27; 28]. O imidazol integra o hormônio histamina e importantes compostos que se fundem com núcleos aromáticos [28]. A indústria farmacêutica possui diversos medicamentos notáveis com as estruturas indol e imidazol, seus registros são aliados em novas sínteses e estudos clínicos para diversos tratamentos [29].

A cultura de células imortalizadas tem sido uma análise efetiva no âmbito farmacoterapêutico e na dosagem de marcadores de tumores cancerígenos nos modelos em monocamada e tridimensional [30]. As células cultivadas na conformação tridimensional (3D) possuem benefícios em alternativa aos ensaios *in vivo*, pois suas informações metabólicas são mais realistas e compromete a difusão de nutrientes/fármacos experimentais diante de barreiras formadas por interações multidirecionais de matriz extracelular [31]. Apesar de ser uma estrutura de grande interesse na pesquisa do câncer e na qualificação de compostos para várias outras finalidades a formação de sua estrutura exige estratégias para a formação de camadas celulares visando um tratamento que de fato tenha coerência com um microambiente *in vitro* [32].

Este trabalho apresenta a aplicação da cultura de células de câncer de cólon cultivadas em monocamada e na conformação 3D combinada a técnicas de análise multivariada de fluorescência e espectroscopia com proposito de investigar o comportamento celular diante do tratamento com selênio-compostos de núcleo de atividade biológica indol e imidazol-pirimidínico, respectivamente MRK-104 e MRK-107.

2. REVISÃO DA LITERATURA

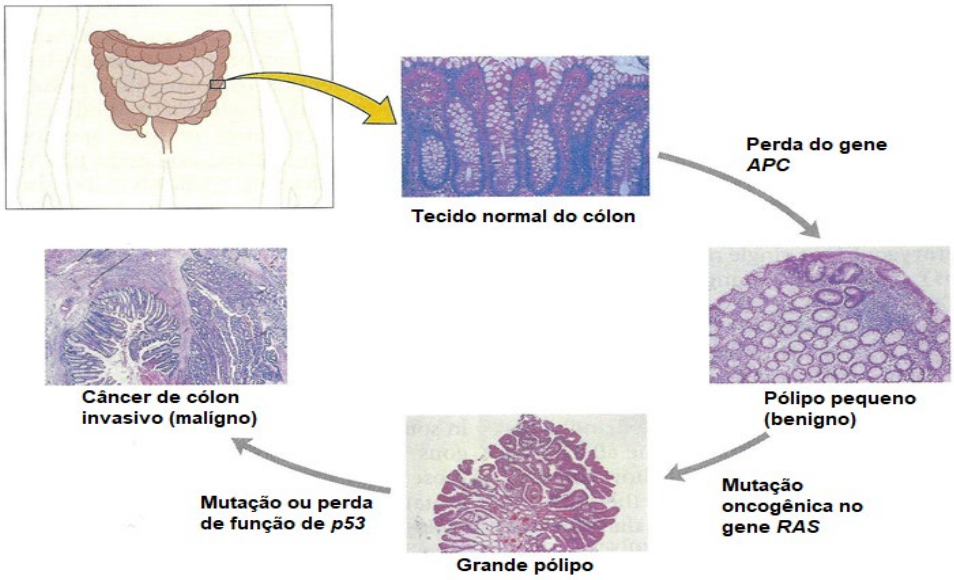
2.1. Câncer de cólon

O câncer colorretal (CCR) é um dos tumores sólidos mais comuns no mundo desenvolvido [33]. Representa a segunda causa de morte mundial e por séculos há relatos da sua incidência e mortalidade, suas perspectivas são de aumento de incidência em 60%, mas devido a pandemia do coronavírus seus diagnósticos, tratamentos e estatísticas sofreram defasagem e podem estar subnotificados [34; 35]. A maioria dos pacientes com CCR apresenta sintomas silenciosos durante anos por falta de manifestações específicas ou patognomônicas [36]. São diferentes tipos e subtipos de canceres que somam mais de 200 a serem diagnosticados e o histórico desses tratamentos são marcados com alta citotoxicidade inerente as células normais [37]. Essa alta citotoxicidade desencadeia efeitos colaterais que demandam atenção e ajustes terapêuticos constantes [38].

A etiogenia do câncer revela o acúmulo da ativação de oncogenes juntamente com inativações de genes imunossupressores, a anomalia acarreta proliferação celular e fenótipo anormais formando massas de células que emergem da mucosa intestinal e se projetam no lúmen do cólon [39].

Particularmente no CCR os genes codificados por p53, DCC e a proteína polipose adenomatosa coli (APC) são inativados e os oncogenes como KRAS são ativados, a visualização e classificação dos pólipos (Figura 1) são a base para a detecção precoce e prevenção do câncer de cólon por meio de colonoscopia ou sigmoidoscopia [40]. Os fatores desencadeantes estão ligados a dieta, genética e diferentes exposições exógenas como padrões de vida, relações sociais e psicológicas no trabalho, em casa ou na sociedade, renda e nível educacional [41]. A proteína APC mutante é detectada em 80% dos casos de CCR e já foram identificadas mais de 300 mutações [42]. A proteína APC desempenha um papel importante na adesão célula-célula e processos de morte celular, participa dos sinais de transdução da via de sinalização Wnt, atinge a modulação de COX-2 e a perda da função desregula genes que influenciam no aumento da atividade proliferativa [43].

Figura 1. Progressão tumoral do câncer de cólon pela mutação da proteína APC.



Fonte: Tape (2017).

2.2. Linhagens celulares Caco-2 e HT-29

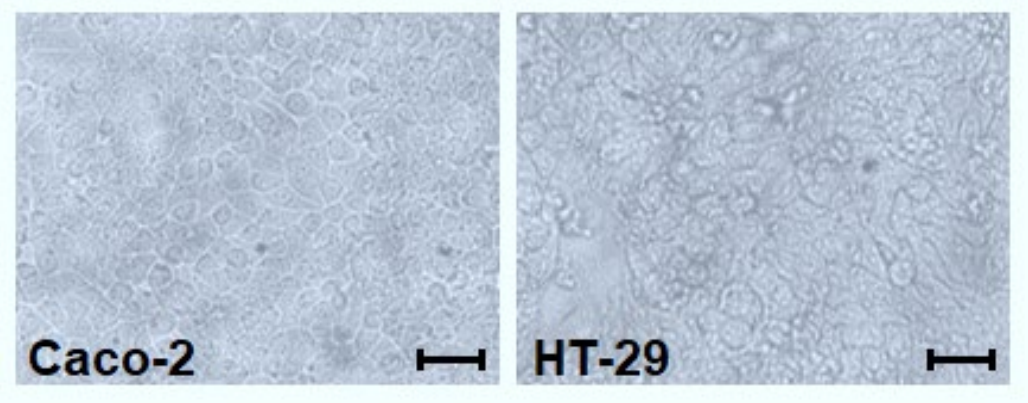
A principal vantagem da cultura de células é a possibilidade de protocolos controlados que geram reprodutibilidade e são desenvolvidos para investigar todas as funções do corpo preservando as características de cada célula [44]. A metodologia de cultivo celular é considerada o padrão-ouro para estudar *in vitro* as alterações no epitélio pela exposição a nutrientes, ingredientes funcionais, tóxicos ou drogas [45]. Em linhagens de cólon as células absortivas expressam um fenótipo de enterócito ou colonócito que representam mais de 80% do células epiteliais intestinais [46].

O epitélio intestinal é constituído por células especializadas, como os enterócitos, que absorvem nutrientes, e as células caliciformes que produzem muco com limitação da infiltração de substâncias nocivas, ou seja, atua como uma barreira entre os ambientes interno e externo [39]. O epitélio possibilita modulação em culturas *in vitro* para estudos de absorção e efeito metabólico de novos candidatos ao tratamento do câncer [41; 47].

Jorgen Fogh estabeleceu as culturas das linhagens de carcinoma de cólon humano Caco-2 e HT-29 (Figura 2) em 1964 e 1974, respectivamente [48]. Estas células epiteliais intestinais humanas isoladas retêm características anatômicas e bioquímicas *in vivo*, mas exigem planejamento para experimentação e manutenção da viabilidade [49]. Contudo, são ferramentas valiosas na pesquisa do câncer,

farmacologia e toxicologia já que a função celular e diferenciação podem ser exploradas para drogas de diversas finalidades [50].

Figura 2. Microscopia óptica de culturas únicas de Caco-2 e HT-29 após 24 horas (Barra de escala: 20 µm).



Fonte: Autoria própria

A alta similaridade com enterócitos absortivos levou as monocamadas de Caco-2 a serem consideradas um modelo eficiente de imitação da membrana intestinal para estudar a penetração transcelular passiva de compostos lipofílicos, são células que se diferenciam e se polarizam com diferentes proteínas expressas em suas superfícies apical e basolateral [51].

As células HT-29 expressam características de enterócitos absortivos e células secretoras intestinais que produzem uma substância gelatinosa semelhante ao muco [49]. Por esta razão, este modelo celular é amplamente empregado para realizar estudos de biodisponibilidade ou para investigar a resposta imune intestinal a infecções bacterianas que possam afetar as propriedades do muco secretado, mas possuem menor atividade enzimática em comparação às células Cacos-2 [33].

Essas diferenças na expressão da enzima, juntamente com a taxa de diferenciação muito lenta de 30 dias para HT29 e de 15 a 21 dias para Caco-2, afetam a adequação do modelo em refletir a permeabilidade *in vivo*, no entanto, Caco-2 apresenta valores de resistência elétrica trans epitelial quatro vezes maiores que HT-29, em outras palavras esses valores relatam a capacidade de confluência e integridade celular de uma cultura em monocamada em relação a outra [52].

A melhora da condição fisiológica levou ao desenvolvimento de modelos como organoides intestinais 3D com fisiologia de cripta vilosidades e capacidade de cultura de até 8 meses [53]. Essas linhagens são capazes de diferenciação dependente de

modulações, por exemplo, HT-29 tem um metabolismo de glicose prejudicado, onde há produção de ácido lático e acúmulo de glicogênio, logo a ausência de glicose leva a diferenciação enterocítica [33; 51]. A linhagem celular Caco-2 contrasta nesse quesito, pois possui baixo consumo de glicose e produção de ácido, mas acumula glicogênio e sua diferenciação enterocítica absortiva é espontânea na presença de soro e glicose [47].

A funcionalidade dos bioensaios é a determinação do potencial da eficácia do tratamento realizado nas células cultivadas, ou seja, determinação da curva dose-resposta[54]. Através da escolha de tempo e concentração é possível calcular parâmetros de avaliação como o índice de concentração inibitória de 50% da população celular (IC50), a concentração que leva a morte de 50% dos indivíduos (CL50) e também a concentração que inibe 100% do crescimento celular (TGI)[55; 56; 57].

2.3. Marcadores moleculares

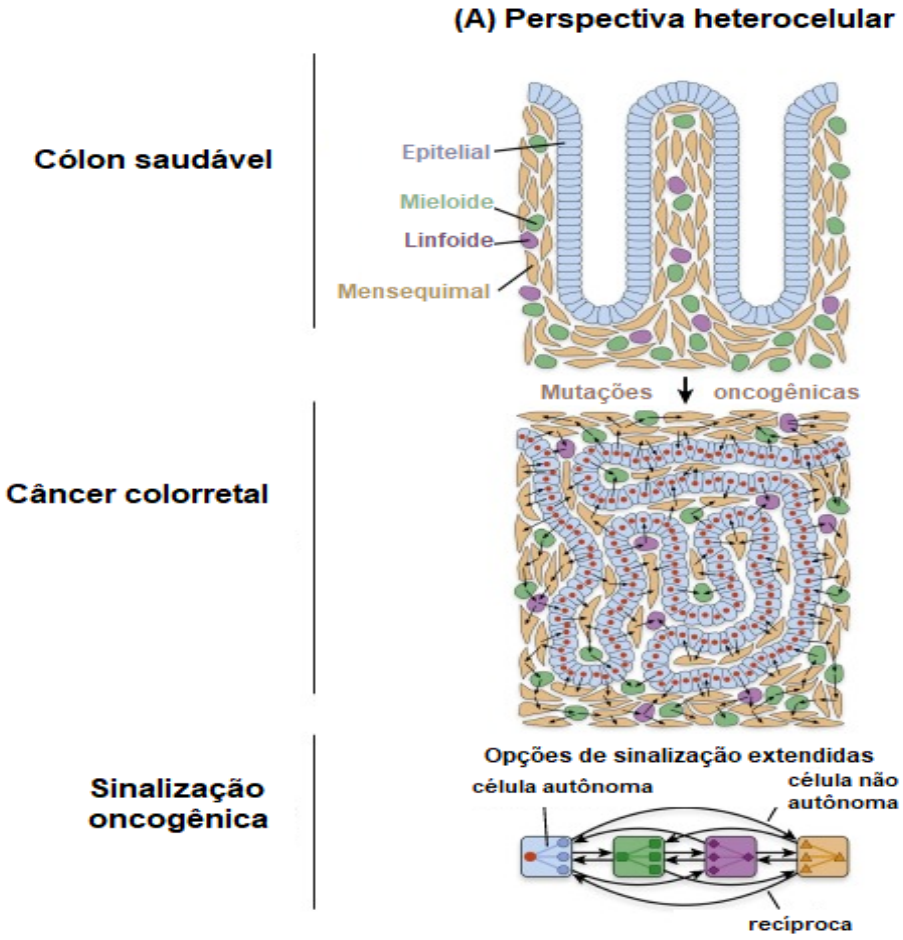
No CCR a mutação mais recorrente é na cascata de sinalização Wnt, mediadora de homeostase, diferenciação, proliferação e reparo tecidual, um período assintomático em torno de 10 anos que evolui na aquisição de mutações[58]. Sendo assim, a desregulação das vias de sinalização contribui no desenvolvimento e progressão do câncer através de resistência a medicamentos, perda de apoptose e de metástase [59].

A identificação do comportamento biológico tumoral pode ser alcançada com a as características patológicas e marcadores moleculares que reportam o valor prognóstico do câncer colorretal através, por exemplo, de índice de proliferação celular, quantificando ki-67, prognóstico de angiogênese, oncogenes e genes supressores de tumor, como a p53, K-ras, BCL-2, DCC, c-erbB2 e marcadores de invasão ou metástase por metaloproteínases de matriz [60].

2.3.1. Direcionamento de análise

Os marcadores auxiliam em diversas etapas: diagnóstico, estadiamento, determinação de prognóstico, avaliação de resposta ao tratamento e detecção de recidiva tumoral no período pós-operatório, mas com uma sinalização oncogênica heterocelular ativa (Figura 3) é difícil definir um perfil genômico tumoral no câncer colorretal [61].

Figura 3. Sinalização oncogênica com alterações de CCR heterocelulares com ampla gama de opções de sinalização.



Fonte: Adaptado de Tape (2017).

A maioria dos marcadores são de baixo custo e não invasivos, podem elucidar o rastreio de estadiamento do câncer, entretanto, existe uma necessidade em melhorar a precisão de biomarcadores no diagnóstico/prognóstico do CCR e também o custeio dos tratamentos alvo dirigidos [61; 62].

Devido a divergência histológica gera conflitos para a aceitação de novos métodos bioquímicos de rastreio, dos estudos até agora concretizados, a utilização do ki-67 como marcador de proliferação celular tem mostrado o seu reconhecimento como fator de prognóstico independente para o cancro da próstata, mama, entre outros [63].

2.3.2. Índice de proliferação

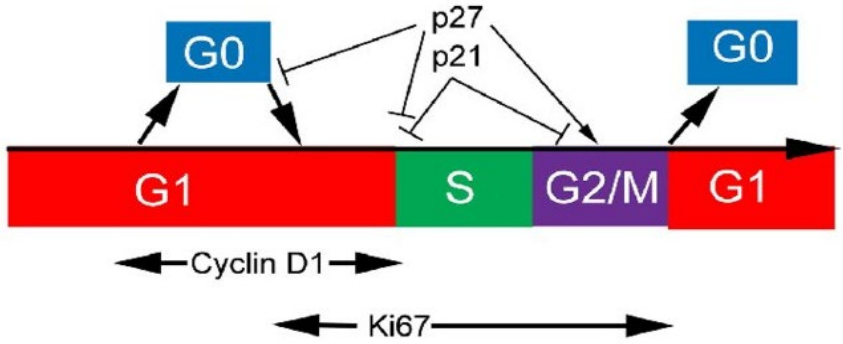
Há proteínas específicas para avaliar proliferação celular que são usadas como marcadores tanto para fins de pesquisa científica quando para fins aplicados ao diagnóstico e prognóstico na clínica [64]. São usados anticorpos para proteínas

associadas a proliferação celular, como o marcador Ki-67 para obter os índices de proliferação [65]. O Ki-67 possui duas isoformas da proteína Ki-67 de 320 kDa e 359 kDa necessárias para a manutenção da proliferação celular. Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em todas as células de vertebrados em proliferação e pode estimar a proporção de células em divisão para classificar tumores [66; 67].

Quando seções tumorais são submetidas a técnica imuno-histoquímica casos com mais de 14% de núcleos corados foram considerados de alto índice proliferativo, enquanto aqueles com núcleos positivos iguais ou menores que 14% foram classificados como baixo índice proliferativo [68].

O ki-67 é expresso em todas as fases do ciclo celular exceto no momento G0 e início de G1 (Figura 4), a alta expressão de Ki-67 em cânceres de grau III sugere hiperproliferação, com baixa diferenciação tumoral e, portanto, pior prognóstico [64].

Figura 4. Esquema das fases do ciclo celular e marcadores do ciclo celular.



A ciclina D1 é um marcador da fase G1 intermediária-tardia. Ki67 é um marcador tardio de fase G1 a G2/M. p21 associa-se à transição de fase G1-S e G2/M. p27 fase G0-G1, G1-S e G2/M.
Fonte: Adaptado de Iwakura et al., 2017.

A regulação do ciclo celular com Ki-67 depende de dois mecanismos opostos dependentes de reguladores conservados do ciclo celular: CDK4/CDK6 fosforila pRB, permitindo a expressão de Ki-67 mRNA em G1 [66]. Assim, a fase G1 é o ponto de decisão no destino de uma célula: proliferação, quiescência, diferenciação, apoptose ou senescência [67]

O papel no prognóstico em CCR não é claro, mas há grupos de pesquisa que salientam a associação com recorrência, sobrevida e ligação a respostas inflamatórias [69].

2.4. Ciclo celular

O ciclo celular eucariótico padrão realiza a síntese de DNA e mitose nas fases S e M [70]. A fase G1 permite crescimento celular e preparação para a síntese de DNA, as ciclinas garantem integridade do material genético juntamente com as 44 proteínas quinases regulatórias [71].

As CDKs (quinases dependentes de ciclinas) se complexam com ciclinas pela atividade de fosforilação e atuam na proteína Rb (proteína do retinoblastoma), uma reguladora do ciclo celular que costuma ser alvo de mutações, quando paralisa o ciclo celular as células ficam retidas na fase G1 e expressam os CDKIs (inibidores da atividade quinásica), ou seja impedem a fosforilação e ativam a morte celular [72].

Na fase S a quantidade de DNA é dobrada e na fase G2 há síntese de proteínas e crescimento celular rápido. As células que estão na fase G0 não estão participando do ciclo celular ativamente, são células quiescentes [66; 73].

Os fatores de controle da proliferação são estagnados por anormalidades no desenvolvimento que levam a resistência aos mecanismos apoptóticos, as principais causas malignas estão na regulação de G1 para a fase S. No câncer de cólon há acúmulos de ciclina D1 desde o início da fase G1, em uma célula normal a expressão da Ciclina D1 pode ser regulada pela APC [74].

Para a cultura celular a cinética do ciclo celular tumoral não só impacta na avaliação prognóstica, mas também é de importância potencial para prever a resposta a agentes específicos da fase do ciclo celular [72; 75].

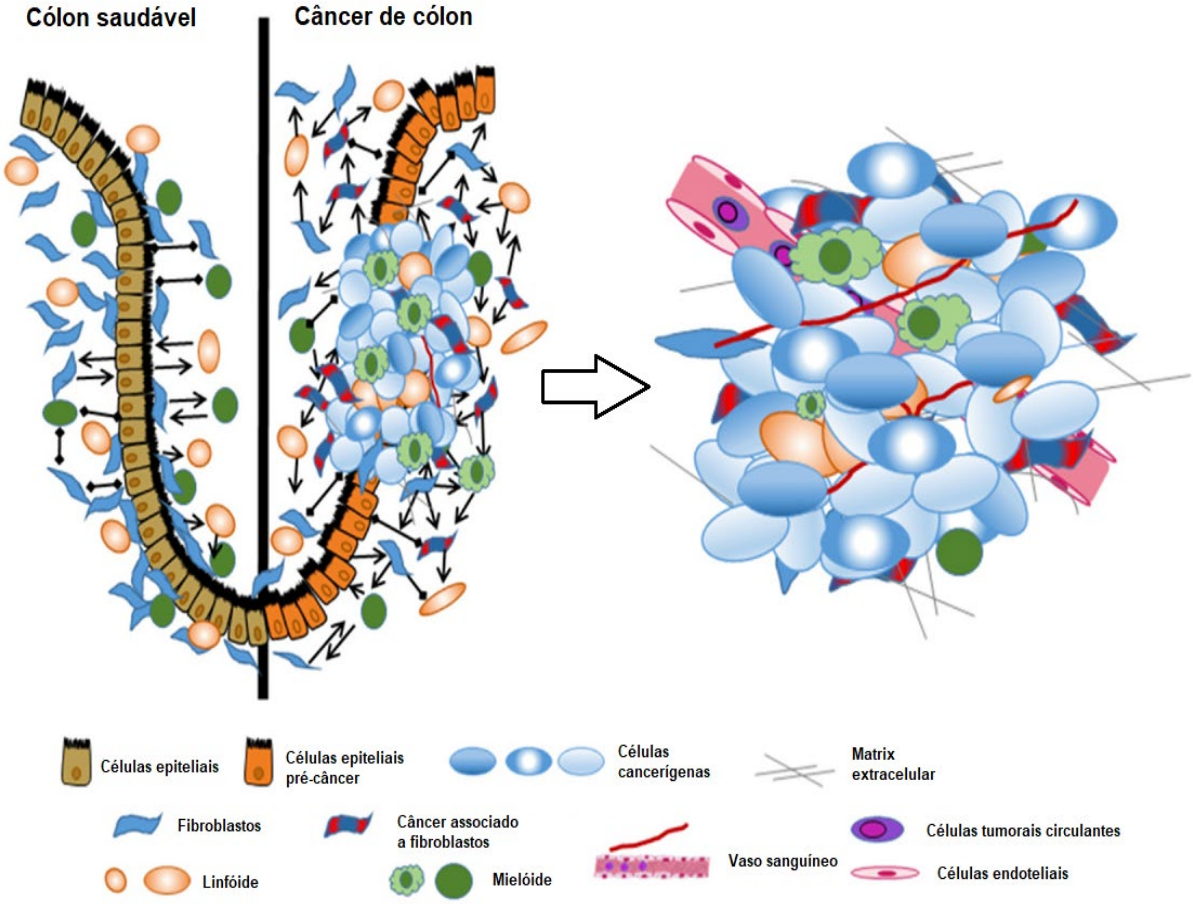
Sabemos que a mutação do gene APC da polipose familiar ocorre no câncer de cólon sendo o evento inicial que desregula as fases proliferativas, essas lesões genéticas disparam a desativação de p53 que irá contribuir para a tumorigênese, ativam KRAS e alteram a metilação do DNA[76].

2.5. Microambiente tumoral

O microambiente tumoral engloba propriedades distintas complexas entre células imunes, não imunes do hospedeiro e as células cancerígenas [77]. Uma variedade de marcadores moleculares aumenta o reconhecimento de fatores de progressão, assim como fatores de sobrevivência e essas respostas ocorrem por associações com as alterações locais e sistêmicas (Figura 5) [59; 78].

Há evidências de que o microambiente tumoral governa a origem e progressão do câncer, a heterogeneidade celular, a capacidade das interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), tudo contribui para o aumento da expressão gênica e retenção de fenótipos [79].

Figura 5. Comunicação celular múltipla no epitélio colônico e no adenocarcinoma do cólon com interações ativadas entre células heterotípicas.



Esquerda: Interações célula-célula heterotípicas “normais”.

Direita: A emergência de fenótipos malignos por mutações.

Fonte: Adaptado AlMusawi et al., 2021.

Muitos componentes caracterizam a estimulação de proliferação em tumores que são circundados pela MEC, diversos fatores de crescimento, citocinas, células imunes, endoteliais, mesenquimais e duas principais vias de sinalização de proliferação, crescimento e sobrevivência celular são elas Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt/mTOR [80; 81].

As células normais promovem o crescimento tumoral por influência de reações inflamatórias, já os fibroblastos são produtores de fatores de crescimento e MEC, mas

quando são ativados no interior do tumor ele motiva a sobrevivência e formação de sítios metastáticos [82]. Os macrófagos associados ao tumor viabilizam a angiogênese e mais citocinas pró-inflamatórias. A hipóxia estimula fatores angiogênicos que possibilitam fornecimento de oxigênio e nutrientes essenciais ao crescimento tumoral, nova invasão e prognostico [83].

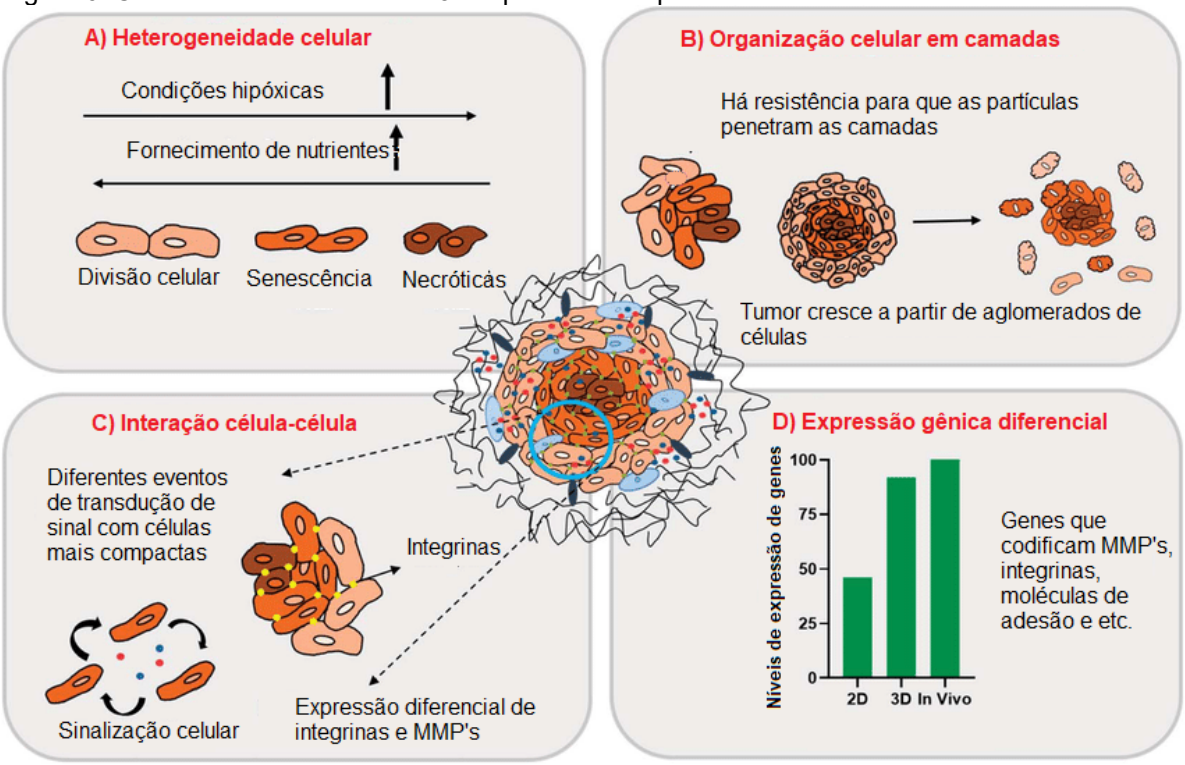
Considerando que o número de células endoteliais em tecidos de cólon saudáveis pode ser de 1 a 2% da população total de células, em amostras de tumor são acumulados 10% [84]. A combinação de fatores parácrinos, células estromais como endoteliais, macrófagos e fibroblastos associados a tumores, proteínas da MEC e mecânica tecidual se fundem no ambiente perfeito para o crescimento de um câncer e resistência aos tratamentos [85].

Na metástase para que o desprendimento ocorra, as células muitas vezes necessitam passar pela transição mesenquimal epitelial (TME), essa transição induz a mudança de um fenótipo epitelial para o mesenquimal [86]. O processo reduz a polarização celular, assim como a expressão de E-caderinas, produz fibras de estresse e alteração das junções celulares, se tornam indiferenciadas com maior poder migratório e invasivo. Essas modificações são facilitadas por agregações plaquetárias que protegem as células de fatores externos como as células natural killer [87]. Certos fatores de transcrição, a saber, SNAIL, Twist e Zinc finger-E-box-binding (ZEB), servem como os principais reguladores da promoção do fenótipo mesenquimal e as EROS exibem papéis multifacetados nessa transcrição [88].

2.6. Cultura celular 3D

Os métodos de cultura 2D são aplicados ao estudo de formação, progressão e tratamentos do câncer, no entanto possuem funções fisiológicas limitadas que ao comparar com os ensaios i*n vivo* demonstram 80% de discordância no tratamento [89]. Em superfície 2D muitas linhagens celulares crescem progressivamente mais achatadas e perdem seu fenótipo diferenciado [90]. O processo do cultivo 3D é transcrever a complexidade de modelos biológicos mais relevantes que potencializem a representação *in vivo* (Figura 6), muitos experimentos seguem superando limitações como polaridade, forma da célula, interação celular e rigidez tecidual [91].

Figura 6. Características de culturas 3D representadas por esferoides tumorais.



Fonte: Adaptado de Gupta e Sharma, 2021.

Quando certas células são cultivadas em um ambiente 3D, com matriz extracelular, as células são capazes de recuperar sua função fisiológica de forma mais representativa daqueles *in vivo* com pistas fisiológicas, adesões celulares, forças mecânicas e fatores difusíveis [31]. Os modelos tumorais compõem a arquitetura da MEC, além de representar interações tumor estroma ao contrário dos modelos de câncer animais considerados padrão ouro [85].

Curcio e colaboradores (2007) relatam que o esferoide precisa de mais do que 200 µm para que o evento necrótico seja encontrado e a difusão passiva de nutrição permeie as camadas celulares, assim teremos arranjos concêntricos de células periféricas em proliferação, células intermediárias viáveis, mais quiescentes e um núcleo central necrótico e hipóxico [92].

Dentre várias técnicas de cultura 3D, a cultura organoide permite células-tronco intestinais normais gerarem organoides com estruturas cripta-vilosas e até pode-se cultivar as células do câncer de cólon do paciente, visando reproduzir as diferenças fenotípicas observadas *in vivo*, como alta atividade de MAPK ou formação de estruturas ductais que são presumivelmente governadas por seu ambiente [85; 93].

A avaliação de doses na terapêutica do câncer pela cultura bidimensional fica limitada, assim a análise da viabilidade celular em modelos 3D indica quais genes co-

direcionados têm o maior efeito na viabilidade de diferentes células, identificando assim alvos para futuras terapias para CRC [94].

No CRC as regiões de hipóxia contribuem para a resistência aos medicamentos, pois a avascularidade dos tratamentos muitas vezes não permite penetrar nas regiões hipóxicas do tumor, resultando em resistência às drogas [95]. Embora tenha havido muitos avanços no desenvolvimento de modelos para estudar o CCR, as taxas de sobrevida dos pacientes ainda permanecem baixas, com taxas de sobrevida em 5 anos para pacientes com CCR em estágio avançado de apenas 14% [2; 96].

Modelos 3D e co-culturas permitem uma redução na experimentação animal, por razões éticas, mas também por razões científicas [97]. Há discrepâncias nas respostas entre as espécies e a dificuldade de extrapolar os resultados para os seres humanos, por isso deve-se investir nas melhorias para o cultivo com células humanas na conformação tridimensional [46; 98].

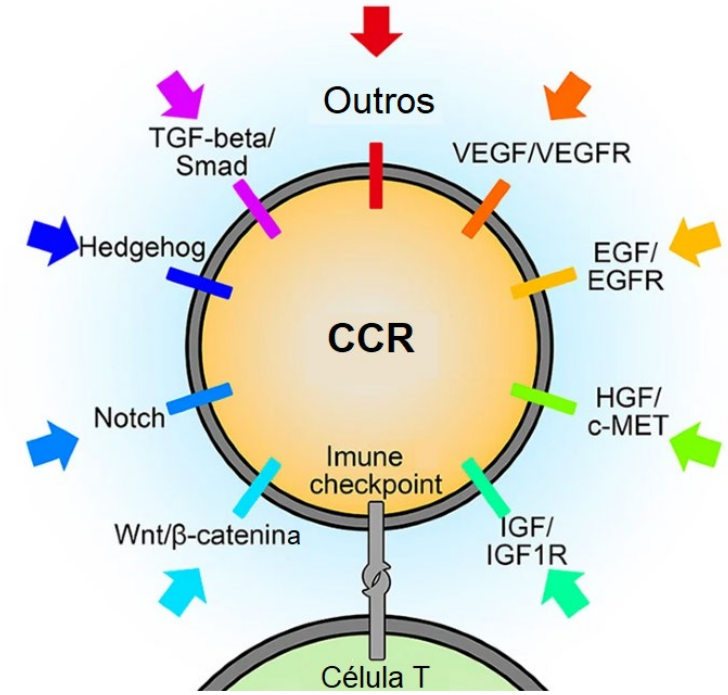
2.7. Quimioterapia ao CCR

A quimioterapia pode ser administrada em qualquer estágio do câncer de cólon e geralmente é administrada após a cirurgia, salvo alguns casos antes da cirurgia para reduzir o tamanho do tumor [91; 99]. Apesar disso, é significativo o número de pacientes com câncer de cólon que desenvolvem resistência aos medicamentos, é descrito em literatura a diminuição da eficácia dos medicamentos e necessidade de investimento em análises genômicas [85; 100].

Evidências sugerem que a resistência das células cancerígenas à quimioterapia se deve a uma transição de um fenótipo epitelial para mesenquimal [87; 101].

O tratamento padrão e adjuvante para câncer colorretal metastático é a quimioterapia baseada em fluoropirimidinas: 5-fluorouracil (5-FU), outras drogas citotóxicas também são usadas: irinotecano, oxaliplatina [102] Agentes biológicos visando outras vias de sinalização (Figura 7) como a vasculatura do tumor (bevacizimabe), o receptor de fatores de crescimento epidérmico (cetuximab) também têm atividade no câncer colorretal e o ramucirumabe junto com o ziv-aflibercept é o tratamento de segunda linha [103].

Figura 7. Vias que oferecem locais potenciais para terapia direcionada ao câncer colorretal.



VEGF/VEGFR: fator de crescimento endotelial vascular/receptor do fator de crescimento endotelial vascular; EGF/EGFR: fator de crescimento epidérmico/receptor do fator de crescimento epidérmico; HGF: fator de crescimento de hepatócitos; c-MET: fator de transição mesenquimal-epitelial; IGF/IGF-1R: fator de crescimento semelhante à insulina/receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1; TGF: fator transformador de crescimento.

Fonte: Xie et al., 2020.

Várias vias mediando a iniciação, progressão e migração do CCR, como Wnt/β-catenina, Notch, Hedgehog e TGF-β (fator de crescimento transformador-β)/SMAD, bem como aquelas capazes de ativar cascatas de sinalização, como como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT ou RAS/fibrossarcoma rapidamente acelerado (RAF), contêm locais ideais para terapia direcionada e sua eficácia difere drasticamente entre as pessoas, levando a um aumento da carga associada à seleção e vigilância de pacientes [95; 104].

2.8. Seletividade

Os novos candidatos a fármacos devem seguir critérios de validação de métodos quanto a sua linearidade, precisão, exatidão, robustez e seletividade para prosseguir nas fases de desenvolvimento de um estudo pré-clínico [105].

Além de uma atividade efetiva que contorne a relação mutação/resistência é preciso que a atividade seja seletiva ao câncer de cólon [106]. A diferenciação das células malignas de células sadias (não tumorais) é um desafio para a efetividade (efeito e seletividade) dos quimioterápicos no CCR [85].

A quimioterapia em pacientes com CCR é prejudicial devido à produção de efeitos colaterais graves aliados a pouca ou nenhuma eficácia [2; 107]. O que caracteriza a não seletividade do tratamento são os indesejáveis efeitos colaterais, tais como a perda de cabelo, náuseas, dor, febre, diarreia e fadiga [102]. A diarreia induzida por quimioterapia afeta 50% dos pacientes com CCR que recebem 5-fluorouracil (5-FU) como agente único, já a terapia combinada com irinotecan reduz 14% da toxicidade [108]. Um nível aumentado de ROS intracelular foi evidente em células de câncer de cólon que são resistentes a 5-FU sugerindo a promoção da resistência através da via de apoptose extrínseca e a necessidade da ativação da via da proteína quinase ativada por AMP para reverter a resistência [88; 109].

Os agentes quimioterápicos exercem dano tóxico no epitélio gastrointestinal (GI), que é pelo menos parcialmente mediado pela ativação da cascata inflamatória, todavia, o tratamento sintomático desses danos pode ser muito tóxico para pacientes em estágios avançados do câncer [108; 110].

Os avanços na quimioterapia sistêmica para CCR e o desenvolvimento de novos agentes biológicos contribuíram para aumentar a longevidade do paciente através de terapias que visam reduzir efeitos colaterais, prevenir a recorrência da doença em casos não metastáticos e evitar a progressão da doença em casos metastáticos de CCR [1; 111].

2.9. Estresse oxidativo

Espécies reativas ao oxigênio (EROS), que são formadas pela captura de elétrons por um átomo de oxigênio, são moléculas quimicamente reativas geradas durante processos fisiológicos e possuem funções essenciais nos organismos vivos [112; 113]. Como exemplo dessas moléculas temos o peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, ânion superóxido e peroxinitrito [114].

As EROS são componentes integrais das vias de sinalização celular e demonstraram regular a transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão,

angiogênese e metástase [115]. No TGI, a geração de óxido nítrico mantém as funções normais da mucosa e desempenha um papel citoprotetor [116].

Três vias de sinalização foram relatadas como intimamente ligadas ao desenvolvimento de CCR devido às interrupções por estresse oxidativo elevado vias Janus quinases (JAK)/transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição (STAT), vias Wnt/β-catenina e vias PI3K/AKT [88]. Por outro lado, os tumores colorretais humanos (adenomas e carcinomas) apresentam níveis aumentados de diferentes marcadores de estresse oxidativo, como aumento dos níveis de EROS, óxido nítrico (NO), 8-oxodG no DNA, peróxidos lipídicos, glutationa peroxidase (GPx), catalase e diminuição da metilação da citosina no DNA [117].

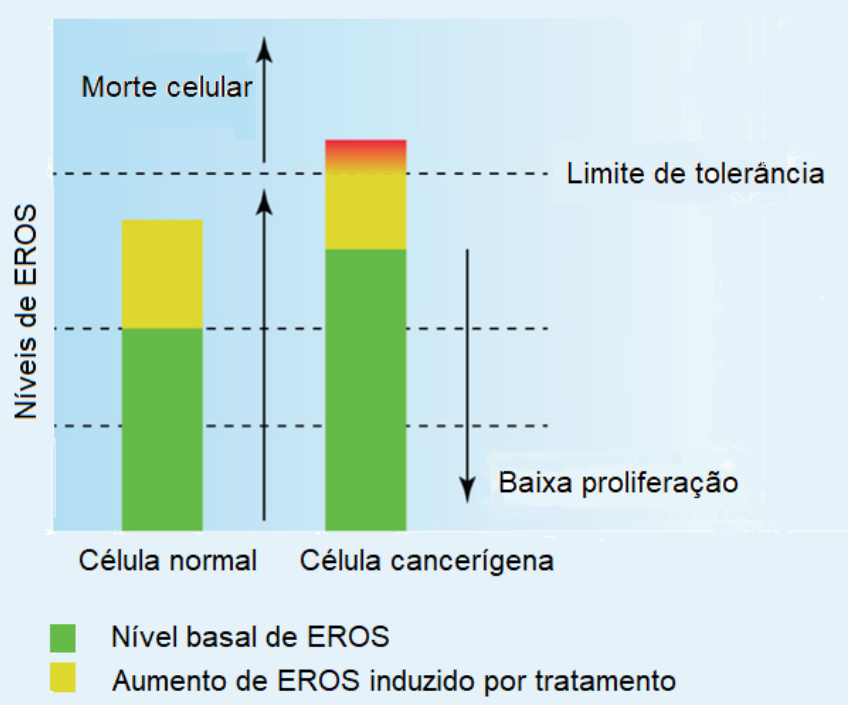
Com o estresse oxidativo, produtos como o H_2O_2 interagem com metais de transição e geram as reações de Haber-Weiss e Fenton, são eles cobre, ferro, cromo que também estão relacionados com a toxicidade de EROs [113]. Além disso, níveis alterados de enzimas de eliminação de EROS, como superóxido dismutase (SOD), GPx e peroxirredoxina, são indicativos de homeostase redox aberrante em células tumorais [88; 118].

As reações de Haber-Weiss e Fenton geram peroxidação lipídica [119]. As características das reações são a alteração da fluidez das membranas celulares, redução da capacidade de manter um gradiente de concentração equilibrado, aumenta a permeabilidade da membrana, aumenta o processo inflamatório, dificulta a renovação de proteínas, assim gradualmente leva a alterações estruturais e funcionais das organelas celulares [117; 120].

As modificações epigenéticas estão envolvidas na carcinogênese e sua indução geralmente é acompanhada de sinalização de EROS, vias que ativam o processo inflamatório e displasias [121]. Um dos eventos de injúria celular que reconhecemos no CCR é a hipometilação do DNA [122]. No momento em que há a formação de EROS a metilação pode regularizar sua superexpressão pela via NF- κB, a via da fosfatidil inositol-3 quinase (PI3K) /Akt, proteínas de choque térmico e a via da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) [117; 123].

A capacidade de células cancerígenas distinguir EROS como um sinal de sobrevivência ou apoptótico é controlada pela dosagem, duração, tipo e local de produção de EROS (Figura 8) [20; 112].

Figura 8. Efeito do nível elevado de EROS em células normais e cancerígenas.



Fonte: adaptado de Quian et al., 2019.

Neste contexto, é identificado que o excesso de EROS pode danificar proteínas celulares, lipídios e DNA e induzir parada do ciclo, senescência, autofagia, apoptose e necrose [124].

As EROS podem ativar os receptores de morte transmembrana, como Fas, TRAIL-R1/2 e TNF-R1 e, em seguida, recrutar as proteínas adaptadoras FADD e procaspase-8/-10 para formar complexos de sinalização indutores de morte (DISCs), desencadeando subsequentemente a caspase ativada e apoptose, alternativamente, ROS pode ativar ASK1 pela oxidação de Trx, resultando na indução subsequente de apoptose através de MAPKs como JNK/p38 [125].

Esse acúmulo de EROS se torna irreversível e influencia mutações espontâneas com papéis fundamentais na tumorigênese, metástase e resistência a medicamentos em diversos tipos de células cancerígenas [112; 126]. Assim, desenvolver abordagens para o uso racional de EROS em aplicações antitumorais é muito desafiador, porém geram a possibilidade de terapias multialvo que atuam em vias metabólicas que culminam em morte celular [125; 127].

2.10. Morte celular

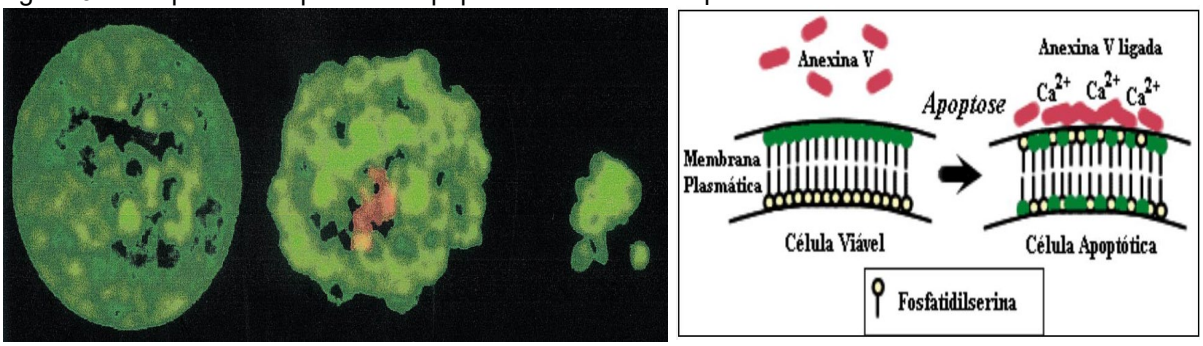
No epitélio intestinal o processo de regeneração é constante, diariamente 15 a 25% do epitélio colônico-retal é rejuvenescido e o tempo médio para que essas células proliferem é de um dia [128]. O epitélio da cripta de todo o cólon e reto é substituído em 4 dias, as células-tronco se dividem de forma assimétrica e sem interrupção com objetivo de diferenciação em células caliciformes ou migração para o lúmen [51]. Quando o tecido é cancerígeno essa divisão é simétrica e as células filhas preservam a capacidade clonogénica das células-tronco e assim escapam da vigilância imunológica por uma variedade de mecanismos [128; 129].

São mais de 40 subtipos de morte celular, entretanto a mais conhecida e elucidada é a apoptose descrita por Kerr, Wyllie e Currie (1972), identificada por alterações morfológicas em que a célula sofre encolhimento, condensação de cromatina, formação de corpos bolhosos e fragmentação nuclear [130; 131; 132].

A regulação do processo apoptótico é realizada principalmente pelas proteínas membros da família BCL-2, que promovem ou inibem a permeabilização e a ruptura das membranas mitocondriais externas, seja por vias extrínsecas ou intrínsecas, mas ambas dependem de EROS [112; 133]. Na morte celular induzida por EROS é comum a diminuição dos níveis de GSH e a perda da homeostase redox que desencadeia rotas determinantes para apoptose, autofagia, necroptose e ferroptose [131; 134].

As mitocôndrias liberam proteínas intermembranares em um processo conhecido como permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) [135]. Essas proteínas ativam caspases citosólicas e desencadeiam a morte celular, mesmo quando as caspases efetoras estejam inativas a MOMP leva a uma perda completa da sobrevivência clonogênica [136]. Esse processo pode ser acompanhado e monitorado laboratorialmente, com base nos níveis de exposição da fosfatidilserina através do uso da proteína anexina V conjugada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína [137]. Aliado a detecção, é possível analisar a diferenciação entre células em apoptose recente e tardia (Figura 9), pelo uso concomitante do iodeto de propídeo (PI), outro marcador celular capaz de interagir com sequências de DNA, mas que somente tem acesso ao espaço intracelular através da perda da integridade da membrana plasmática, processo esse que ocorre mais tardiamente durante a apoptose[138]. Essa diferença na marcação das células possibilita a distinção entre células em apoptose recente (anexina V+PI-), tardia (anexina V+PI+) e necrose (anexina V-PI+) [139].

Figura 9. A sequência do processo apoptótico avaliado via quimioluminescência.



Fonte: Vermes et al., 1995.

O processo de apoptose é facilitado por proteases denominadas caspases que são enzimas pertencentes ao grupo de proteases cisteínas e são classificadas de acordo com a função nesta rede de eventos, denominadas iniciadoras e executoras [140; 141]. Caspases 2, 8, 9 e 10 iniciam a atividade proteolítica amplificadora de sinal, ao passo que as caspases executoras incluem as caspases 3, 6 e 7 que clivam e agem no local-alvo.

Diversos eventos de sinalização como o envolvimento do receptor de morte (extrínseco) ou estresse celular (intrínseco) levam a conjuntos distintos de mecanismos de apoptose indutores de morte, portanto, as vias apoptóticas geralmente podem ser classificadas como extrínsecas ou intrínsecas com base no modo de iniciação e nos adaptadores específicos e caspases iniciadoras envolvidas no evento [141].

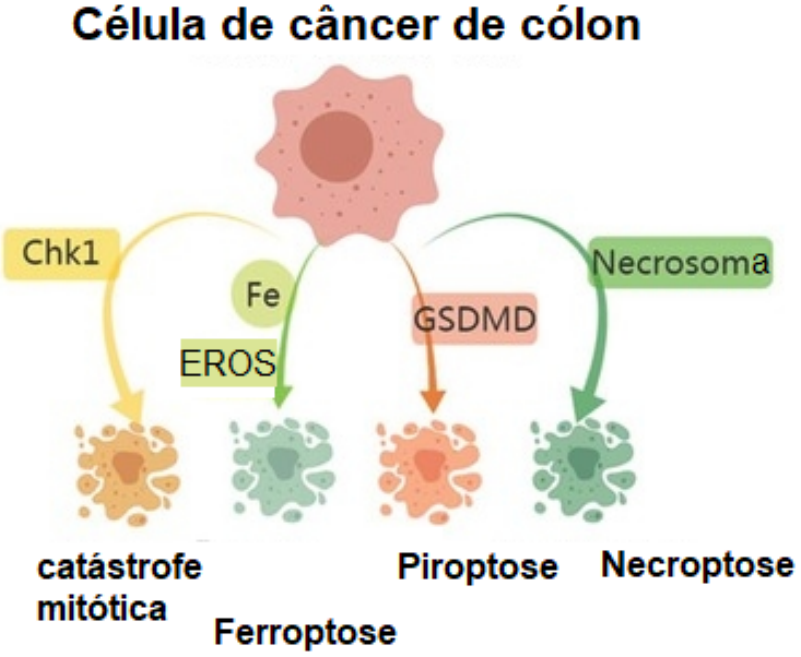
Dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático e EROS induzem a ativação do antagonista ou assassino pró-apoptótico de BCL-2 (BAK) e/ou Proteína X (BAX) associada a BCL-2, que resulta na permeabilização da membrana externa mitocôndria [142]. A perda da integridade mitocondrial leva à liberação de suas proteínas da membrana interna, como citocromo C e SMAC que promovem diretamente a ativação da caspase e via intrínseca [143].

A apoptose mediada pelo estresse da via RE é parcialmente controlada pela cascata ASK-1/JNK, que é diretamente regulada por EROS em um nível excessivo ocasiona o dobramento incorreto da proteína, levando à resposta de proteína desdobrada (UPR) e à indução de CHOP, iniciando assim a apoptose pela regulação da expressão de genes da família BCL-2 [125; 144].

A ativação de caspases inflamatórias resulta em uma forma lítica de morte celular, liberando vários DAMPs e potentes mediadores inflamatórios com potencial

para conduzir a imunopatologia e o início da doença inflamatória ou até a piroptose, um tipo de morte celular programada que faz com que as células se expandam incessantemente até a ruptura da membrana celular, levando ao vazamento do conteúdo celular e ativando uma forte resposta inflamatória. Essa resposta parte de gasdermina D e GSDME que são incisadas por caspase-1/, 4/5/11 ativa e caspase-3 [142; 145]. Os mecanismos de morte celular (Figura 10) possuem suas particularidades, ao contrário da piroptose, o parthanatos e oxeiptose não dependem da caspase, a resposta de EROS é o iniciador, já a PANoptose é ativada por componentes de piroptose, apoptose e/ou necroptose. [145; 146].

Figura 10. Mecanismos de mortes celulares não canônicas mais evidenciados em células de câncer de cólon.



Fonte: adaptado de PAN et al., 2022.

O conhecimento da morte celular mediada por caspases, mecanismos imunológicos e novos substratos promove grande esperança para novas oportunidades terapêuticas, entre elas, as possibilidades de novos mecanismos moleculares de regulação metabólica e direcionamentos mais efetivos na morte de células com alterações genéticas indesejáveis [147; 148]. Por ser bem elucidada, sabe-se que a apoptose promove a fragmentação de DNA, as EROS também podem ativar o dano e quando há quebras de cadeia simples ou duplas geralmente levam à catástrofe mitótica, um tipo de morte celular programada [145; 149].

Outro mecanismo de morte conhecido por ferroptose é causado principalmente por um desequilíbrio na produção e degradação de EROS lipídicos intracelulares com morte celular oxidativa dependente de ferro quando a capacidade antioxidante reduzida e EROs lipídicos são acumulados [125; 150].

A morte celular que ocorre na circulação é chamada anoikis, é desencadeada pela perda de adesão da MEC [151]. Muitas células cancerígenas ativam aberrantemente proteínas tirosina quinases (PTKs), como IGF1R e EGFR, bem como cinases citoplasmáticas e fatores de TEM para escapar de anoikis [152] tornando-os alvos atraentes para terapia. Anoikis atua como uma barreira crítica à metástase, induzindo a morte celular após o desprendimento das células cancerígenas da MEC evitando assim a disseminação das células tumorais por outras regiões [153].

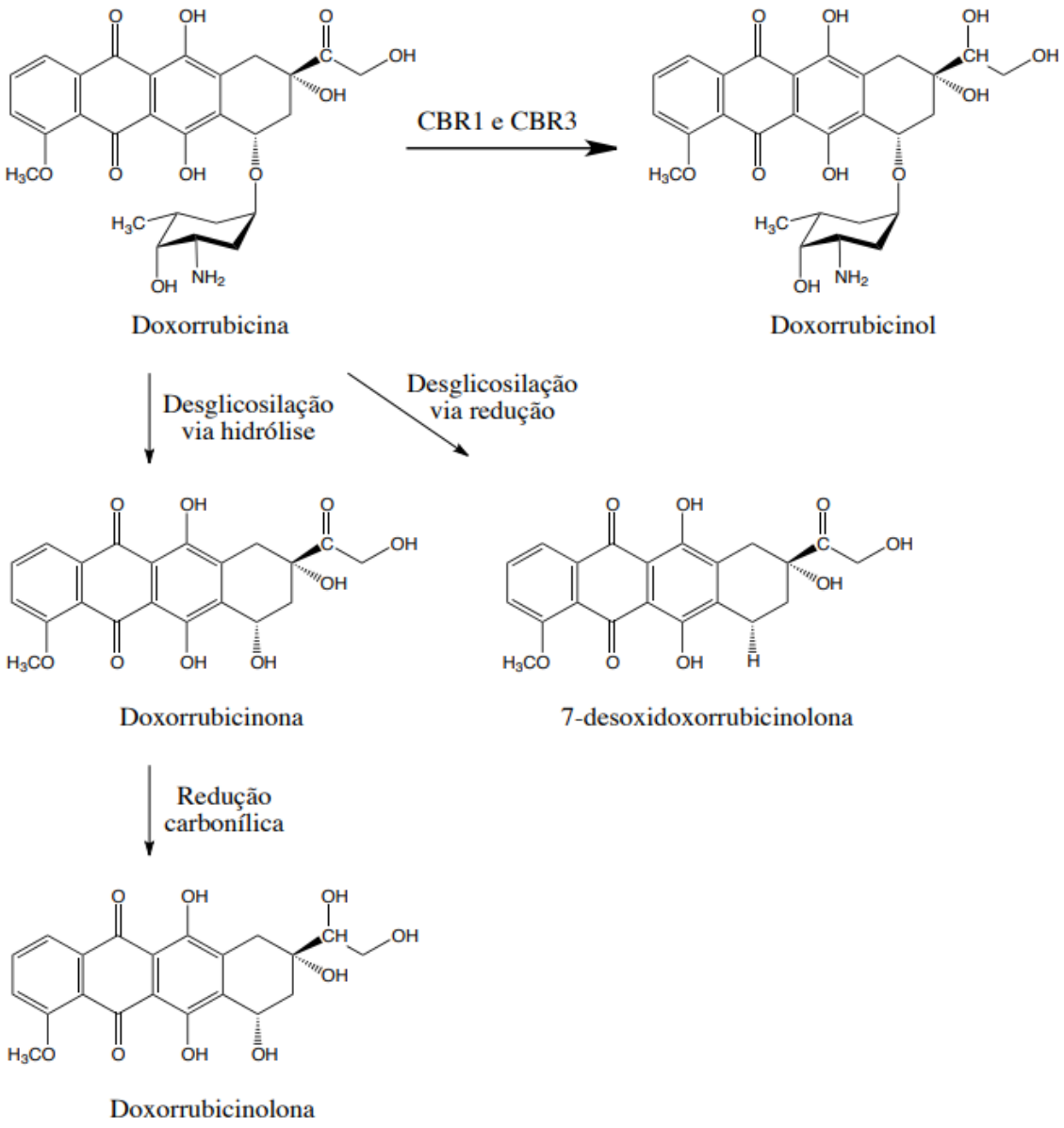
2.11. Doxorrubicina

O uso clínico da doxorrubicina (DOX) é limitado por uma cardiotoxicidade de aumento cumulativo da droga e pode levar a uma cardiomiopatia dilatada em 40% dos tratados e com sintomas após 10 anos da quimioterapia [154]. No entanto, a DOX também pode ser uma estratégia terapêutica para o câncer de cólon, pois é rentável em comparação aos outros fármacos anticâncer[103]. Essa antraciclina de classe I não seletiva isolada de *Streptomyces peucetius var. caesius* tem atividade atrelada ao anel de tetracenequinona, a uma porção aglicona e um grupo funcional amino-açúcar [155].

A ação da DOX ativa vários mecanismos destinados à morte celular, como inibição por topoisomerase II, intercalante de DNA, indução de estresse oxidativo e superprodução de ceramida [155; 156].

Em se tratando de estresse oxidativo, a DOX passa por uma série de biotransformações (Figura 11) e as 7-desoxi-agliconas reagem com O^{2}• e formam o radical OH• em uma cascata de reações [157]. O grupamento quinona quando reduz a uma semiquinona, metabólito recém-formado e instável que pode lesionar o DNA ou retornar à forma de quinona e então converter superóxido em peróxido de hidrogênio que, por sua vez, via reações de Fenton e Haber-Weiss, pode formar os radicais hidroxila altamente reativos [154; 158].

Figura 11. Biotransformação da doxorrubicina, majoritariamente metabolizada a doxorrubicinol pelas enzimas carbonil redutase 1 e 3 (CBR1, CBR3).



Fonte: CHOI et al, 2020.

A DOX em alguns bioensaios de resistência em câncer de cólon provou que induz o fenótipo semelhante ao EMT, isto é, a condição em que a célula tem alta probabilidade de metastatizar com capacidade de desadesão e migratória [158]. Quando não há resistência os níveis de BCL-2 são reduzidos enquanto os níveis de proteínas Bax aumentam e essa sinalização é um fator determinante da via de apoptose [159].

2.12. Selênio e metabólitos

O selênio foi descoberto em 1818 por Jöns Jacob Berzelius, é um elemento essencial classificado em um não metal da tabela periódica, a recomendação é de que adultos consumam 55 µg (0,7 µmol/dia), com um nível máximo de ingestão tolerável definido em 400 µg (5,1 µmol/dia) [160].

O selênio é encontrado no sal marinho, ovos, miúdos, levedura, pão, cogumelos, alho, aspargos, couve, peixes e castanha do Pará [161]. É mais facilmente absorvido na forma de compostos orgânicos e na presença de vitaminas A D e E [162]. A biodisponibilidade do selênio contido nos alimentos também é determinada por fatores dietéticos, como teor de gordura, proteína e metais pesados [163].

Quando há muito excesso presente em um organismo, o selênio pode se comportar como um análogo do enxofre (S) e substituir o S em algumas proteínas e enzimas, o que pode causar problemas funcionais e/ou toxicidade [164]. O selênio inorgânico possui 4 estados de oxidação, selenetos, selenito e selenato [165]. Organicamente é representado em selenoproteínas, aminoácidos contendo selênio e compostos metilados [166].

O selênio é necessário para a formação de selenoproteínas, incluindo glutationa peroxidases e tioredoxina redutases, que fornecem proteção contra danos celulares causados pelo estresse oxidativo e iodotironina desiodinases que regulam a homeostase do hormônio tireoidiano [167].

As selenoproteínas são um grupo de aproximadamente 25 proteínas com selenocisteína incorporada e a eficácia terapêutica do selênio depende de sua forma química atuando na manutenção de processos fisiológicos regulares e manutenção da viabilidade celular [168]. Seleproteínas agregam em vários mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo como as GPx enzimas antioxidantes, as tiorredoxinas redutases (TR) funcionam no controle redox, a selenoproteína P transporta selênio para os tecidos e a selenoproteína S está envolvida na remoção da resposta proteica desdobrada [117; 169].

A selenometionina é a principal forma química do selênio dietético e seu consumo permite benefícios com ação antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênico, anticarcinogênico, antiviral, antibacteriano e antifúngico [19; 170].

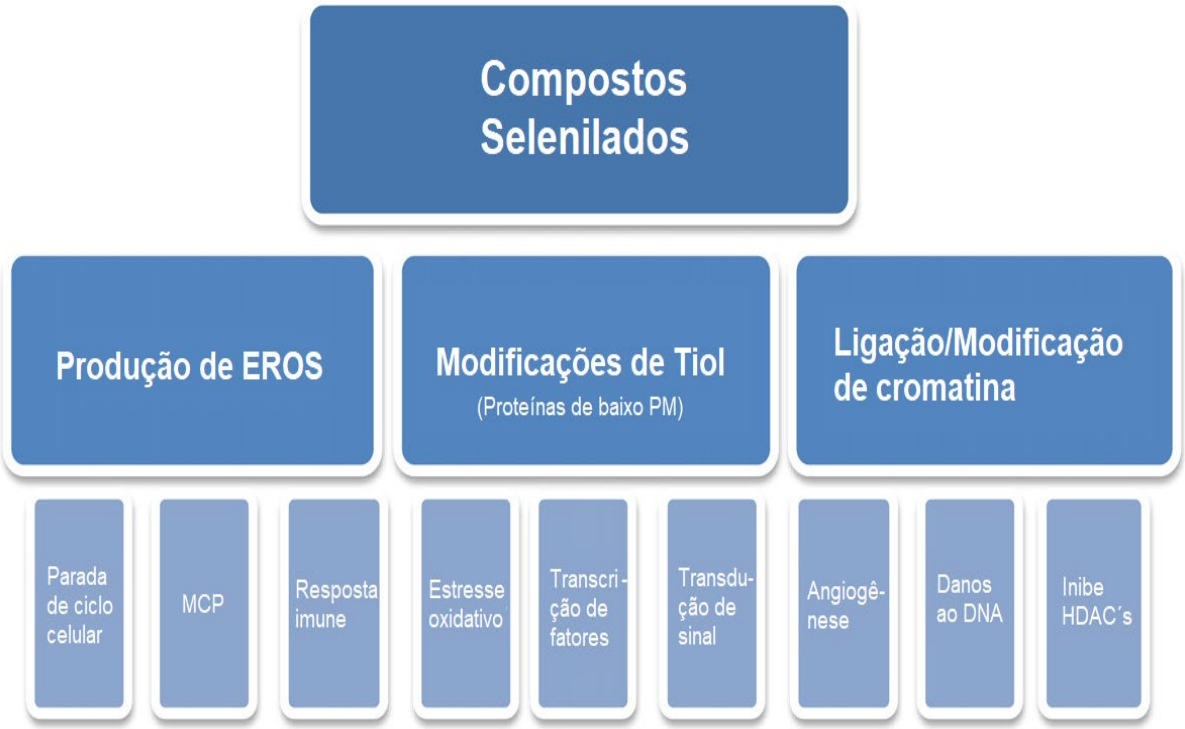
Desde o século XIX câncer e selênio são relacionados, o selênio como suplemento gera EROS em níveis baixos, mas suficientes para que as funções

biológicas mantenham a regularidade, neste caso os patógenos são alvos e seriam induzidos a senescência e morte [20; 171].

Compostos de selênio de ocorrência natural que possuem essas propriedades são: selenito, selenocisteína, outros selenolatos e o metabólito metilselenol de Se-metilselenocisteína e selenometionina [172]. Os selenatos e o seleneto de hidrogênio reagem eficientemente com oxigênio e tióis, levando a um consumo não estequiométrico de tióis e NADPH, estresse oxidativo maciço e, eventualmente, morte celular por apoptose, necrose ou necroptose [173; 174].

Vários compostos de selênio, Semetabólitos redox ativos (Figura 12) provaram ser superiores como agentes anticancerígenos, são seletivos para o tumor tanto em termos de sua absorção quanto de suas interações com o ambiente pró-sobrevivência ou no microambiente das células tumorais [172; 173].

Figura 12. Efeitos pró-oxidativos e alvos a jusante dos compostos de selênio.



Fonte: Fernandes e Gandin (2015).

De maneira geral, os compostos de selênio e formulações visando melhor ajuste de biodisponibilidade e seletividade como as nanocápsulas, têm sido benéficos no tratamento e diagnóstico do câncer e atrai considerável atenção contra vários tipos de câncer [172; 175].

O selênio é considerado como anticâncer promissor, as novas sínteses apresentam menor toxicidade, mais biodisponibilidade que o selenito e exibe um amplo espectro de atividade biológica, incluindo atividade antioxidante, que permite a modulação das vias de proliferação aberrante e ativa inflamação, apoptose e outras mortes celulares [168; 176].

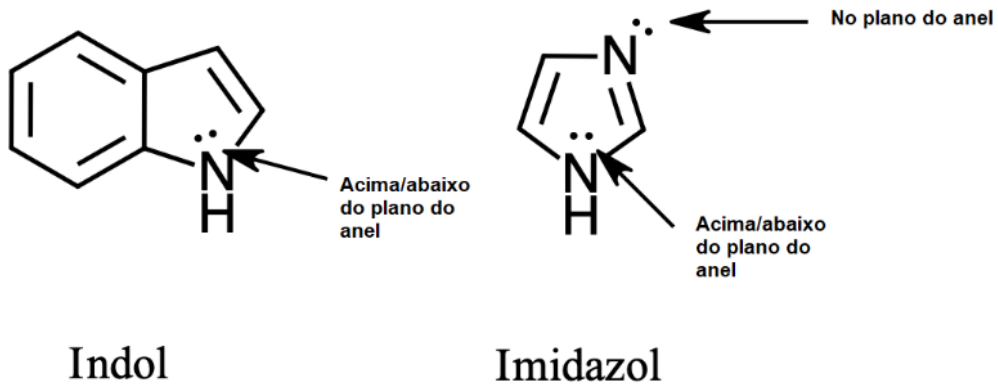
2.13. Histórico dos compostos pirimidínicos

Moléculas heterocíclicas têm sido frequentemente usadas como andaimes por químicos medicinais em programas de descoberta de drogas [53]. Numerosas revisões compilando os resultados das investigações sobre o potencial anticancerígeno da estrutura à base de pirimidinas em artigos de pesquisa já estão presentes e enfatizam a capacidade de inibir fatores de crescimento, inibir função proliferativa, induzir apoptose e outros mecanismos de morte celular [177].

O anel de pirimidina também é uma porção chave na estrutura de vitaminas como tiamina, riboflavina e ácido fólico [178]. O imidazol é um composto aromático heterocíclico de fórmula molecular C3H4N2, muitos fármacos contêm o anel imidazólico, especialmente antifúngicos como o miconazol e o clotrimazol, e antibióticos como o nitroimidazol [179]. Os compostos indólicos são uma classe de compostos orgânicos heterocíclicos aromáticos que possuem uma estrutura bicíclica, consistindo de um anel benzênico (com 6 carbonos) acoplado a um anel de pirrol (anel de 5 membros com um nitrogênio) [180]. O indol é o composto mais simples dessa classe e tem a fórmula molecular C8H7N é amplamente distribuído no ambiente natural, é precursor da serotonina e deriva o aminoácido triptofano [181]. Os indóis têm um potencial anticancerígeno promissor e tem havido ênfase na síntese de derivados de indol para superar os problemas enfrentados pelos agentes terapêuticos existentes, visto que, há relatos de atividade perante a resistência quimioterápica [182; 183].

Os compostos indol e imidazol (Figura 13) são importantes em várias áreas, como na síntese de produtos naturais e na química medicinal, visto que, têm resultados dinâmicos de atividades biológicas versáteis, como anticâncer, antibacteriano, anti-inflamatório e antifúngico [27; 184].

Figura 13. Estrutura de indol e imidazol. Ao protonar o indol é convertido de um composto aromático para um antiaromático, o que não ocorre no caso do imidazol.



Fonte: Gannet, 2020.

Estudos anteriores demonstraram que o imidazol inibe a proliferação de células de câncer de cólon por ativação de apoptose celular e produção de EROS [1; 185; 186]. Há sete drogas comerciais contendo indol no Top-200 Melhores drogas de publicidade por vendas no varejo dos EUA e novas propostas em análise [27; 29; 187]. Há também um número notável de medicamentos contendo indol no mercado, bem como compostos passando por diferentes estágios clínicos ou status de registro [29; 177].

A funcionalização dos núcleos fenilselenil-1H-indol e imidazo[1,2-a]piridina (IP's) é uma tarefa sintética importante, uma vez que são bem estabelecidos como andaimes privilegiados e a fusão com o selênio pode agregar na atividade farmacológica, assim, muitos pesquisadores seguem avaliando possibilidades dessa fusão promissora [188; 189; 190; 191].

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os potenciais antiproliferativos e as vias de morte celular de 2 Selênio-compostos em células de câncer de cólon em monocamada e na conformação 3D.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

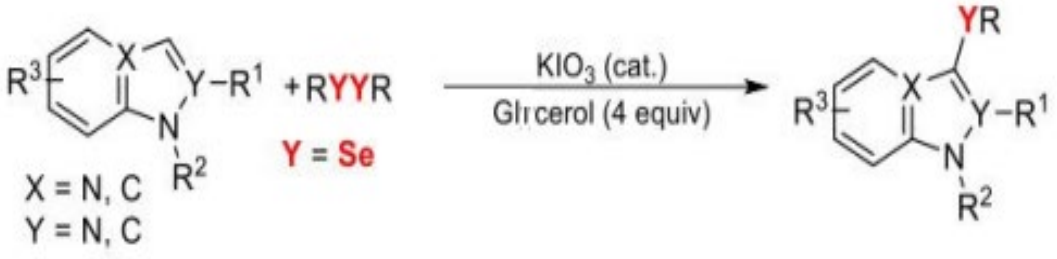
I. Avaliar a atividade antiproliferativa em modelos *in vitro* 2D e 3D com linhagens celulares tumorais humanas de cólon (HT-29 e Caco-2), fibroblastos não tumorais humano (HFF-1) e murino (NIH/3T3);
II. Avaliar a reversibilidade do efeito sobre a proliferação celular;
III. Avaliar o efeito sobre migração e ciclo celular;
IV. Avaliar parâmetros relacionados à indução de morte celular (integridade de membrana, externalização de fosfatidilserina, ativação de caspases) das moléculas em estudo;
V. Avaliar o efeito oxidante das moléculas em estudo através da geração de EROS e indução de dano oxidativo;
VI. Avaliar a citotoxicidade de 48 horas dos 2 Selênio-compostos nas células em monocamadas (2D) nas linhagens Caco-2 e HT-29 para selecionar a concentração de tratamento de células no modelo tridimensional (3D).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Síntese de MRK-104 e MRK-107

A síntese dos compostos foi realizada no Laboratório de Síntese e Transformações de Moléculas Orgânicas no Instituto de Química da UFMS, o responsável pela síntese foi o prof. Dr. Jamal Rafique. A síntese foi realizada através da fusão de imidazo[1,2a]piridinas com o selênio por meio de selenilação/sulfenilação da ligação C(sp2)-H de imidazo[1,2-a]piridinas de acordo com publicações anteriores e baseada em calcogenação da ligação C (sp2) –H catalisada por KIO3, uma abordagem alternativa e mais sustentável, permitindo a utilização de glicerol em quantidade estequiométrica na ligação de indol (Figura 14) [188; 189; 190; 191].

Figura 14. Calcogenação indol e a imidazo[1,2-a]piridina catalisado por KIO_3 a 110°C por 6-14 horas.



4.2. Reagentes químicos, anticorpos, células e equipamentos

Anexina V ligada ao FITC, Laranja de acridina (AO), Brometo de etídeo (BE), ácido til-barbitúrico (TBA), ki-67, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 2,7-diacetato de diclorofluorescina (DCFH-DA), 7AAD, dimetil sulfóxido (DMSO), meio de cultivo Dulbecco's meio de Eagle modificado (DMEM), agarose de baixo ponto de fusão (LMP), iodeto de propídeo (PI), solução salina tamponada com fosfato (PBS), estreptomicina e penicilina, Triton X-100, Tripsina, Tris, Filtros com poros de 0,22 µm, Placas de 6, 12, 24 e 96 poços Corning, Inc., bicarbonato, albumina fetal bovina (BSA) e azul de tripan foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Soro bovino fetal (FBS), Sulforrodamina B (SRB), HEPES, GlutaMAX^{TM}, da Invitrogen, Thermo Fisher Científica (Waltham, EUA).

As linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 (HTB-37, ATCC®) e HT-29 (HTB-38, ATCC®) cultivadas a partir do número de passagem 10, visando evitar as variações genéticas. A linhagens celulares de fibroblasto humano HFF-1(SCRC-1041®) cultivada a partir do número de passagem 5 e fibroblasto murinho NIH/3T3 (CRL-1658®) a partir do número de passagem 13. Linhagem de carcinoma hepatocelular HepG2 (HB-8065®) utilizadas no número de passagem 10,

linhagem de adenocarcinoma prostático PC-03 (CRL-1435®) a partir do número de passagem 8, linhagem de adenocarcinoma renal 786-0 em culturas com o número de passagem 14 (CRL-1932®).

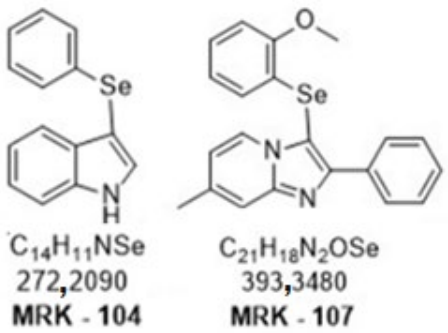
Vários instrumentos foram utilizados nos experimentos, incluindo microscópio biológico invertido (Axiovert 40 C-Zeiss, Alemanha), microscópio de fluorescência (BX41- Olympus, Japão), leitor de microplaca (Expectramax 190), Citômetro (CytoFLEX S). Softwares Oringin 6.0, Graph Pad Prism 5.0, Flowdjo, analisador de imagem (ImageJ).

4.3. Preparo das amostras

Os compostos-teste foram ressuspendidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. No momento dos ensaios foram diluídos em meio de cultura completo e sua concentração final inferior a 0,10%(v/v).

As estruturas de Selênio-compostos escolhidas foram a MRK-104 e MRK-107 fenilselenil-1H-indol e imidazo[1,2-a]piridina (Figura 15), relativo à suas respostas ao ensaio de SRB.

Figura 15. Selênio-compostos, fórmula, peso molecular e suas estruturas.



Fonte: Rafique (2022)

4.4. Linhagens celulares

Foram utilizadas para rastrear a atividade dos Se-compostos as linhagens celulares de fibroblasto humano HFF-1(SCRC-1041®) cultivadas a partir do número de passagem 5 e fibroblasto murinho NIH/3T3 (CRL-1658®) a partir do número de passagem 13. Células de carcinoma hepatocelular HepG2 (HB-8065®) cultivadas a

partir do número de passagem 10, linhagem de adenocarcinoma prostático PC-03 (CRL-1435®) a partir do número de passagem 8, linhagem de adenocarcinoma renal 786-0 em culturas com o número de passagem 14 (CRL-1932®). As linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 (HTB-37, ATCC®) e HT-29 (HTB-38, ATCC®) cultivadas a partir do número de passagem 10, visando evitar as variações genéticas.

4.5. Citotoxicidade em monocamada (2D)

No laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares Avançadas foi realizado um rastreio prévio utilizando as linhagens de cancer colorretal Caco-2, HT-29, linhagens referentes ao câncer hepático HEPG2 e prótatico PC-03, além de linhagens de fibroblastos não tumorais humano HFF-1 e murino NIH/3T3. Essas linhagens celulares foram cultivadas até o momento proliferativo para que fossem tratadas com Selênios-compostos MRK-104 e MRK-107. Através do ensaio de sulforodamina B (SRB) a atividade antiproliferativa/citotoxica pode ser calculada no tempo de 48 horas [192; 193]. As células em sua fase log de crescimento são avaliadas com azul de Tripan para contagem e viabilidade celular. As células viáveis (impermeáveis ao corante), são semeadas em densidade de $5X10^5$/mL em placas de 96 poços. Uma das placas foi utilizada como placa T0 (densidade celular no momento do tratamento) que representa o crescimento celular no período de 24 horas e usado para no cálculo final de obtenção do parâmetro de GI50. No momento de leitura da placa TO as outras placas, denominadas placas teste. Outros parâmetros utilizados no experimento foram o branco da amostra, ou seja, células não tratadas, o branco do tratamento (reagente) e o controle positivo de atividade antiproliferativa, que são células tratadas com doxorrubicina nas concentrações de 0,0046; 0,046; 0,46 e 4,6 µM. Em linhagens celulares não tumorais o efeito dos selênio-compostos foram avaliados em concentração maior do que de 1000 µM para melhor estimativa da citotoxicidade. A leitura da viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico SRB e as absorbâncias geradas pelo leitor de microplacas. Os dados são apresentados como viabilidade proporcional (%) comparando o grupo tratado com células não tratadas e excluindo o crescimento celular antes do tratamento (T0). Dado as 48 horas em tratamento, as células foram fixadas em TCA 20%. Após 30 minutos essas placas foram lavadas com água cinco vezes e deixadas secar ao ar, em

seguida, coradas pela adição de 50 µl da solução de SRB [0,4% de SRB (p/v) em ácido acético a 1% (v / v)] aos poços durante 30 minutos. A retirada de excesso de corante foi realizada com lavagens com ácido acético a 1% por cinco vezes e deixado secar ao ar. O corante ligado foi solubilizado com 10 mmol de base Tris (pH 10,5, Sigma Chemical Co.) antes da leitura das placas em 540nm.

4.6. Cálculo do índice de seletividade (IS)

No ensaio anterior foram obtidas as GI50 para as quatro linhagens Caco-2, HT-29, HFF-1 e NIH/3T3. O índice de seletividade (SI) pode então ser calculado pela razão entre a taxa de GI50 do composto-teste determinado para linhagem celular não-tumoral e a GI50 de células cancerígenas. O SI> 2 indica que a substância testada é mais seletiva para células cancerígenas, sugerindo uma ausência de tocixidade às células normais e menor incidência de efeitos adversos relacionados ao mecanismo de ação [106; 194]. Os mesmo pesquisadores citados anteriormente orientam que o SI quando acima de 10 é uma molécula de interesse potencial para estudos pré-clínicos de atividade anticancer.

Equação 1. Cálculo do Índice de Seletividade.

$$IS = \frac{GI50\ células\ normais}{GI50\ células\ neoplásicas}$$

4.7. Recuperação/Reversibilidade pelo ensaio de SRB

Esta metodologia avalia a capacidade de recuperação na proliferação após as células ficarem expostas aos selênio-compostos em concentrações já avaliadas, as células Caco-2 e HT-29 foram tratadas em concentrações maiores MRK-104= 0,91-918,54 µM e MRK-107= 0,635-635,57 µM, então o meio foi removido e substituído por meio fresco sem droga por 48 horas adicionais [195]. A taxa de recuperação celular foi avaliada pelo teste SRB e comparadas entre placas após 48 horas de tratamento com a placa que foi lavada e mantida 48 horas em cultivo adicional. Para interpretação da metodologia encontraremos efeito citocida ou citostático, o efeito depende da

concentração do selênio-composto e irá avaliar a formação de novas colônias celulares.

4.8. Observação da morfologia das células

Após estabelecido as concentrações geradas pelos parâmetros de porcentagem de atividade antiproliferativa nas células Caco-2 e HT-29, o tratamento foi realizado com concentração referente a GI50 e ao dobro da GI50 em μM de compostos MRK-104 e MRK-107, 3,68 μM de doxorrubicina como controle positivo e poços de controle negativo onde foi preenchido com meio de cultura para incubar no período de 48 horas. Dado o tempo desejado foi realizado registros fotográficos da microscopia invertida na ampliação de 1000x para análise a fresco.

4.9. Ensaio clonogênico

Para avaliar a capacidade em inibir a formação de colônias células tumorais da linhagem Caco-2 e HT-29 foram semeadas 500 células em 3 mL em placas de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% CO^2 por 24 horas em estufa de cultura de células [196]. Após o período, foram adicionados os tratamentos de concentração referente a GI50 e o dobro da GI50 em μM de compostos MRK-104 e MRK-107de cada Se-composto, para o controle positivo 3,68 μM de doxorrubicina e as células foram mantidas nas condições descritas anteriormente por um período de 48 horas. Posteriormente o meio foi removido, a célula lavada delicadamente com tampão fosfato salina (PBS) e na sequência foi adicionado o meio de cultura com 10% de FBS. As células foram novamente incubadas na mesma condição por 9 dias. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e após lavagem com PBS, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta a 5% por 5 minutos. As colônias foram contadas, o cálculo foi realizado de acordo com as células restantes em comparação com os poços sem tratamento e com o controle positivo. As células foram fotografadas sob microscópio invertido após 9 dias.

4.10. Ensaio de cicatrização

As células Caco-2 e HT-29 foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 2 x 10^5 células/poço e cultivadas até 80% de confluência a 37° C. O meio de cultura foi descartado e a monocamada de células foi raspada com uma ponteira para criar uma fenda lacunar em linha reta para que o comportamento das células fosse observado ao longo do tratamento [197]. Para que as células se estabilizassem os poços foram preenchidos cuidadosamente com meio de cultura suplementado e as placas foram armazenadas na incubadora por 2 horas. Assim foi planejado as placas com poços de controle negativo, poços com o tratamento referente a GI50 e ao dobro da GI50 em μM de compostos MRK-104 e MRK-107 e poços tratados com 3,68 μM de doxorrubicina como controle positivo por 48h. A migração subsequente das células na área arranhada foi fotografada nos tempos 0 e 72 horas e para tratamento com a linhagem celular 3T3/NIH 0, 16 e 48 horas em microscópio e mensurada com auxílio do software ImageJ.

4.11. Marcação com ki-67

Foi semeado uma densidade de 5x10^5 células em 3 mL de Caco-2 e HT-29 em placas de 12 poços. O tratamento foi realizado com concentração referente a GI50 e ao dobro da GI50 em μM de compostos MRK-104 e MRK-107, 3,68 μM de doxorrubicina como controle e poços de controle negativo onde foi preenchido com meio de cultura por 48 horas [198]. O sobrenadante foi retirado e as células expostas a solução de tripsina para desprendimento e alocadas em tubos microtubos para centrifugação. O *pellet* foi ressuspendido em 200 μL de PBS pré-diluído de anticorpo ki-67 a concentração de 0,25 μg/mL e DAPI por 30 minutos no gelo e ao abrigo da luz. O sobrenadante foi removido e 300 μL de PBS foi acrescentado para leitura em citômetro de fluxo Beckman Coulter no filtro de 600 nm em 20.000 eventos.

4.12. Marcação com 2',7' diacetato de diclorofluoresceína

As células das linhagens Caco-2 e HT-29 na densidade de 5x10^5 células presentes em 3 mL foram plaqueadas em placas de 6 poços. No tempo de 24 horas de cultivo foram tratadas com GI50, dobro da GI50 em μM de MRK-104 e MRK-107, controle positivo com 3,68 μM de doxorrubicina e controle negativo por 48 horas. As células foram lavadas em PBS e marcadas com 5 μL de 2',7' diacetato de

diclorofluoresceína (Life Technologies) diluídos em DMSO a 0,15% e analisados no comprimento de onda relativo a 517–527 nm. A densidade celular após o tratamento não foi contada, as células coradas foram fotografadas em microscópio de fluorescência [199].

4.13. Marcação com Caspase 3/7

A atividade da caspase-3/7 foi detectada pelo reagente de detecção CellEvent™ Caspase-3/7 Green (Life Technologies). As células Caco-2 e Ht-29 (1×10^5 células em 2 mL) foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com GI50, dobro da GI50 em µM de MRK-104 e MRK-107, controle negativo e 3,68 µM de doxorrubicina por 48h. Após a incubação o meio de cultura foi retirado e as células que estavam aderidas em monocamada foram marcadas com 100 µL/poço do reagente diluído na concentração de 0,2nM e observadas sob um microscópio de fluorescência no filtro de comprimento entre 502 a 530 nm [200].

4.14. Marcação com Laranja de acridina e iodeto de propídeo

Para essa análise de fluorescência. 5×10^5 células a cada 3 mL foram semeadas em placas de 6 poços utilizando o meio DMEM. O tratamento foi na concentração de GI50, dobro da GI50 em µM de MRK-104 e MRK-107, respectivamente, controle negativo e 3,68 µM de doxorrubicina por 48 horas. Após o tratamento as células foram observadas em microscopia óptica com 1 µL de laranja de acridina (1mg/mL) e 1 µL de iodeto de propídeo (1mg/mL) no comprimento de onda 460/650 nm e fotos foram armazenadas para análise posterior [201].

4.15. Anexina V FITC

A morte celular apoptótica em culturas de linhagem celular Caco-2 e HT-29 foi determinada usando o kit Anexina-V FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 5×10^5 células/mL foram semeadas em placas de 6 poços utilizando o meio DMEM. O tratamento foi com a GI50, dobro da GI50 em µM de MRK-104 e MRK-107,

respectivamente, controle negativo e 3,68 µM de doxorrubicina por 48 horas. Após o tratamento as células foram centrifugadas e ressuspendidas em tampão para adição de 5µL de Anexina-V conjugada com FITC por 30 minutos. As células foram lavadas e centrifugadas com PBS e então ao adicionar 10µL de solução de iodeto de propídeo (1mg/mL) à temperatura ambiente por 10min no escuro foram analisadas usando um citômetro de fluxo com 20 eventos no filtro de leitura entre os comprimentos de 494/518 nm (Citoflex, Beckham Coulter) [139; 202].

4.16. Geração e tratamento de esferoides

As células Caco-2 e HT-29 foram semeadas na quantidade de 2×10^6 células a cada 120 µL em molde de agarose por micromoldes (MicroTissues® 3D Petri Dish®/Sigma-Aldrich) preenchidas com DMEM suplementado com 20% de soro bovino fetal a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 [203]. Após 10 minutos de semeadura foi adicionado mais 3mL de meio DMEM 20% em cada poço contendo o micromolde. Nas 72 horas seguintes o meio foi trocado a cada 12 horas até que as interações celulares fossem estabilizadas para o tratamento. Após 5 dias, os esferoides produzidos foram colhidos e semeados em placas de 6 poços para análise das interações celulares, assim os tratamentos foram adiante. Os tratamentos escolhidos para MRK-104 (11,4 e 22,8 µM; 13 e 26 µM) e para MRK-107 (2,4 e 4,8 µM; 1,13 e 2,26 µM), representam respectivamente a GI50 obtida através do ensaio de SRB e o dobro da GI50 nas linhagens Caco-2 e HT-29. Como controle positivo doxorrubicina (3,68 µM) e esferoides não tratado. A proporção de agregação celular em diferentes pontos de tempo foi monitorada por microscopia [204].

4.17. Índice de esfericidade na linhagem Caco-2

Um teste piloto foi realizado para acompanhar a deformação das células Caco-2 após o tratamento para MRK-104 (11,4 e 22,8 µM; 13 e 26 µM), MRK-107 (2,4 e 4,8 µM; 1,13 e 2,26 µM, doxorrubicina (3,68 µM) e esferoide não tratado. Após tratamentos as imagens da cultura 3D foi possível aplicar os cálculos de esfericidade utilizando os parâmetros gerados pela análise do software ImageJ [205]. Com aplicação

das fórmulas de circunferência e índice de esfericidade já fornecidas pelo software de análises.

Equação 2. Cálculos do Índice de Esfericidade.

$$Cir = \frac{4\pi \, x \, área}{\sqrt{Perímetro^2}} \qquad IE = \sqrt{Cir}$$

Os esferoides sem intervenção devem estar com o índice de esfericidade próximo a 1, enquanto que a deformação reduz esse valor.

4.18. Atividade antiproliferativa em modelo de cultura de células tridimensional (3D)

Após os tratamentos dos esferoides para MRK-104 (11,4 e 22,8 μM; 13 e 26 μM) e para MRK-107 (2,4 e 4,8 μM; 1,13 e 2,26 μM), representando respectivamente a GI50 e o dobro da GI50 nas linhagens Caco-2 e HT-29, eles foram corados com uma solução de laranja de acridina (AO) (Sigma® Aldrich, EUA; 100 μg/mL) e de brometo de etídeo (EB) (Invitrogen, EUA; 100 μg/mL) em concentração final de 1 μg/mL. Imediatamente foram observados no escuro sob um microscópio de fluorescência (Olympus BX41) usando excitação UV seguindo protocolo [206]. A doxorrubicina (Eurofarma, Brasil) foi usada como controle positivo. Foi analisado pelo software ImageJ imagens de triplicatas de cada molde contendo 81 esferoides. A intensidade de fluorescência dos corantes foi expressa como porcentagem de células viáveis (verde) e não viáveis (vermelhas) determinadas por microscopia de fluorescência.

4.19. Ciclo celular

Para análise do ciclo celular, 2 x 10^5 células em monocamada e moldes em camada tridimensional foram incubadas em placas de 6 e 12 poços com 2 mL e 3mL, respectivamente e após 24 horas foram tratadas com as GI50 e suas concentrações em dobro de MRK-104 (11,4 e 22,8 μM; 13 e 26 μM) e MRK-107 (2,4 e 4,8 μM; 1,13 e 2,26 μM) para Caco-2 e HT-29 por 48 h em meio DMEM e 5% de soro fetal bovino, em uma incubadora com 5% de CO_2 a 37° C, também o tratamento com doxorrubicina

(3,68 µM) e o controle não tratado. Em seguida, as células foram coletadas, quando foi necessário houve uso de tripsina e lavagem com 1 mL de PBS frio, então as células de cada tratamento foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. O *pellet* foi ressuspendido com 1 mL de solução fixadora (previamente preparado 70% de etanol) e incubado a 4°C durante a noite. Após lavagem os tratamentos foram ressuspendidos em 300 µL de PBS, 5 µL de 7AAD 10 µg/mL, protegidas da luz, em a 4 ° C durante 20 minutos [159]. A análise foi por citometria de fluxo (Cytoflex) em 10.000 eventos emitidos em 546 nm representando o percentual de células de acordo com o conteúdo de DNA indicado pela intensidade de fluorescência.

4.20. Caspase-3 (filtro PE)

Para os esferoides a ativação de caspase-3 foi analisada pelo kit PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 (BD Pharmingen™). As células Caco-2 e HT-29 ($5x10^5$ células/mL) semeadas em micromoldes 3D e após 24 horas foram tratadas com as GI50 e suas concentrações em dobro de MRK-104 (11,4 e 22,8 µM; 13 e 26 µM) e MRK-107 (2,4 e 4,8 µM; 1,13 e 2,26 µM) para Caco-2 e HT-29 por 48 h em meio DMEM e 5% de soro fetal bovino, em uma incubadora com 5% de CO_2 a 37° C, também o tratamento com doxorrubicina (3,68 µM) e o controle não tratado. Após tratamento as células foram expostas a uma solução de tripsina a 0,25% para dissociar o esferoide, após centrifugação o pellet foi permeabilizado e incubado com 20 µL de anticorpo pré-diluído em 0.2 µg/mL. A caspase ativada foi analisada por citometria de fluxo em 30.000 eventos no comprimento de 576 nm [207].

4.21. Marcadores de estresse oxidativo

A densidade celular semeada foi de $2x10^6$ de células Caco-2 e HT-29 a cada 120 µL nos moldes imersos em 3 mL de meio de cultivo DMEM, após 24 horas foram tratadas com as GI50 e suas concentrações em dobro de MRK-104 (11,4 e 22,8 µM; 13 e 26 µM) e MRK-107 (2,4 e 4,8 µM; 1,13 e 2,26 µM) para Caco-2 e HT-29 por 48 h em meio DMEM e 5% de soro fetal bovino em uma incubadora com 5% de CO_2 a 37° C, também o tratamento com doxorrubicina (3,68 µM) e o controle não tratado.

Para medidas de estresse oxidativo as defesas antioxidantes bem como marcadores de dano oxidativo foram determinados em homogeneizado de esferoides preparados em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4, 0,1% triton X-100, 150 mM de NaCl, em leitor de placas. A concentração de proteínas totais (PT) de interesse foi estabelecida a 2 mg/mL e mensurada por uma curva padrão de albumina [208].

4.21.1. Marcador de dano oxidativo por lipoperoxidação

Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados foi espectrofotometria no comprimento de onda 535 nm. no homogeneizado de esferoides pelo método do ácido tiobarbitúrico [209]. A quantidade de TBARS foi determinada usando um coeficiente de extinção molar de 153 mM− 1.cm−1[210]. O método consiste em a precipitação tecidual com TCA 12% a reação foi realizada em um volume final de 300 µL seguido de incubação com ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,73%, a 100ºC, por 60 minutos em tampão fosfato a pH 7,4 (60 mM Tris-HCl e 0,1 mM DPTA (Dietileno- ácido triaminopentacético) e banho gelado de 10 minutos. Todos os tratamentos foram centrifugados (5 min, 10.000 × g) e o sobrenadante foi submetido a leitura em espectrofotômetro no comprimento de 535 nm. O branco com o tampão fosfato foi descontado dos cálculos de concentração para que o cromóforo rosa em triplicata não sofresse interferência. Os valores obtidos foram expressos em nmol TBARS/mg de proteína.

4.22. Análise estatística

A análise estatística foi aprimorada com o auxílio do software Origin versão 6.0 e Graph Pad Prism 5.0 na construção de tabelas e gráficos.

Para calcular os valores de GI50, foram feitas regressões não lineares das médias dos valores de crescimento celular encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes.

Para comparar os valores in vitro foi usado o teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey. Em todos os métodos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p obtido for menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Atividade antiproliferativa dos Se-compostos para as linhagens celulares

A coloração com SRB permitiu o rastreio da atividade antiproliferativa nos tratamentos com Selênio-compostos nas concentrações 0,1 a 1000 µM. Em 48 horas foi possível acompanhar as modificações de crescimento ou inibição celular de cada um dos compostos testados em comparação ao controle negativo e positivo (doxorrubicina). Esses dados geram o parâmetro GI_{50} (concentração que inibe 50% da proliferação celular e desconta o crescimento celular anterior ao tratamento). As GI_{50} obtidas do tratamento com os Se-compostos perante algumas linhagens estão descritas na tabela a seguir (Tabela 1)

Tabela 1. A atividade antiproliferativa dos Se-compostos contra um painel de linhagens celulares pelo ensaio de Sulforrodamina B após tratamento de 48 horas.

Linhagens celulares	GI50 (µM) MRK-104	GI50 (µM) MRK-107	Doxorrubicina (µM)
Caco-2	11,40 ±1,68	2,40 ±0,57	1,25 ±0,42
HT-29	13,01 ±1,71	1,13 ±,16	1,76 ±0,40
HepG2	833,92 ±1,12	577,09 ±1,26	4,17 ±0,35
HFF1	>918,41	>635,57	4,03 ±0,21
PC-03	41,85 ±6,98	122,79 ±0,20	0,72 ±0,63
NIH/3T3	18,89 ±5,82	22,19 ±4,18	2,19 ±0,18
786-0	119,61±1,42	57,91 ±3,33	0,06 ±1,81

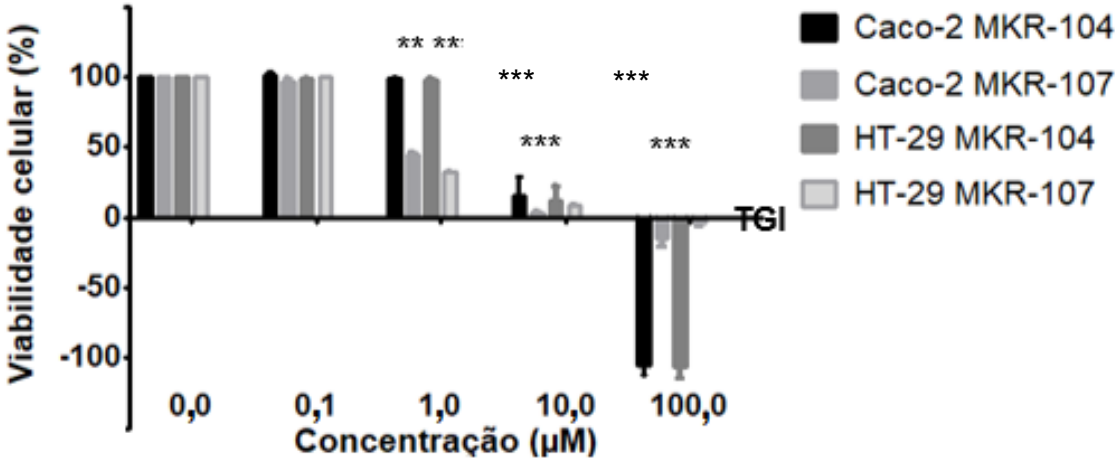
Linhagens celulares tumorais: Caco-2 e Ht-29 (cólon), HepG2 (fígado), 786-0 (rim), PC-03(próstata); Linhagens não tumorais: HFF1 (fibroblasto humano), NHI/3T3 (fibroblasto murino). Os resultados são apresentados como média ± SD e a doxorrubicina como controle positivo.

De acordo com a Tabela 1 os resultados demonstram uma atividade antiproliferativa mais efetiva pelas células das linhagens Caco-2 e HT-29 em monocamada. Em células NIH/3T3 a atividade citotóxica para MRK-104 e MRK-107 foram moderadas. As células PC-03, 786-0 variam de moderada a baixa atividade antiproliferativa. Em HepG2 e HFF-1 os selênio-compostos possuem baixa interferência antiproliferativa.

No gráfico observamos que a maior concentração de 100 µM de MRK-104 inibe o crescimento além do limiar de DL50 e MRK-107 inibe 100% da população de células

cancerígenas ao ultrapassar a limiar de TGI. A imagem abaixo representa esta resposta celular (Figura 16).

Figura 16. Análise regressiva não-linear do ensaio de SRB em células de câncer de cólon, Caco-2 e HT-29 tratadas com Se-compostos (MRK-104 e MRK-107) no tempo de 48h nas concentrações de 0,1;1;10 e 100 µM (*** p < 0,0001).



5.2. Índice de seletividade

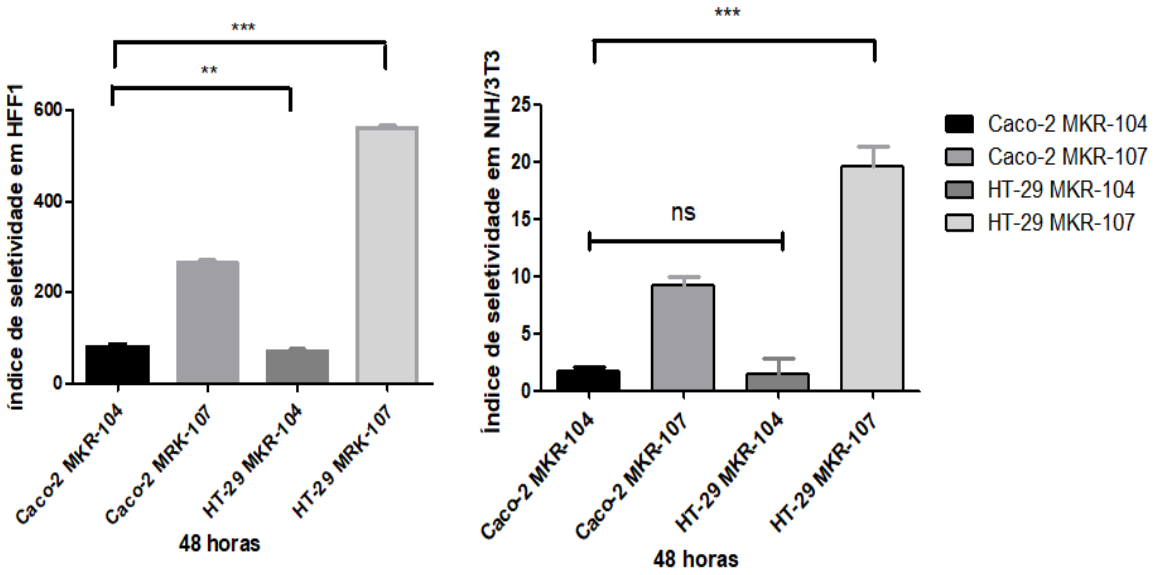
Ao realizar os cálculos da análise antiproliferativa pode-se obter resultados de GI_{50} de cada linhagem tumoral e com a finalidade de gerar o parâmetro nomeado como índice de seletividade dos compostos em 48h foi aplicado a equação da razão das GI_{50} de células neoplásicas entre células não neoplásicas (HFF-1 - SCRC-1041 ATCC® e NIH/3T3 CRL-1658 ™ - fibroblastos) que foi descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Índice de seletividade obtido na cultura de monocamada entre a atividade antiproliferativa encontrada nas linhagens HFF-1, NHI/3T3, Caco-2, HT-29 e HepG2 no tratamento de Selênio-compostos em 48h. Os resultados são apresentados como média ±DP.

Índice de Seletividade	MRK-104	MRK-107	Doxorrubicina
HFF1/Caco-2	80,56 ±4,41	264,82 ±5,22	3,22 ±0,21
HFF1/HT-29	70,59 ±4,82	562,45 ±5,65	2,29 ±0,15
NHI-3T3/Caco-2	1,65 ±0,32	9,24± 1,26	2,29 ±0,41
NIH-3T3/HT-29	1,45±0,35	19,63 ±0,47	3,22 ±0,11
HepG2/Caco-2	73,15 ±3,22	240,45 ±5,54	2,29±0,13
HepG2/HT-29	64,10 ±2,84	510,70 ±4,93	3,33 ±0,16

O composto MRK-104 foi o menos seletivo com apenas 1,65 e 1,45 de IS em fibroblasto murino, NIH-3T3 (Figura 15). Os compostos demonstraram excelente índice de seletividade na razão em HFF-1 e em relação a linhagem correspondente a função hepática (HepG2) houve baixa toxicidade, apesar de ser uma célula neoplásica podemos sugestionar que a toxicidade neste órgão não ocorre. Na figura 17 os gráficos mostram dados da tabela anterior, onde é evidenciado que nas células HT-29 a razão da seletividade foi maior, lembrando que essa linhagem gera 29% de secreção de mucinas. Há diferença estatística entre os tratamentos, com exceção de MRK-104 na linhagem NIH/3T3.

Figura 17. Índice de seletividade obtido na cultura de monocamada entre a citotoxicidade encontrada nas linhagens HFF-1 e NHI/3T3 no tratamento de MRK-104 e MRK-107 em 48h. Os resultados são apresentados como média ±DP (* p <0,05, ** p<0,001, *** p < 0,0001), ns= não há significância).



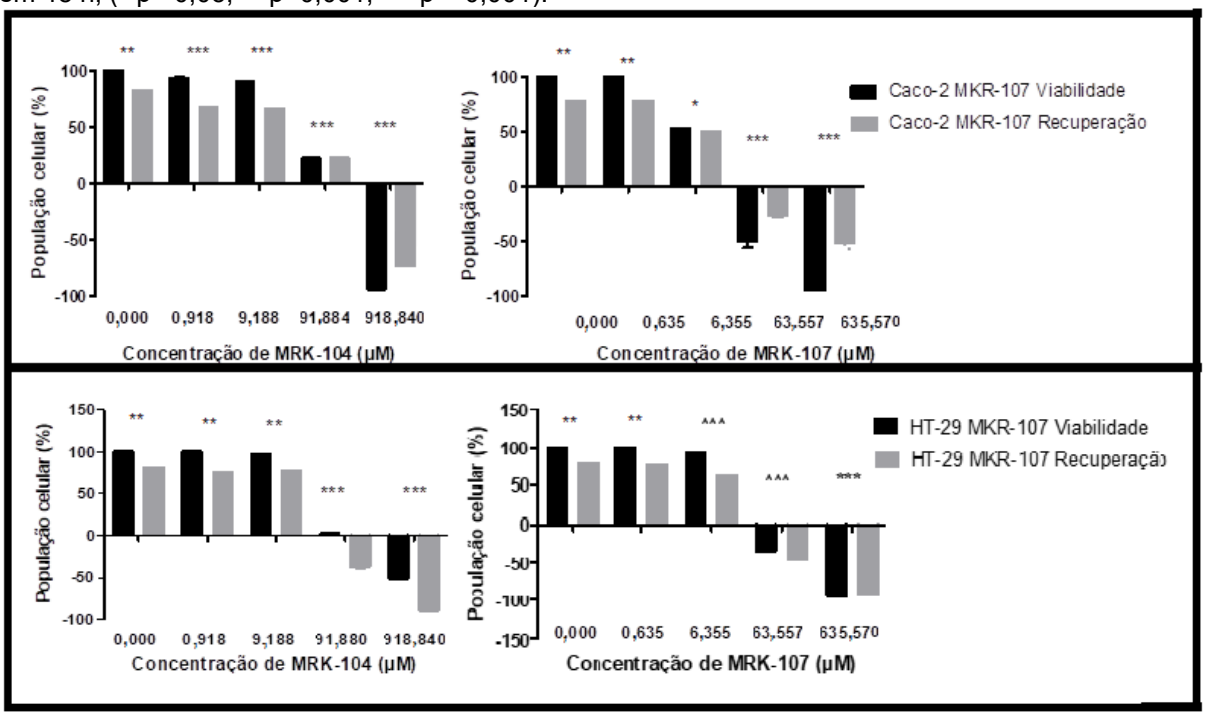
De acordo com os ensaios de atividade antiproliferativa e seletividade prosseguimos com nossas células de interesse, as linhagens de câncer de cólon Caco-2 e HT-29.

5.3. Viabilidade/Recuperação

As taxas de crescimento celular após 48 horas de tratamento com os Se-compostos nas concentrações de 0,1-1000 µM foram comparadas quanto a capacidade de recuperação após lavagem e retirada do tratamento, onde as células permaneceram em mais 48 horas de cultivo. Apesar de haver comparações

significativas entre o tratamento antiproliferativo e recuperação, a recuperação abaixo de 50% neste teste demonstra que a recuperação foi lenta e de fato gerou uma interferência efetiva no tratamento que as linhagens celulares foram submetidas. A quantidade relativa de células demonstra que o efeito foi considerado irreversível após o período de recuperação (Figura 18).

Figura 18. Ensaio de viabilidade e recuperação celular de MRK-104 e MRK-107 nas linhagens Caco-2 e HT-29 (0,1-919 µM) em 48h foi lavado e após 48h comparado com a viabilidade celular de 48 h; porcentagem de viabilidade das células Caco-2 e HT-29 após tratamento c com MRK-104 e MRK-107 em 48 h; (* p <0,05, ** p<0,001, *** p < 0,001).



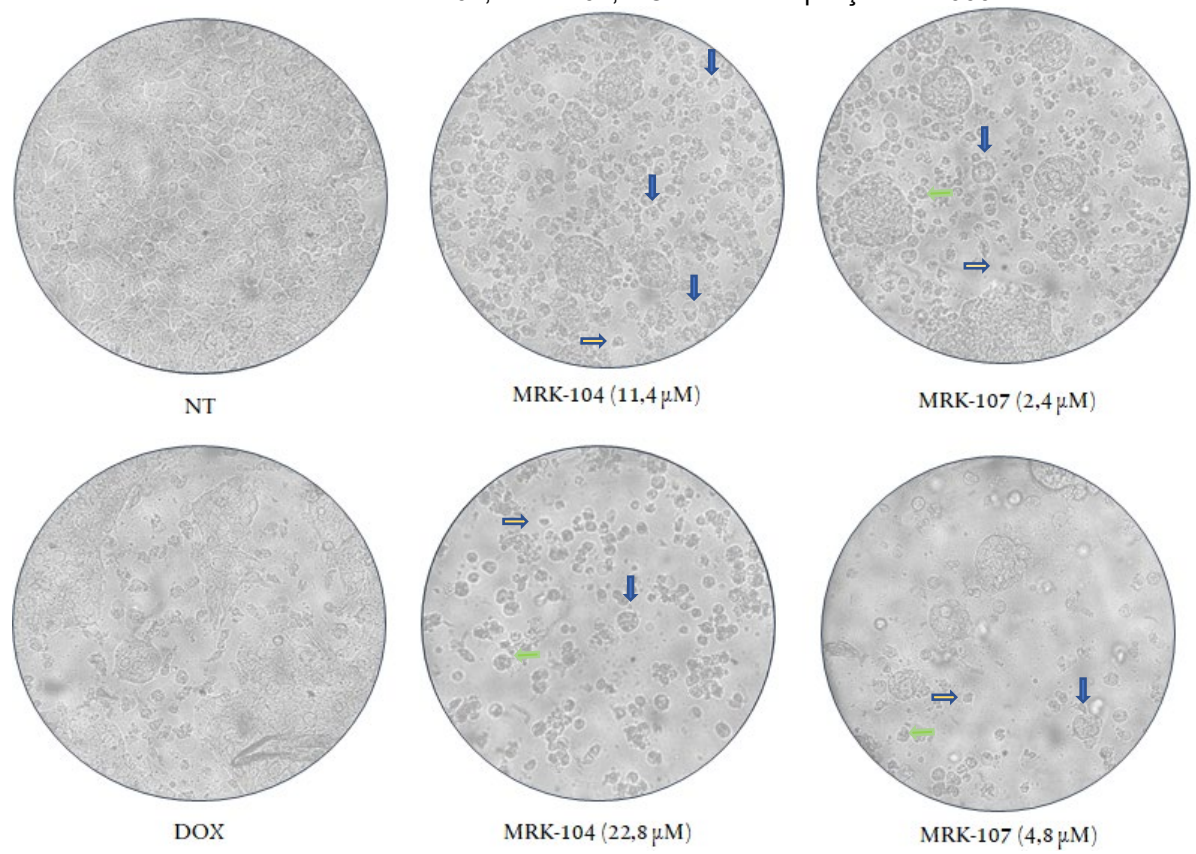
A viabilidade é significativa entre as concentrações de MRK-104 e MRK-107 no tratamento para ambas as linhagens celulares de câncer de cólon Caco-2 e HT-29. A recuperação menor do que 50% demonstra que o tratamento interferiu na proliferação celular e alterou o ciclo celular das células.

5.4. Observação da morfologia das células

As células cultivadas em condições padrão sem adição de tratamento foram usadas como células controle. A viabilidade celular foi avaliada por sua morfologia e atividade funcional via microscopia óptica. A monocamada estava confluente no momento de tratamento e após 48 horas a visualização indica efeitos citotóxicos em ambas as linhagens celulares utilizadas Caco-2 e HT-29. As células em meio DMEM mantiveram características semelhantes quanto ao tamanho de citoplasma e núcleo, sem desprendimento celular e confluência, O efeito de MRK-104 na morfologia das

células com monocamada menos densa, processos de morte celular pelo desprendimento com características de atividade inflamatória e sinais de apoptose. É possível visualizar células de tamanhos alterados, núcleos e citoplasmas reduzidos e fragmentos celulares (Figura 19).

Figura 19. Morfologia da linha celular Caco-2 após 48 horas de cultivo em meio de crescimento contendo os tratamentos com MRK-104, MRK-107, DOX e NT. Ampliação de 1000x.



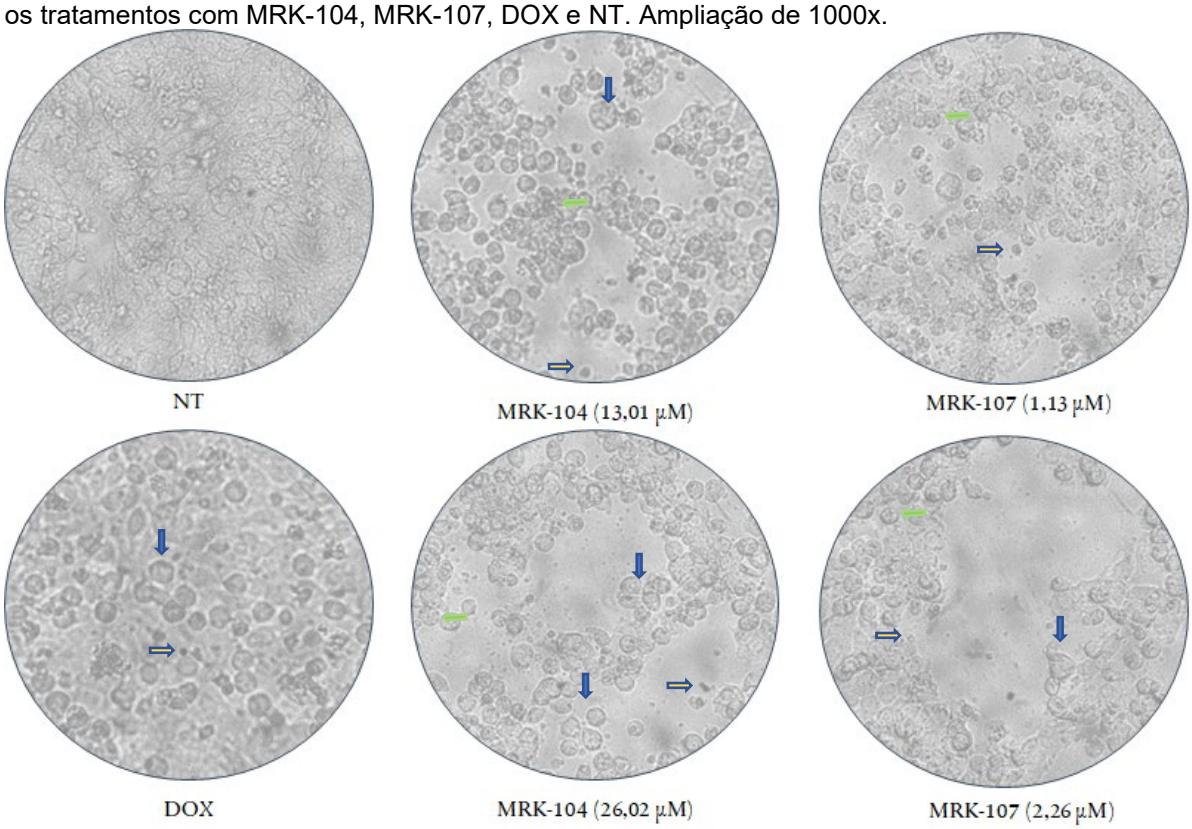
⇓ - Células túrgidas ⇨ - Células com citoplasma escasso e núcleo hipercromático
⇐ - Células multinucleadas

No tratamento com o dobro da GI_{50} a perda de ancoragem é maior e as células estão em menor quantidade, com redução citoplasmática e nuclear, há mais fragmentados celulares. MRK-107 possui células turgidas nas duas concentrações, assim como fragmentos e maior perda de ancoragem. Doxorrubicina possui maior desprendimento, com células turgidas e fragmentadas.

Na linhagem celular HT-29 (Figura 20) as células ficaram mais escurecidas, mais arredondadas e com vacúolos após os tratamentos. MRK-104, MRK-107 e DOX possuem menor aderência, fragmentos celular e área do citoplasma mais evidente em relação ao tamanho e turgidez. Muitos fragmentos celulares são encontrados no meio de crescimento, o citoplasma granular vacuolizado indica que a célula se encontra em estado suprimido. Estas observações sugerem processos de morte celular. Sendo

assim, os resultados do teste SRB são consistentes com os resultados da análise fornecendo informações morfológicas sobre os efeitos potenciais de Se-compostos e possibilidades de efeito metabólico.

Figura 20. Morfologia da linha celular HT-29 após 48 horas de cultivo em meio de crescimento contendo os tratamentos com MRK-104, MRK-107, DOX e NT. Ampliação de 1000x.

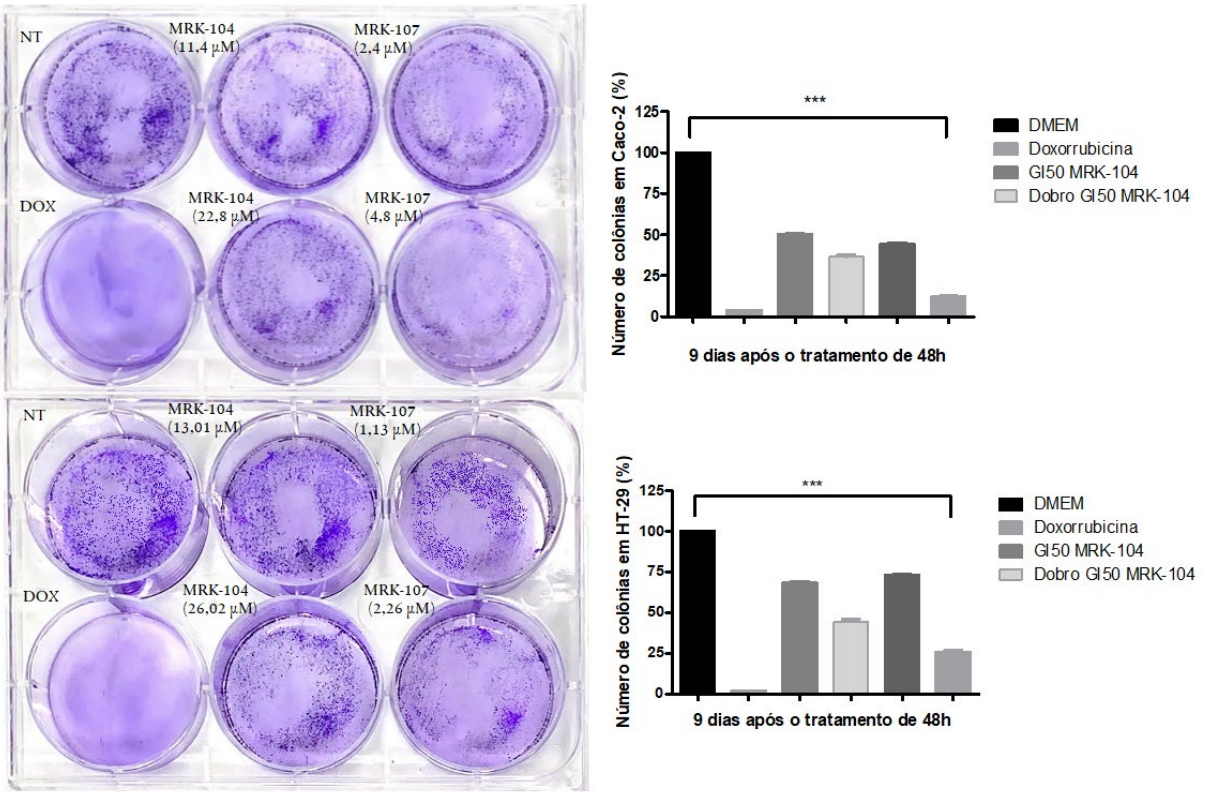


⬇ - Células túrgidas ⇨ - Células com citoplasma escasso e núcleo hipercromático
⬅ - Células multinucleadas

5.5. Ensaio clonogênico

O ensaio anterior nos mostrou que os tratamentos possuem uma atividade citotóxica pronunciada, para avaliar a resposta celular ao tratamento prolongado com os Se-compostos foi realizado o ensaio de formação de colônia (clonogênico) que evidencia as células resistentes e sua capacidade de proliferação clonogênica. O tratamento das células Caco-2 e HT-29 por 48 horas resultou em uma perda de proliferação (Figura 21).

Figura 21. Ensaio de sobrevivência clonogénica (A) após tratamento de células Caco-2 com GI_{50} e 2x GI_{50} de MRK-104 e MRK-107. (B) Gráfico de colônias coradas com cristal violeta e quantificadas pelo ImageJ. Os valores são representados como a média ± DP (*** p <0,0001, relativo ao grupo controle).

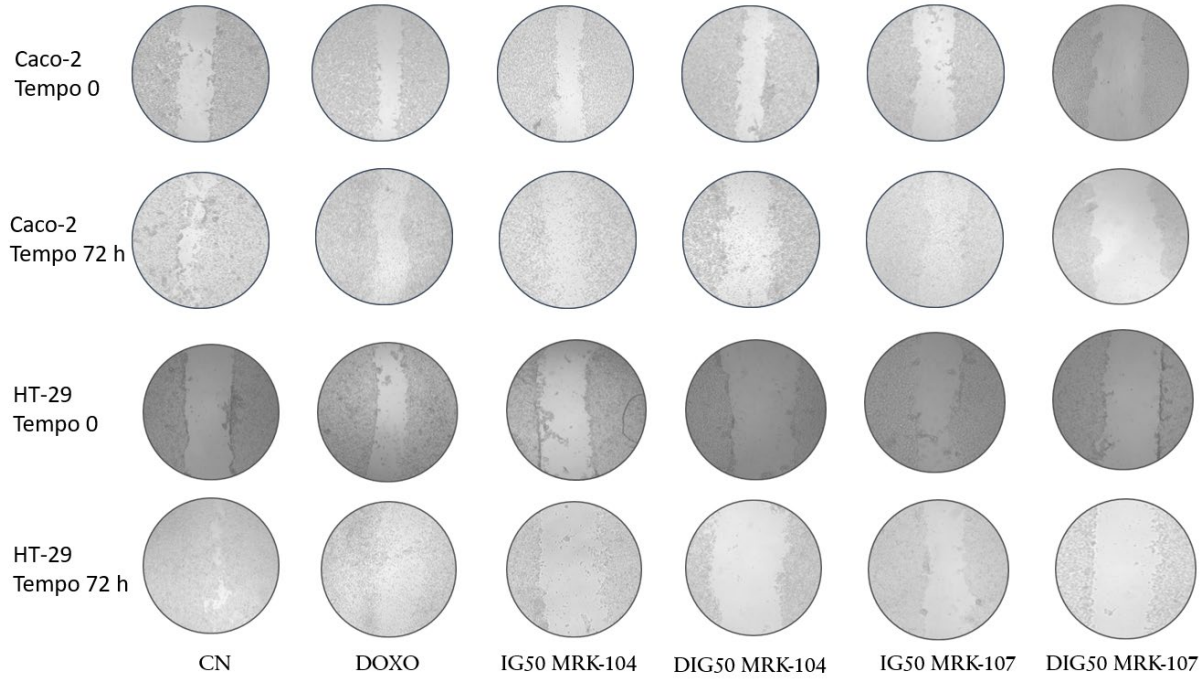


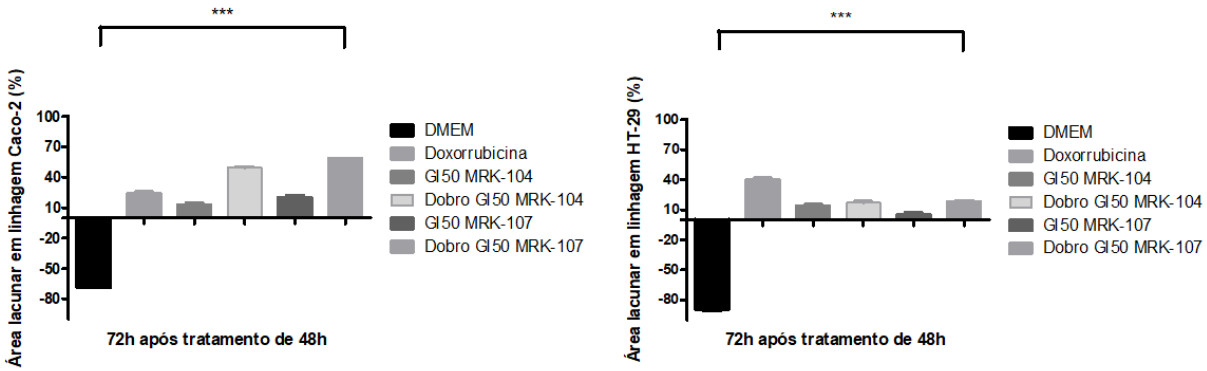
Fonte: elaborado pela autora.

5.6. Ensaio de migração (cicatrização de feridas)

O ensaio de cicatrização/migração analisa interação entre as células e a capacidade de migração celular após a formação da área lacular. Na linhagem Caco-2 o controle negativo ao fim do experimento teve sua migração em prol da cicatrização. Doxorrubicina demonstra movimentação de migração, porém as células se destacaram posteriormente. MRK-104 não migrou e sua dose de 22,8 µM fez com que a área da ferida aumentasse e células se destacassem do poço. MRK-107 demonstra um escurecimento na borda direita, destacamento de células e discreto aumento de área. Com o tratamento de MRK-107 em maior concentração há aumento evidente da área da ferida. Este ensaio em HT-29 foi visualizado a migração quase completa do controle negativo 3 dias após tratamento. Doxorrubicina teve comportamento semelhante ao anterior. MRK-104 demonstra aumento da área da ferida nas duas concentrações utilizadas e MRK-107 também. Por ser uma técnica manual e depender do efeito de aglomeração celular, efeitos de adesão célula / célula e efeitos de matriz os limites de borda foram irregulares (Figura 22).

Figura 22. Monitoramento baseado em imagem da cicatrização de feridas em tempo 0 e 3 dias após o tratamento de 48h com MRK-104 (11,4 e 22,8 µM/13 e 26 µM), MRK-107 (2,4 e 4,8 µM/ 1,13 e 2,26 µM), Doxorrubicina (3,68 µM) e não tratado nas linhagens Caco-2 e HT-29 com 1,5x 10^6 células em cada um dos 12 poços.





A imagem foi realizada ao longo de 120 horas usando contraste de fase e ampliação de 5x. (*** p <0,001, relativo ao grupo controle). Barra de escala = 100 µm.

A análise foi feita a partir da área de lacuna inicial, onde todas as áreas tiveram significância. Como esperado é possível notar a migração apenas no controle negativo, a área de DOX reduziu células e por mais que haja células entre a lacuna, as células se destacam posteriormente. As demais análises de concentração formação uma área maior do que a lacuna inicial e houve pequenas proliferações que não influenciaram o fechamento lacunar de acordo com a análise quantificada abaixo.

5.7. Índice de proliferação (KI-67)

Após o tratamento das células Caco-2 e HT-29 com GI_{50} e DGI_{50}, a marcação do ki-67 foi quantificada em seu índice de proliferação. Nas células não tratadas o PI foi maior, refletindo clinicamente em hiperproliferação, baixa diferenciação tumoral e pior prognóstico. Quando a expressão do ki-67 diminui em pelo menos 14%, pode-se considerar que houve perda da capacidade proliferativa e impacto direto na atividade do ciclo celular. MRK-104 foi tão eficaz quanto o quimioterápico Doxorrubicina reduzindo 48% da expressão do marcador KI67 na linhagem Caco-2. A análise em HT-29 mostra que na concentração de GI_{50} o marcador perdeu 24% de expressão, mas ao dobrar a concentração novamente manteve-se a eficácia equivalente ao quimioterápico DOX com 41% de redução do índice de proliferação (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de proliferação celular em Caco-2 e HT-29 em 48h de tratamento com GI_{50} e DGI_{50} de MRK-104 e MRK-107, DOX e não tratados; (a) = $p < 0,001$ em comparação ao grupo de controle negativo.

48h	Tratamentos	Índice de proliferação
Caco-2	Não tratado	2,67±.0,25
	Doxorrubicina	1,65±0,27a
	GI_{50} de MRK-104	1,66±0,33a
	DGI_{50} de MRK-104	1,64±0,28a
	GI_{50} de MRK-107	1,32±0,15a
	DGI_{50} de MRK-107	1.25±0,14a
HT-29	Não tratado	2,41±0,22
	Doxorrubicina	1,44±0,19a
	GI_{50} de MRK-104	1,83±0,18a
	DGI_{50} de MRK-104	1,42±0,22a
	GI_{50} de MRK-107	1,73±0,27a
	DGI_{50} de MRK-107	1,33±0,13a

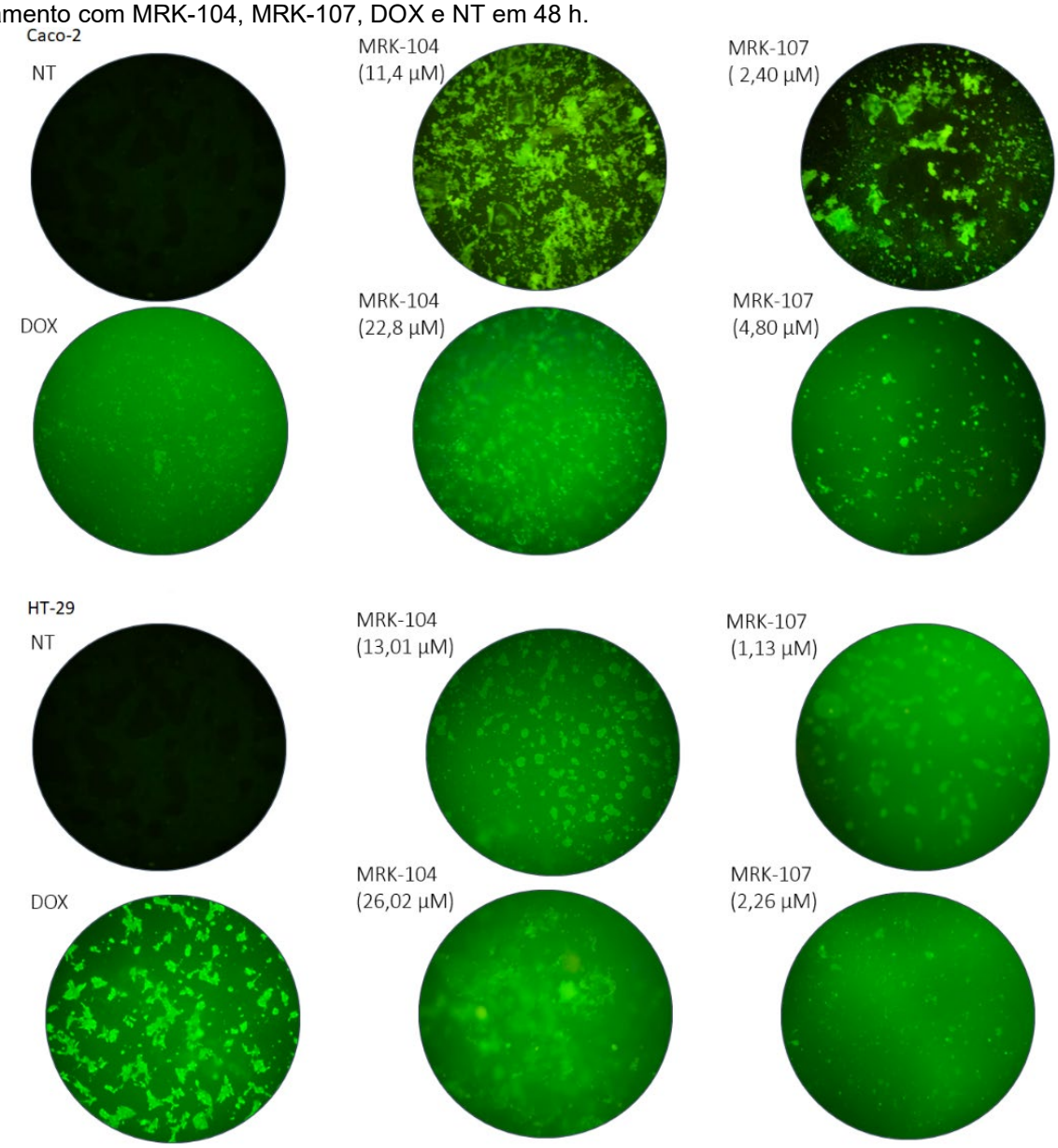
Os tratamentos com MRK-107 geram um índice proliferativo com redução de 51% e 53% na linhagem Caco-2 e 28% e 45% para HT-29, respectivamente para GI_{50} e DGI_{50}, em ambas as linhagens há redução equivalente ao quimioterápico e em Caco-2 MRK-107 é mais eficaz.

5.8. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo causado pelo tratamento das células Caco-2 e HT-29 com MRK-104 e MRK-107 foi determinado utilizando diacetato de 2,7-diclorofluoresceína, o controle negativo apresentou baixa fluorescência e o controle positivo fluoresceu com maior intensidade na linhagem HT-29 (Figura 23). Os controles sem intervenção

dos compostos são de baixa fluorescência. Em linhagem Caco-2 MKR-104 foi fluorescente em GI_{50} com maior intensidade, em DGI_{50} o composto foi efetivo na formação de EROS em células que sofreram destacamento e alteração metabólica. Em HT-29 também apresenta maior fluorescência as células com mudanças metabólicas. Nos tratamentos MRK-107, houve grande perda de ancoragem celular e a fluorescência ocorre com mais intensidade nestas células destacadas em ambas as linhagens celulares.

Figura 23. Ensaios de estresse oxidativo com DCFH-DA nas linhagens Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h.

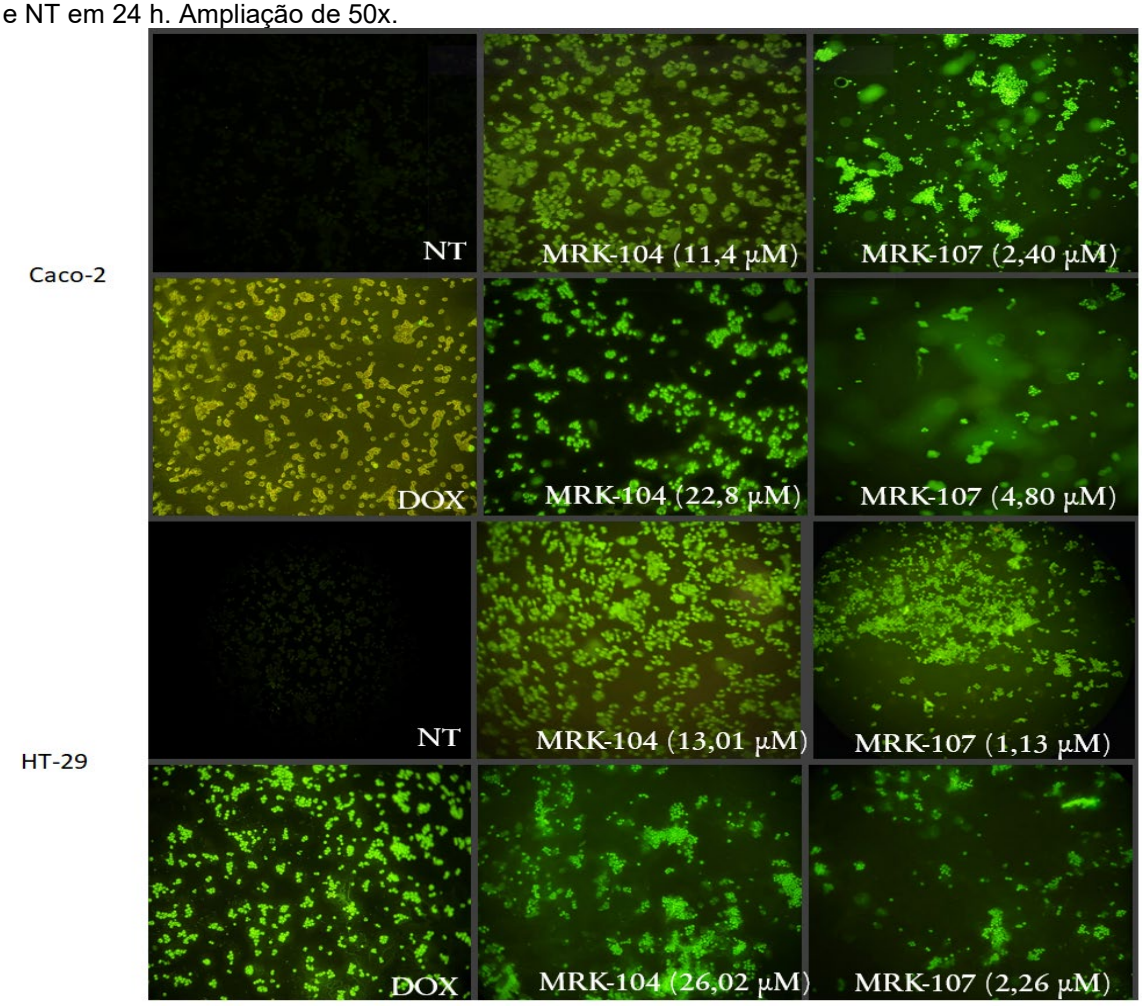


MRK-104 (11,4 e 22,8 µM/13 e 26 µM), MRK-107 (2,4 e 4,8 µM/ 1,13 e 2,26 µM), Doxorrubicina (3,68 µM) e não tratado nas linhagens Caco-2 e HT-29 com 5 x 10^5 células em cada poço. Ampliação de 50x.

5.9. Caspase 3 e 7

As células Caco-2 e HT-29 receberam os tratamentos por 24 horas e com o kit CellEvent Caspase 3 e 7 (estoque de 8mM da Invitrogen) sem protocolo de fixação, foi aplicado para análise em fluorescência. Tratamentos com MRK-104, MRK-107 e DOX apresentaram alta intensidade de fluorescência (Figura 24). MRK-104 adquiriu maior intensidade no tratamento em que a concentração tem o dobro da GI_{50} em ambas as linhagens. O MRK-107 aumentou as atividades da caspase-3 e 7 em ambas as células desde a menor concentração de tratamento e DOX demonstra uma interferência de fluorescência na linhagem Caco-2, mas em HT-29 é mais ativa.

Figura 24. Ensaios de caspase 3 e 7, Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 24 h. Ampliação de 50x.



MRK-104 (11,4 e 22,8 µM/13 e 26 µM), MRK-107 (2,4 e 4,8 µM/ 1,13 e 2,26 µM), Doxorrubicina (3,68 µM) e não tratado nas linhagens Caco-2 e HT-29 com 5 x 105 células em cada poço.

5.10. Análise de apoptose em monocamada

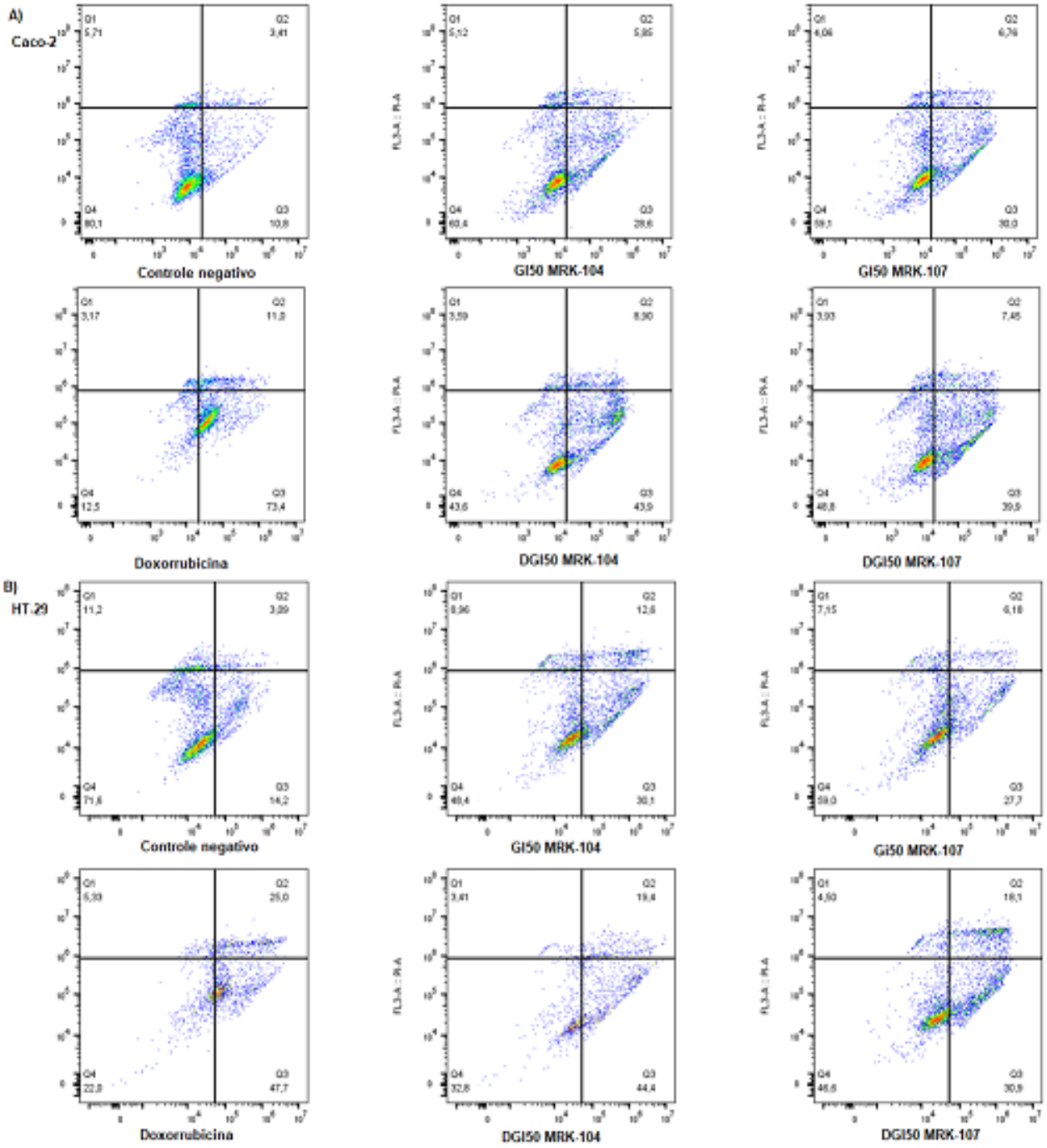
A morte celular de células Caco-2 e HT-29 foi detectada pelo kit de Anexina V nos tratamentos com MRK-104, MRK-107 e DOX. Com base nos resultados obtidos pelo ensaio SRB, as concentrações de 11,40 μM e 13,01 μM; 2,40 μM e 1,13 μM e suas duplicações de MRK-104 e MRK-107 foram aplicadas em células Caco-2 e HT-29 em cultura 2D, respectivamente. Foram 30.000 eventos analisados pelo software FlowDjo.

O gráfico se dispõe em quatro quadrantes. O quadrante superior esquerdo corresponde a intensidade da fluorescência do iodeto de propídeo que evidencia células necróticas. O quadrante inferior esquerdo não possui intensidade de fluorescência, logo quantifica as células que não estão em processo de morte celular. O quadrante superior direito gera a fluorescência de ambos os reagentes utilizados e corresponde a um processo de apoptose tardia, enquanto que o quadrante inferior direito reflete a fluorescência ocasionada pela anexina V diretamente relacionada com o início do processo apoptótico.

Os controles sem intervenção apresentam 80% e 71,6% de viabilidade para Caco-2 e HT-29, respectivamente. DOX entre 12,5% e 22%. Em Caco-2 MRK-104 houve 60,4% e 43,6% de viabilidade nos tratamentos de GI_{50} e DGI_{50}, enquanto na linhagem HT-29 foram 48,4% e 32,8% nas mesmas concentrações, respectivamente (Figura 25).

O desempenho de viabilidade encontrado para os tratamentos de MRK-107 foi de 59% em ambas as linhagens na concentração de GI_{50} e para DGI_{50} em Caco-2 foi de 48,8% e em HT-29 a porcentagem também foi próxima com 46.6% de viabilidade.

Figura 25. Ensaios de quantificação de morte celular pelo kit Anexina V e IP nas linhagens Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 24 h. MRK-104 (11,4 e 22,8 μM/13 e 26 μM), MRK-107 (2,4 e 4,8 μM/ 1,13 e 2,26 μM), Doxorrubicina (3,68 μM) e não tratado nas linhagens Caco-2 e HT-29 com 5 x 105 células em cada poço.

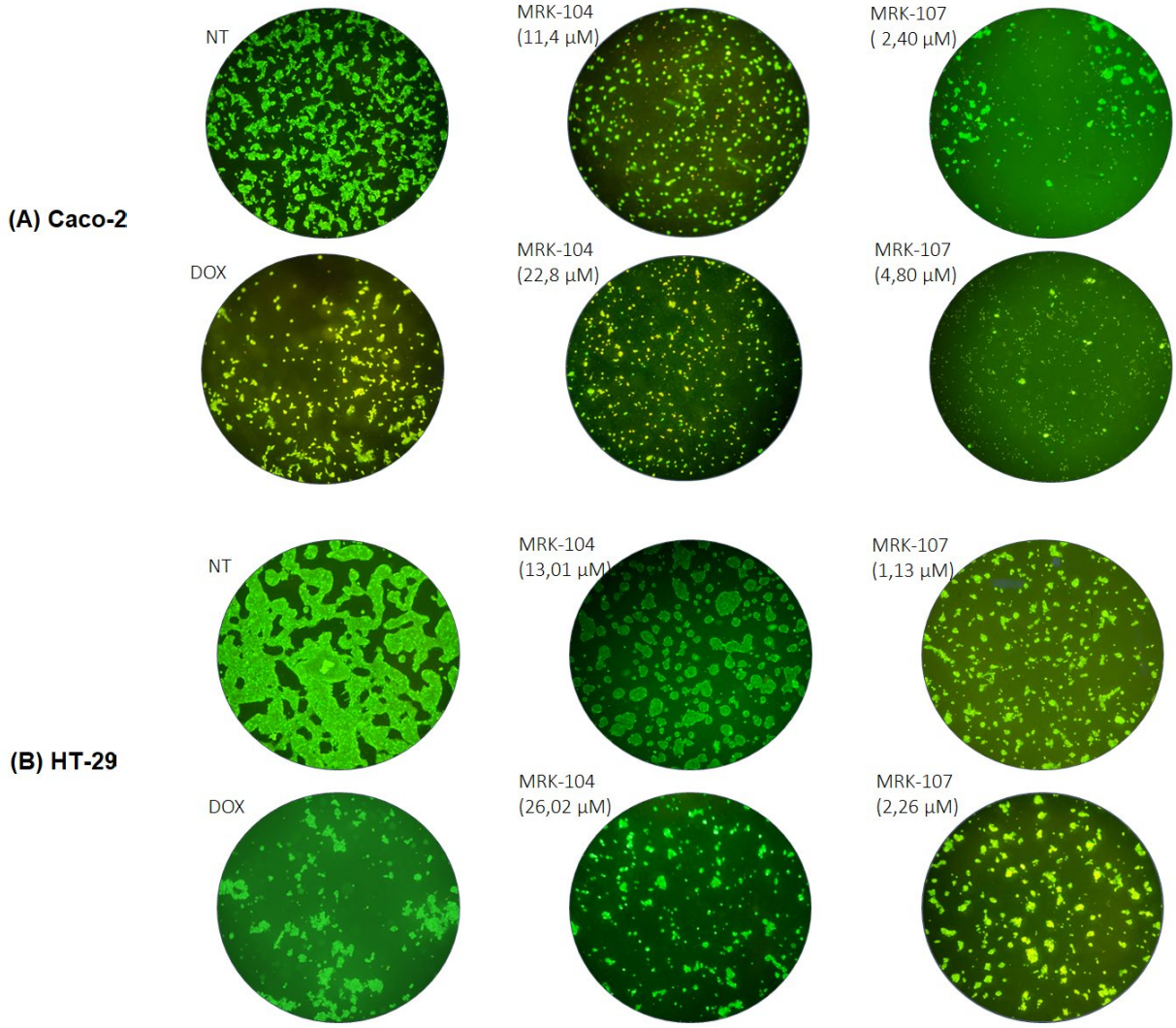


5.11. Morte celular por coloração diferencial LA/BE em monocamada

O mesmo tratamento preconizado foi aplicado novamente as linhagens de interesse na cultura em monocamada por 48h. Na figura 26 nota-se que houve perda de ancoragem proporcional à dose e células apoptóticas em estágio inicial, marcadas

por LA com coloração nuclear verde-amarelada, células apoptóticas, grânulos e corpos foram detectados após tratamento com MRK-107.

Figura 26. Ensaio de morte celular com coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo em resposta aos compostos MRK-104 e MRK-107 em monocamada de células Caco-2 e HT-29 o grupo controle negativo (células viáveis): o núcleo circular uniformemente distribuído no centro da célula. MRK-104, MRK-107 e DOX (células apoptóticas precoces): o núcleo mostrou fluorescência verde-amarelada. (A) Corante LA/BE na linhagem Caco-2 após tratamento de 48 h. (B) Corante LA/BE na linhagem HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h.

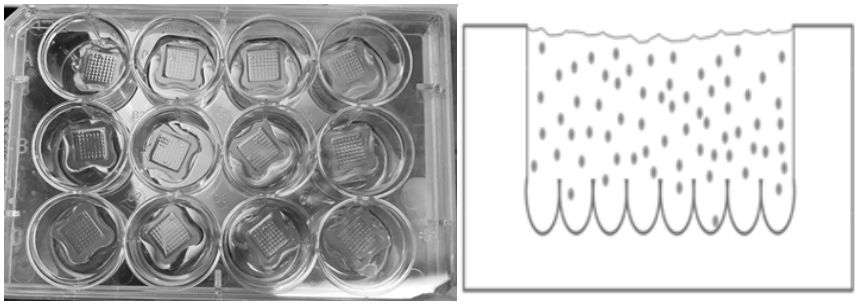


A coloração foi localizada assimetricamente dentro das células. Com concentrações e durações de tratamento crescentes, o número de células apoptóticas em estágio inicial aumentou. Células apoptóticas em estágio avançado, com coloração EB nuclear laranja concentrada e localizada assimetricamente, também foram detectadas. As células necróticas aumentaram de volume e apresentaram fluorescência vermelho alaranjada.

5.12. Padronização da cultura de células tridimensional com células de câncer de cólon Caco-2 e HT-29

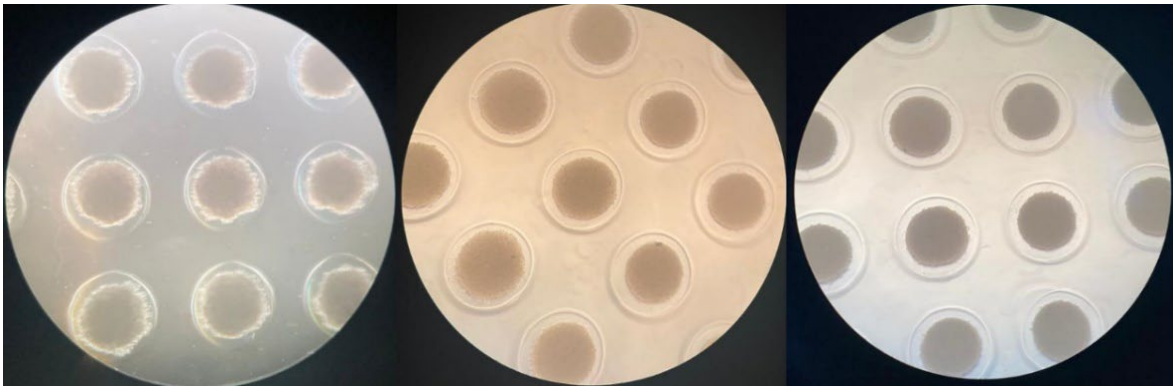
Para a padronização desta metodologia o protocolo foi aplicado com 1 a 2 milhões de células em cada molde (Figura 27) por 9 dias de cultivo e suplementação diária até que as interações célula-célula fossem estabelecidas.

Figura 27. Moldes 3D de agarose micromoldada em placa de 12 poços e sua densidade celular ao ser semeada.



Inicialmente as células foram descongeladas e mantidas nos frascos de crescimento em monocamada até atingirem a densidade celular adequada para cultivo em molde 3D $2x10^6$/molde. Em seguida estas células foram distribuídas nos moldes de agarose e mantidos por 4 a 9 dias para fusão e sobreposição com troca de meio a cada 24 horas ou quando havia alteração de pH do meio indicando consumo de nutrientes. A cultura de células 3D deve ser monitorada (Figura 28), é esperado que nos 3 primeiros dias as bordas tenham pouca definição e a camada externa sensível, após o 5° dia as camadas se agregam e as células se compactam e tornam-se mais esféricas.

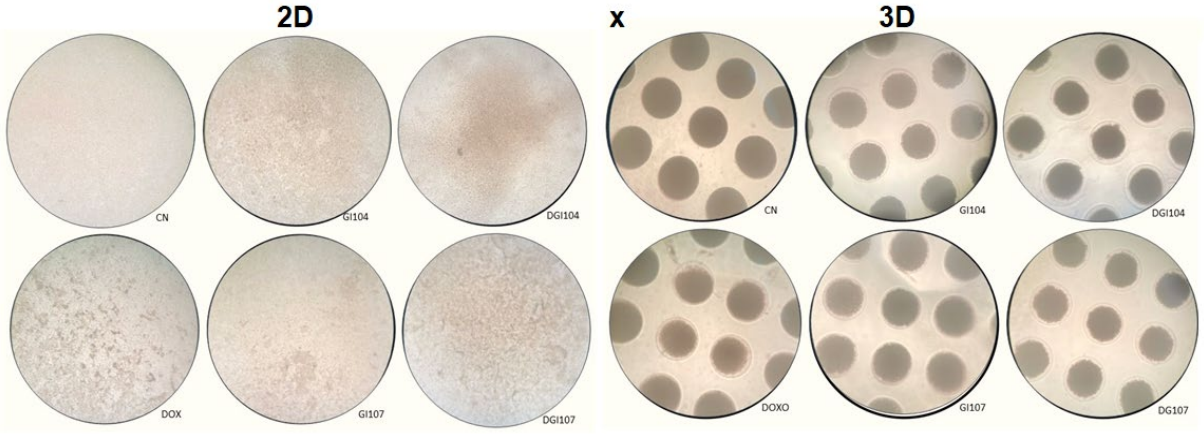
Figura 28. Padronização da cultura em moldes de esferoides até atingir interação célula-célula/ célula-matriz.



5.13. Verificação de esfericidade na linhagem Caco-2 em 3D

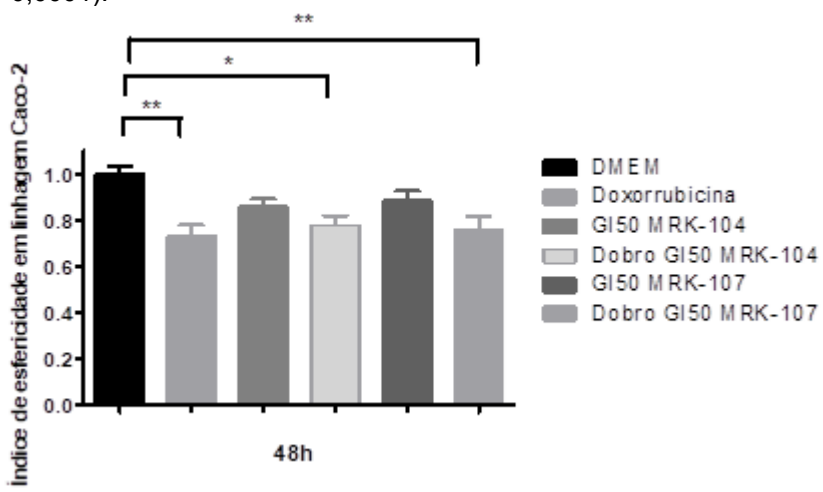
Como análise piloto após o cultivo celular foi documentado a fresco (Figura 29) os tratamentos com os esferoides na linhagem Caco-2.

Figura 29. Cultura em monocamada e em moldes de esferoides na linhagem Caco-2 tratadas com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e 2xGI_{50}, Dox e células não tratadas.



Nos tratamentos em monocamada é possível notar a ação de MRK-104, MRK-107 e doxorrubicina com o escurecimento das células, redução de ancoragem, entumecimento ou redução nuclear e citoplasmática. Após 48 horas o modelo 3D de tratamento com MRK-104, MRK-107 e doxorrubicina demonstra o afrouxamento entre as camadas celulares e desarranjo marginal que reduzem o índice de esfericidade (Figura 29 e 30).

Figura 30. Índice de esfericidade de cultura em moldes de esferoides na linhagem Caco-2 tratadas com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e os dobros da GI_{50}, Dox e células não tratadas. (* p <0,05, ** p<0,001, *** p < 0,0001).



Em análise, todos os tratamentos causaram deformação celular, Dox e o composto MRK-107 na concentração em dobro de GI_{50} causaram maior despolarização das células.

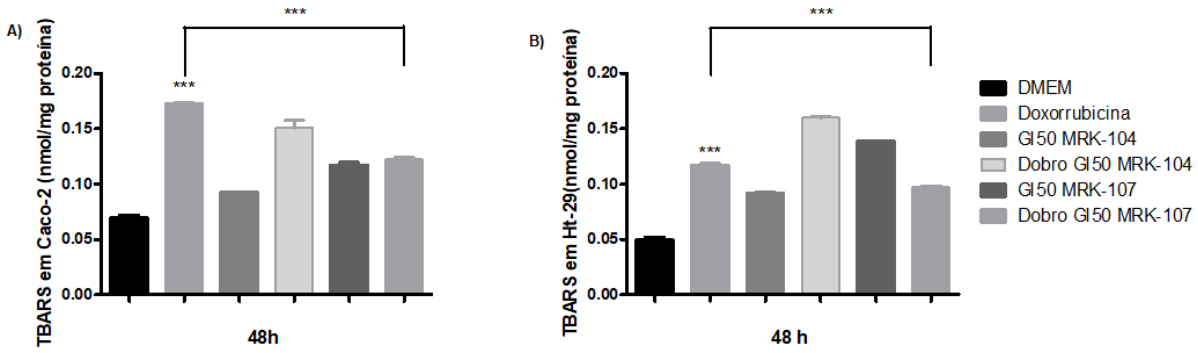
Essas medidas de esfericidade não foram realizadas em linhagem HT-29, devido a contaminação das linhagens e pela programação com os testes direcionados a morte celular.

5.14. Marcador de estresse oxidativo: TBARS em 3D

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) são equivalentes ao malondialdeído pois, constitui o principal produto da peroxidação lipídica. A reação de TBARS é considerada um biomarcador geral de dano oxidativo.

As análises dos compostos MRK mostram a ação citotóxica com aumento da produção de EROS, essa alteração pode ocasionar danos em decorrência do estresse oxidativo. O estresse oxidativo em células 3D tratadas com MRK-104 e MRK-107 (GI_{50} e DGI_{50} em µM), controle não tratado e controle positivo tratado com DOX, por 48 horas foi avaliado através do marcador de TBARS (Figura 31).

Figura 31. Marcador de estresse oxidativo quantificado por TBARS (nmol/mg) em esferoides tratados com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e os dobros da GI_{50}, Dox e células não tratadas nas linhagens celulares Caco-2 e HT-29.



A diferença estatisticamente significativa *** p≤ 0,0001.

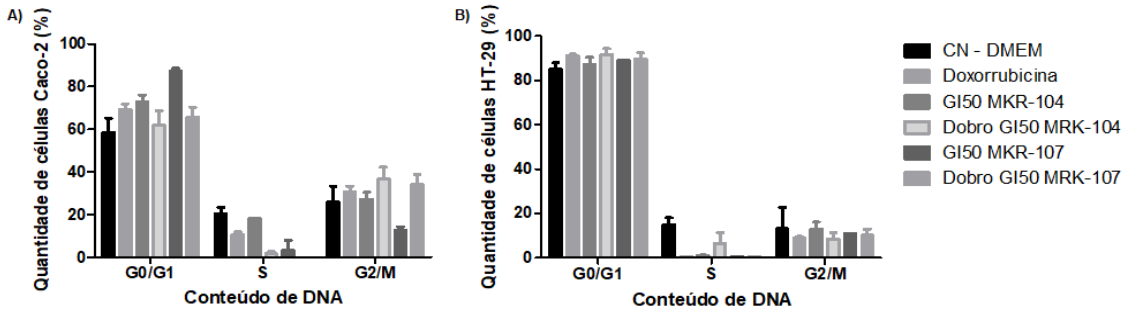
Ao mensurar TBARS um alto nível de lipoperoxidação ocorre no tratamento com DOX na linhagem Caco-2. O mesmo tratamento possui aumento menos expressivo, mas significante na linhagem HT-29. MRK-104 nas duas concentrações de GI_{50} e seu dobro têm crescimento semelhante entre as duas linhagens, sendo mais expressivo na maior concentração. Para MRK-107 a dosagem de TBARS na linhagem Caco-2 permanece constante mesmo com o aumento da concentração, enquanto em

HT-29 há redução do dano na maior concentração, mas o limiar permanece em alta atividade.

5.15. Ciclo celular em 3D

Com a intervenção de MRK-104, MRK-107 e DOX em 48h de tratamento os resultados da análise quantitativa são apresentados na Figura 32. Os compostos MRK inibem o crescimento de células de câncer de cólon através do aumento de fase G0 e G1 no ciclo celular e a linhagem HT-29 possui um desvio de fases mais acentuado.

Figura 32.Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em esferoides tratados com MRK-104, MRK-107 GI_{50} e os dobros da GI_{50}, Dox e células não tratadas nas linhagens celulares Caco-2 e HT-29.

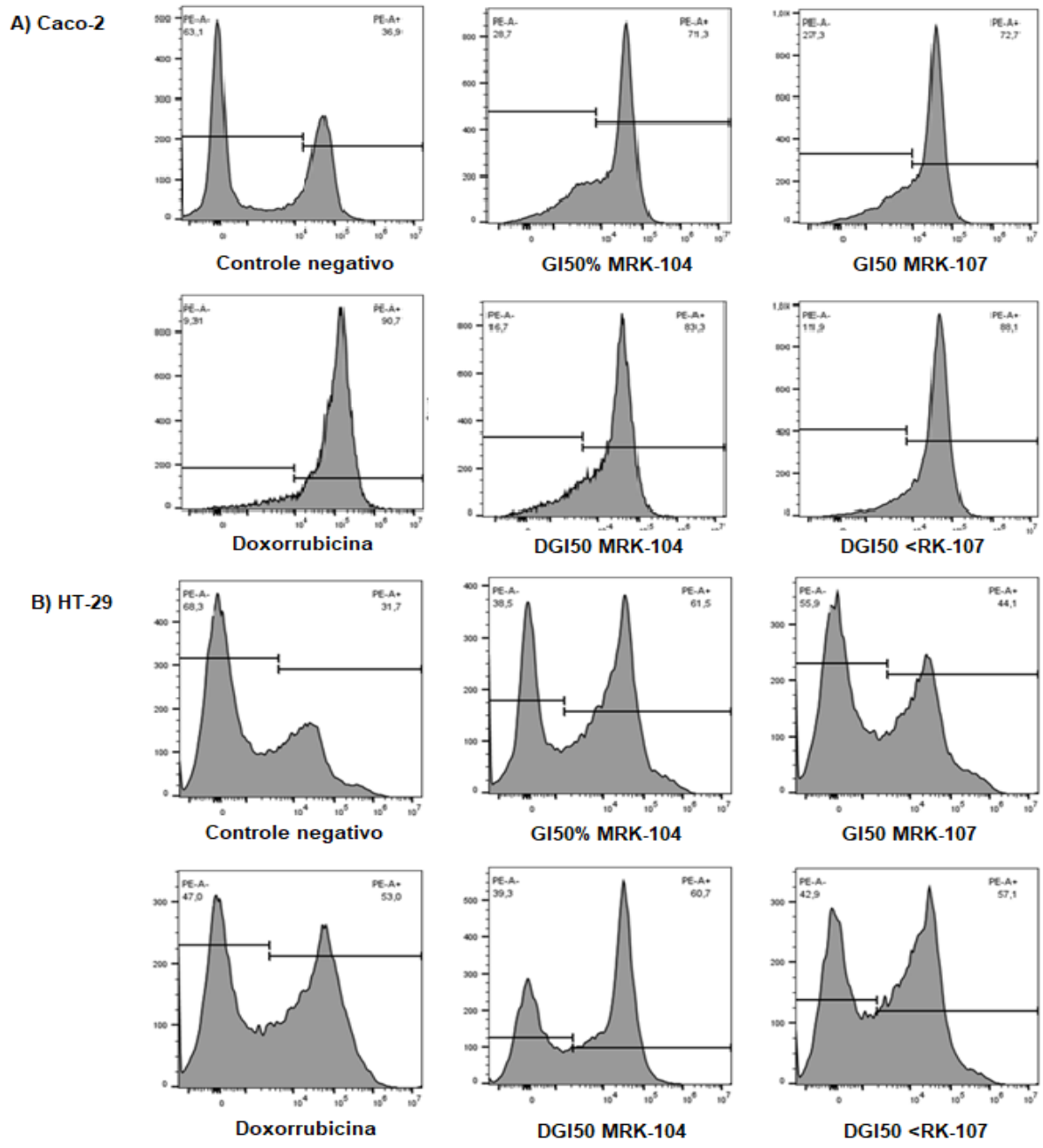


A diferença estatisticamente significativa em relação a fase G1 do controle negativo é * p≤ 0,0001.

5.16. Caspase-3 em 3D

A ativação de caspase-3 foi avaliada após o tratamento de 24h dos esferoides formados das células Caco-2 e HT-29 (Figura 33).

Figura 33. Quantificação da atividade de caspase-3 analisado por citometria de fluxo nas linhagens Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-107, DOX e NT em 24 h.

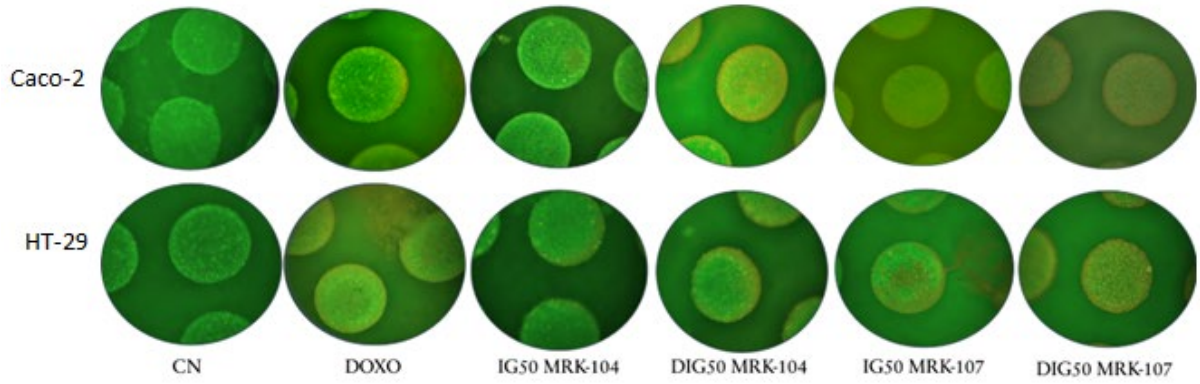


Devido ao tempo de formação de esferoides as camadas celulares são formadas e sua viabilidade é mais comprometida, por tanto, o controle negativo tem ativação de caspase-3 com porcentagem de 36% em Caco-2 e 31% em HT-29. MRK-104 é mais ativa na linhagem Caco-2 com 71% e 83% para GI_{50} e DGI_{50}, em HT-29 as porcentagens respectivas foram semelhantes com 61%. MRK-107 foi ativa em Caco-2 com porcentagens de 72% e 88% para GI_{50} e DGI_{50}, respectivamente. Em HT-29 a ativação foi menos intensa, com 44% e 57%.

5.17. Morte celular por coloração diferencial LA/BE em 3D

O processo de formação dos esferoides foi acompanhado à fresco em microscópio ótico invertido. Após compactação celular, ou seja, maior resistência entre as ligações celulares os esferoides eram submetidos as intervenções de MRK-104, MRK-107, DOX e meio DMEM no tempo de 48 horas observadas na figura 34.

Figura 34. Ensaio de morte celular com coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo em resposta aos compostos MRK-104, MRK-107, DOX e controle negativo em esferoides de células Caco-2 e HT-29.



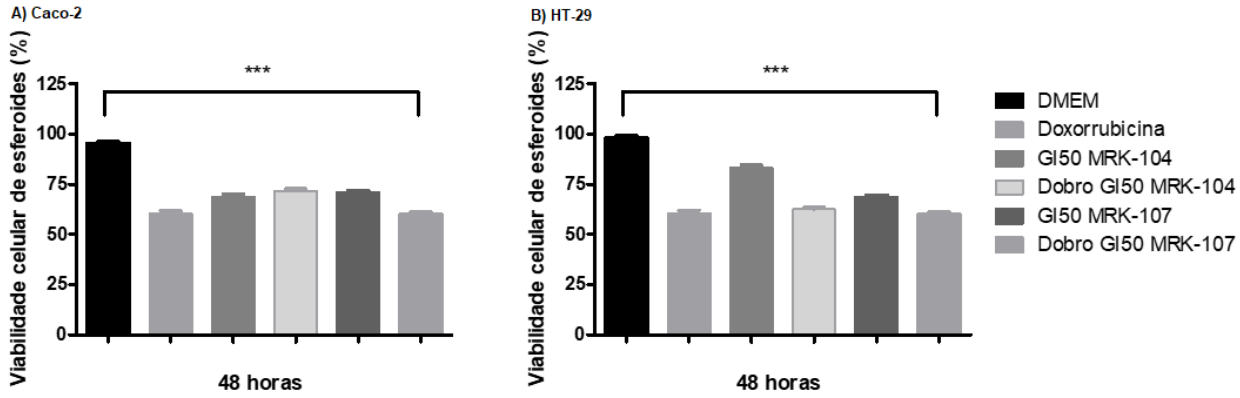
O grupo controle negativo (células viáveis): o núcleo circular uniformemente distribuído no centro da célula. MRK-104, MRK-107 e DOX (células apoptóticas precoces): o núcleo mostrou fluorescência verde-amarelada/ (células apoptóticas tardias): o núcleo possui fluorescência vermelha. (A) Corante LA/BE na linhagem Caco-2 após tratamento de 48 h. (B) Corante LA/BE na linhagem HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h.

A conformação dos esferoides após 48 horas apenas com o meio manteve resistência e formação. No entanto, assim como na cultura de monocamada o tratamento com os selênios compostos realizado em 3D sensibilizou as células e houve a perda de interação celular devido a maior facilidade de perder a conformação. Isso é demonstrado pela dupla coloração com laranja de acridina e brometo de etídeo examinada sob um microscópio fluorescente. Todos os tratamentos geraram um processo de desintegração do esferoide, com exceção do controle sem a intervenção do tratamento com os Se-compostos. Nos tratamentos com os Se-compostos e doxorrubicina houve desarranjo marginal dos esferoides, formação de vesículas e afrouxamento da matriz extracelular (MEC) com uma região de morte celular e células mortas isoladas, pela baixa GI_{50} em 2D, esperava-se uma ação mais acentuada. O

MKR-104 demonstra o afrouxamento da MEC, morte celular nas regiões laterais, uma coloração mais alaranjada, discreta e regionalizada. Em MRK-107 notamos mudanças morfológicas discretas, um número acentuado de células em desprendimento, fragmentos da MEC e pequenas áreas atingidas em todas as camadas. Os esferoides que receberam as intervenções se tornaram frágeis até as camadas internas. Isso evidencia que ocorreu a difusão da amostra e rompeu a barreira de permeabilidade para a captação e transporte do tratamento.

Visando a quantificação desse dano à membrana utilizou-se o software ImageJ para analisar o tamanho dos esferoides, a intensidade de fluorescência pela coloração (Figura 35) de acordo com a intensidade de fluorescência de cada coloração. O tamanho médio dos esferoides atingiu 600-800 µm de diâmetro.

Figura 35. Viabilidade celular de esferoides de acordo com a intensidade de fluorescência em RGB da coloração pelo ensaio com LA/BE.



A diferença estatisticamente significativa *** p≤ 0,0001 em relação a viabilidade celular das células não tratadas.

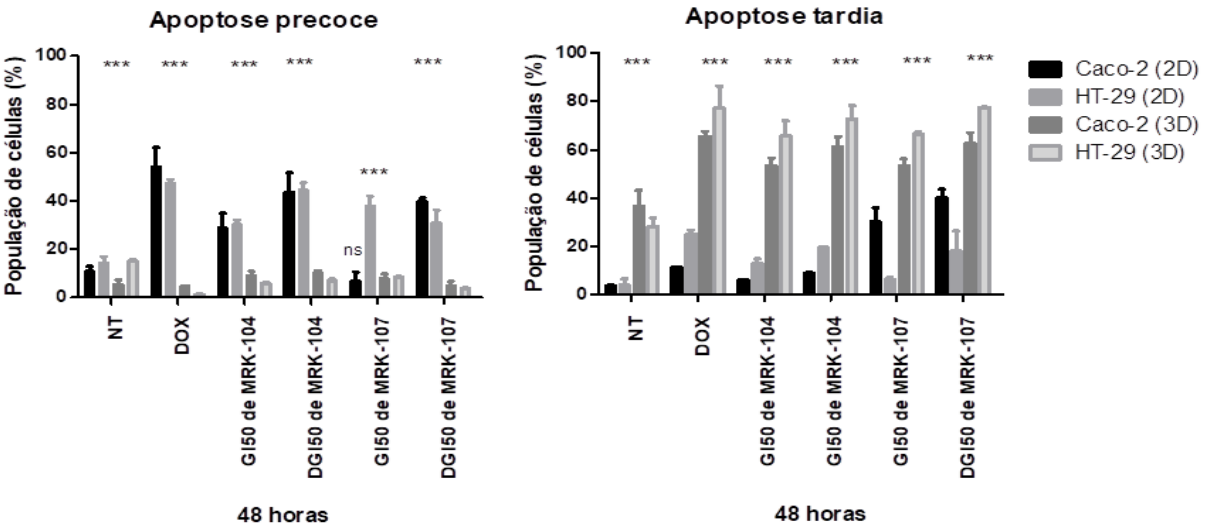
Os controles negativos mostram maior viabilidade celular e doxorrubicina tem atividade de morte celular nas margens da conformação esferoide.

5.18. Anexina V + FITC

A Anexina V + FITC e iodeto de propídeo foi utilizada em células Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h para cultivos de monocamada e esferoides. A figura 36 mostra a população de apoptose precoce maior em cultura celular 2D. Caco-2 2D para 3D não houve diferença estatística significativa. A apoptose tardia foi maior em esferoides, provavelmente devido a conformação e camadas celulares. Os tratamentos padronizados nas células

dispostas em monocamada possuem diferença estatística significativa em relação aos esferoides que receberam o mesmo tratamento.

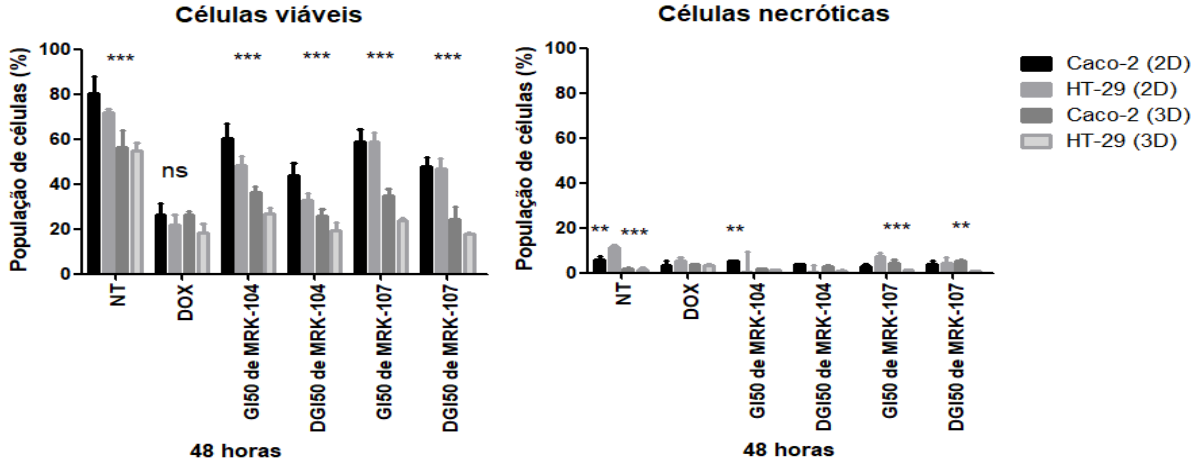
Figura 36. Ensaios de anexina V e PI em células Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h em modelos 2D e 3D.



Apoptose precoce e tardia quantitativas de células 2D e 3D analisadas em citometria de fluxo. Comparação entre model modelos 2D e 3D *** p < 0,001 e ns= sem significância estatística.

As células viáveis (Figura 37) tiveram redução entre os modelos de células 2D e 3D, como esperado. A população de células necróticas se manteve no tratamento com MRK-104 e foi menor em tratamentos com MRK-107.

Figura 37. Ensaios de anexina V e PI em células Caco-2 e HT-29 após tratamento com MRK-104, MRK-107, DOX e NT em 48 h em modelos 2D e 3D.

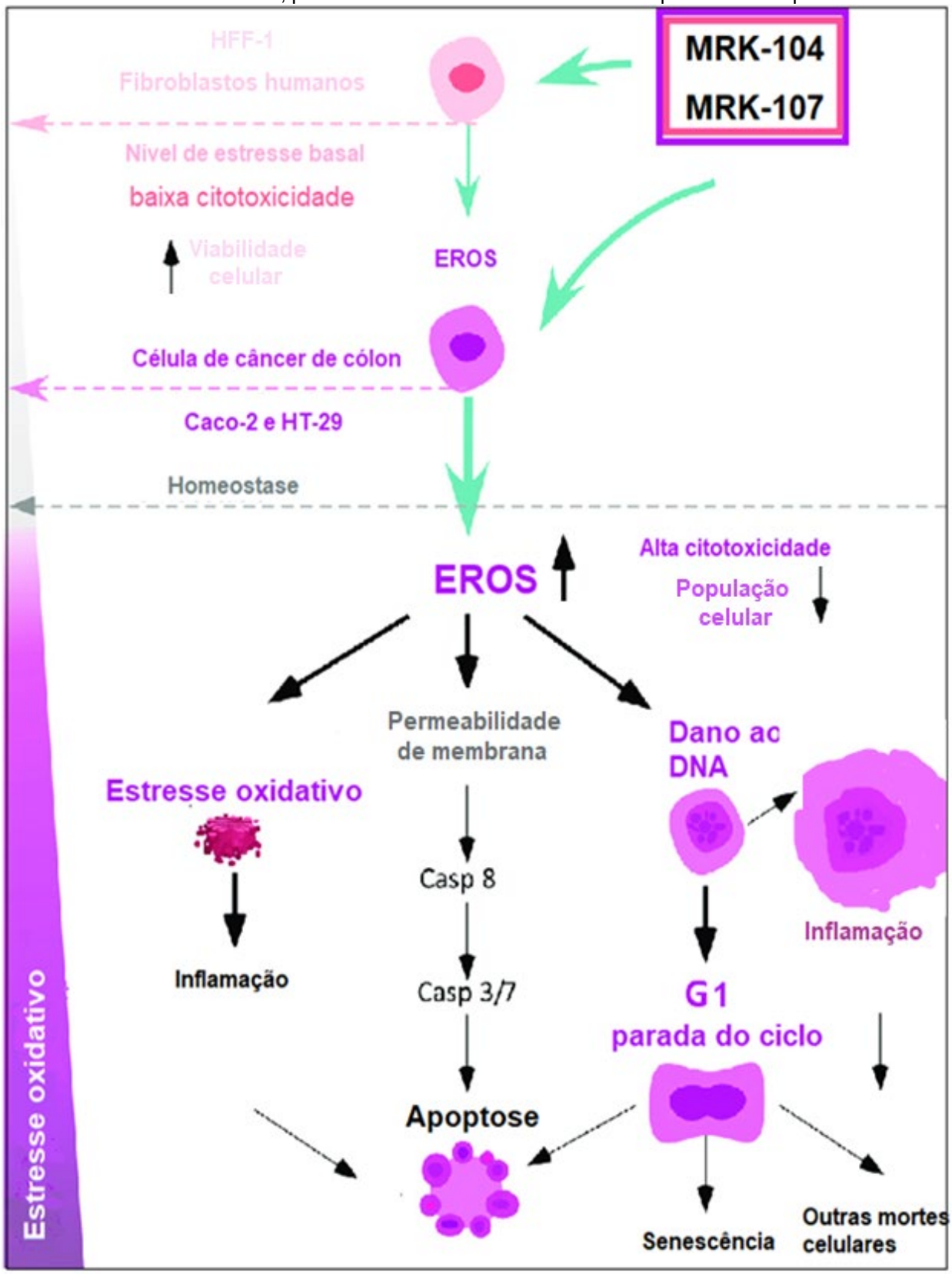


Viáveis e necróticas quantitativas de células 2D e 3D analisadas em citometria de fluxo. Comparação entre model modelos 2D e 3D *** p < 0,001, ** p < 0,01 3 ns= sem significância estatística.

5.19. Esquema de atividade dos compostos MRK-104 e MRK-107

Com os efeitos estabelecidos, foi possível traçar as atividades de ação geradas pelos selênio-compostos MRK-104 e MRK-107 na figura 38.

Figura 38. Diagrama esquemático do tratamento de Caco-2 e HT-29, onde os Se-compostos aumentam os níveis de estresse oxidativo, permeabilidade celular e desencadeiam processos antiproliferativos.



Fonte: adaptado de Ruiz-Torres et al., 2021.

6. DISCUSSÃO

O CCR é um câncer altamente frequente em todo o mundo e amplamente evitável por meio de alterações nos fatores de risco modificáveis, juntamente com a detecção e remoção de lesões pré-cancerosas. É contínuo o aumento das taxas de diagnóstico nos países em transição e adultos mais jovens. Desta forma há uma necessidade urgente de entender melhor e agir sobre os resultados para evitar futuros casos e mortes pela doença [211]. As pesquisas nessa área são necessárias para um tratamento mais efetivo e aprimoramento da resposta de sobrevida. Neste contexto há estudos com moléculas de Selênio, que é um mineral amplamente avaliado por seu potencial quimiopreventivo e terapêutico contra o câncer, mas seus efeitos tóxicos sempre foram temerosos e seu uso na alimentação e suplementação é limitado [212]. Para melhorar esses efeitos colaterais, novas moléculas estão sendo idealizadas, como os anéis aril selenoester, que agregam seletividade aos tratamentos reduzindo efeitos colaterais, mas ao modular sua seletividade *in vitro* e *in vivo* ainda encontram barreiras no doseamento [213]. Compostos fenólicos ligados a selênio também apresentaram atividade antiproliferativa contra células de câncer de cólon (GI_{50}= 3,9 μM) com importante ação em proteínas reguladoras de resistência medicamentosa, mas não apresentaram seletividade (GI_{50} = 3,5 μM para fibroblastos) [214]. No caso de MRK-104 e MRK-107, os Se-compostos testadas no nosso trabalho, foi identificado seletividade em relação às linhagens HFF-1 e menor seletividade em relação aos fibroblastos murinos (NIH/3T3), que não perdem capacidade proliferativa.

Além dos efeitos colaterais que ocorrem pela toxicidade nas células não tumorais durante o uso da quimioterapia, aqui referenciado pela seletividade, é importante avaliar o efeito das amostras em órgãos adjacentes, como o fígado e o rim, principais órgãos, metabolizador e excretor, respectivamente. O efeito sobre as células hepáticas, usadas *in vitro* (HepG2) representa um valor preditivo em relação a sua toxicidade hepática quando sua viabilidade não é comprometida [215]. As amostras MRK-104 e MRK-107 foram inativas quando usadas para tratar as células da linhagem HepG2 corroborando para um maior nível de segurança destas amostras e possibilidade de ajuste de concentrações terapêuticas que podem minimizar efeitos adversos relacionados ao tratamento. Quanto ao efeito sobre as células 786-0 (renais) observamos moderada ação antiproliferativa. Pensando na prospecção de estudos *in vivo*, há necessidade de avaliações e maior atenção nos efeitos renais.

O câncer de cólon possui etapas individuais de progressão tumoral e as linhagens celulares derivadas correspondentes são caracterizadas por sua morfologia e marcadores moleculares, mas podem diferir tanto em suas respostas aos Se-compostos testados quanto aos ensaios a que são submetidos [216]. São duas linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano com vantagens moleculares distintas. As células HT-29 isoladas de adenocarcinoma primário de cólon grau 1 [217] e as células Caco-2 em forma bem diferenciada de adenocarcinoma de cólon grau 2 [48].

Características inerentes às células podem influenciar na sensibilidade ao efeito medicamentoso. Como exemplo há o TEER, um indicador sensível da integridade da barreira fisiológica exibida por culturas intestinais. É conhecido na literatura que a resistência elétrica trans epitelial de Caco-2 é 4 vezes maior do que HT-29, o que pode interferir na sensibilidade ao tratamento. De fato, ao comparar o parâmetro GI_{50} encontrado para cada linhagem celular, observamos que coincide com a diferença de sensibilidade ao tratamento [52; 218].

Analisando a estrutura atividade, pode-se observar que a MRK-107 possui um grupamento 2-metoxifenil em sua estrutura química suficiente para conferir polaridade e eletrofilicidade em ligação ao selênio que por sua vez possui ligação ao imidazol, conhecido por atividades biológicas versáteis que impactam na eficiência de automontagem, estabilidade e farmacocinética.

Estas características corroboram com a maior resposta antiproliferativa estimulada pela MRK-107 com GI_{50} = 2,40 μM e 1,13 μM, assim como MRK-104 com GI_{50} = 11,40 μM e 13,01 μM para Caco-2 e HT-29, respectivamente. Como esperado, doxorrubicina resultou em um potente declínio dependente da concentração do crescimento celular a 46 μM inibe a topoisomerase II, transcrição e a replicação são efetivamente bloqueadas, enquanto o risco de estresse torcional e a probabilidade de quebras na cadeia de DNA aumentam [219].

Por outro lado, a amostra MRK-104 contém uma estrutura mais limitada nos ângulos de ligações o que interfere em termos de interações moleculares, seu anel aromático ligado ao Selênio que também se liga ao indol conferem ação antioxidante, neuroprotetora e anti-inflamatória segundo a literatura de compostos semelhantes [220].

A microscopia possibilitou a observação de alterações importantes na morfologia quando as células Caco-2 e HT-29 foram tratadas com os Se-compostos (Figura 18 e 19). Em resposta ao tratamento com as amostras, foi observado

alterações celulares como, células com núcleos condensados, sugerindo picnose, citoplasma expandido, formação de bolhas na membrana e saliências da membrana, citoplasma túrgido, formação de vacúolos e multinucleação. Essas características morfológicas nas células tratadas diferem nitidamente das células controle ou não tratadas, as quais mantêm-se organizadas em ilhas, com os contatos celulares bem estabelecidos, volume citoplasmático preservado e número de núcleos dentro de seu padrão já estabelecido. Esse padrão de resposta também foi observado em estudos onde células de várias linhagens de cólon, inclusive Caco-2 e HT-29, foram expostas à irradiação.

As alterações morfológicas não ocorreram na totalidade das células, podendo algumas delas iniciarem proliferação e renovação da densidade celular, assim como acontece nas reincidências ou metástase do câncer na prática clínica. Essa possibilidade foi avaliada em dois experimentos, o da recuperação celular e o teste de citotoxicidade em colônias. De fato, um grande problema encontrado no CCR é a recidiva e a metástase, muitas vezes a exposição a uma agente citotóxico causa alterações que as tornam mais invasivas iniciando processos de migração celular ou metástases [1]. Os compostos MRK-104 e MRK-107 além de diminuir a viabilidade celular, atribuem diminuição acentuada no número de colônias e formação de novos clones em comparação com células sem tratamento, seu efeito citotóxico é suficiente para reduzirem formação e a migração das células.

Ainda com foco na capacidade de renovação da massa celular, foi realizado o ensaio de migração celular, que verifica a capacidade do conjunto celular polarizar e ir em direção à borda oposta na tentativa de fechar o espaço vazio e restabelecer o contato célula-célula que propicia a organização tumoral. O composto MRK-107 foi mais efetivo em inibir a migração e os resultados em HT-29 possuem menor migração individual, isso pode ter influência com o fenótipo da célula por ser secretora de muco, com microvilosidades e microfilamentos que conferem mecanismos protetores. O teste também foi realizado em células de fibroblasto murino e como desejável preencheu a área lacunar em 16 horas o que reforça a seletividade e a segurança de menor possibilidade a metástase e neoangiogênese, pois o ciclo celular de NHI/3T3 ocorre em menos de 20h. Apesar de resultados significativos, seria importante elucidar a ação com análises da expressão de integrinas e metaloproteínases. Também é sugestivo que o Selênio do composto participe do processo de cicatrização de feridas, visto que certas selenoproteínas como GPX-1, GPX-4, selenoproteína S e

selenoproteína P se combinam para realizar várias reações, como atividades antioxidantes, inibição de citocinas inflamatórias e eliminação de peroxinitrato (um super íon radical) na fase inflamatória [19]. O estudo do selênio sempre foi inerente ao câncer de cólon, ora como quimiopreventivo, ora como marcador ou ainda integrante de selenoproteínas essenciais as funções vitais [221]. Os compostos de selênio acabam doando Se para a biossíntese de selenoproteínas, com mecanismos alternativos podem proporcionar ações de regulação de ciclo celular, inibir invasão tumoral e induzir apoptose [222].

O sistema redox desencadeia várias funções a moléculas que são seleniladas, como exemplo temos a glutationa que é uma selenoproteína. As espécies reativas ao oxigênio podem surgir a partir de modificações do grupo tiol e reações de selenoproteínas [223]. Os compostos de selênio quando reduzido desencadeia simultaneamente a produção do radical superóxido e em excesso seus efeitos pró-oxidantes culminam em danos ao DNA, proteínas, organelas e membranas, ativando o processo de morte celular por diferentes vias de morte celular, incluindo apoptose, necroptose, necrose e autofagia [224]. A progressão do ciclo celular governa a proliferação celular, então, sua parada em resposta ao estímulo é indispensável para reparar o dano celular, e os mecanismos de controle para dificultar a transição do ciclo celular após o dano celular são chamados de checkpoints do ciclo celular [225]. De acordo com essa redução, sabemos que a morte celular foi causada pela interrupção da distribuição do ciclo celular no estágio sub-G0/G1 comprovada pela redução da expressão de ki-67.

Os compostos heterocíclicos de selênio podem causam perda de potencial de membrana mitocondrial e indução de apoptose independente de caspase [226], essa ocorrência pode ser correlacionada ao fácil desprendimento de células após os tratamentos, assim como a inibição do crescimento celular também por ativação parcial das caspases 3 e 7. Como forma de manutenção da mucosa colônica as células epiteliais normais expressam a proteína BAX pró-apoptótica e as células-tronco são ricas em proteína anti-apoptótica BCL-2, portanto a taxa de proliferação é maior na base das criptas, enquanto a apoptose ocorre principalmente na superfície luminal do epitélio colônico [227].

As caspases 3 e 7 têm função efetora e jusante de ambas as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca e sua ativação foi observada em ambas as linhagens celulares tanto em modelo de cultivo 2D quanto em 3D, porém com mais expressão nas células

Caco-2 e no tratamento controle, DOX demonstra ativação intensa também. Houve indução da externalização da fosfatidilserina e da ativação de caspases efetoras, esses dados mostraram que ambas as vias extrínseca e intrínseca foram responsáveis por apoptose celular induzida por MRK-104 e MRK-107. A indução de apoptose está intimamente ligada a cadeia redox celular, se EROS estão em grande quantidade a peroxidação de lipídios e oxidação da glutationa, acompanhadas pelo colapso das MMP e redução da atividade mitocondrial será reflexo de dano aos muitos constituintes celulares, fato que colabora com parada do ciclo celular e apoptose [228; 229]. Microambiente tumoral serve como uma marca registrada do câncer e uma melhor compreensão da geração de EROS pelas células componentes do TME é fundamental para aprimorar as opções terapêuticas e os resultados clínicos [230].

A via fosfoinositol-3-quinase (PI3K) possui estudos no câncer humano porque é importante para o ciclo celular, proliferação, crescimento, sobrevivência, síntese de proteínas e metabolismo da glicose, as células em condições hipóxicas desregulam a mTOR, ou seja, o caminho do sinal AKT-mTOR que é ativado em 70% dos casos [231]. Em contrapartida, a hipóxia deixa as células intestinais susceptíveis às EROS e inflamações. O câncer de cólon está associado à inflamação, crucial em todas as etapas da tumorigênese do cólon, incluindo iniciação, invasão, progressão e metástase [232]. Durante a inflamação metaloproteínases de matrix (MMP), peroxidades de hidrogênio, catadores de metal e peroxidades lipidicas são liberadas, neste momento as glutationas peroxidases agem para evitar a reação de Fenton ou reação de Haber-Weiss, mas se houver disponibilidade de selênio essas glutationas são restringidas e aumentam as chances de dano celular [221].

Não é por acaso que as investigações em ensaios clínicos de diferentes terapias direcionadas contra Akt, PI3K e mTOR são mantidas sob discussão [88]. A mTOR também tem interação com a via de sinalização WNT (sítio de integração sem asas) responsável pelo desenvolvimento das criptas que se torna inadequado pela perda do gene APC [59; 231]. EROS são conhecidos por mediar o estresse via ativação JNK/P38 e induz apoptose em várias células cancerígenas humanas, essas quinases regulam as vias de sinalização de tensão relacionadas ao gene expressão, morte celular e regulação da senescência celular através de TNFα [233].

Os níveis de expressão de Ki-67 foram reduzidos significativamente nos tratamentos com MRK-104 e MRK-107, o índice de ki-67 em células proliferativas costuma ser de 2,4 a 3, comprovando quiescência celular dependente da

concentração [234]. Pesquisadores reiteram que níveis extremamente baixos de Ki-67 persistem em células que recentemente pararam de proliferar e entraram em quiescência, ao contrário de senescência onde não se encontra o marcador [66]. A diminuição da proliferação celular e indução de morte por apoptose é proporcional a inibição da progressão da divisão celular. A ação de Se-compostos sob o ciclo celular constata que aumenta células na fase sub-G1 e o bloqueia a fase S, em células Caco-2 e HT-29. Na literatura os compostos contendo selênio em suas estruturas foram conduzidas à morte tanto por apoptose quanto por necrose e com alta relação ao aumento de EROS [235].

As duas linhagens exibiram a formação de esferoides tumorais multicelulares bem definidos em micromoldes, com ação de integrinas e interações células-células na formação de matriz extracelular, as culturas tridimensionais (3D) têm o potencial de aumentar o valor preditivo da pesquisa pré-clínica de medicamentos e preencher a lacuna para antecipar o resultado clínico dos tratamentos propostos [84]. Essencialmente, sua morfologia esférica diminui a viabilidade celular, vários estágios de células compreendem esses esferoides ou agregados 3D, incluindo células proliferativas, quiescentes, lesionadas por vias de morte induzidas a apoptose, hipóxia e necrose.

Compostos com atividade indólica no câncer costumam induzir apoptose, inibir a sinalização de NF-κB / Akt / survivina, têm seletividade e ainda reduzem a capacidade de invasão metastática associada a regulação de PTEN e E-caderina, MRK-104 sensibiliza as células para a atividade indutora de apoptose e parece ter um efeito tardio, mas efetivo em relação a repreender a transcrição associada a transição mesenquimal epitelial [182]. Os derivados indólicos são indicados como aliados na maximização do efeito de quimioterápicos, a combinação pode ser interessante na redução de toxicidade e doses [182; 236].

MRK-107 remete a uma abordagem de combinação baseada no acúmulo do estresse oxidativo e na quebra de moléculas de sinalização necessária para a atividade proliferativa das células cancerígenas, mudando o potencial de membrana inicia o efluxo de citocromo C que, consequentemente, ativa a caspase-3 e a caspase-9 são dados que descrevem a atividade de protótipos imidazólicos em CCR [237; 238; 239].

Anoikis é um obstáculo a ser superado em casos de metástase, a via de oxidação de ácidos graxos é ativada em células CCR destacadas o que contribui para

o estresse oxidativo [240], os compostos MRK são efetivos na redução da ancoragem celular e podem induzir nestas células CCR destacadas o efeito anoikis.

Os selênio-compostos atingiram o objetivo de gerar atividade antiproliferativa em ambas as linhagens celulares relacionadas ao câncer de cólon. Caco-2 e HT-29 tiveram vias de mortes ativadas em MRK-104 e a concentração de maior interesse foi a sua GI50, pois em alguns experimentos o dobro dessa concentração não demonstrou dose dependência. MRK-107 gerou respostas relacionadas a dose dependência e maior sensibilização celular.

É sabido que dentre as diferenças de ação citotóxica no modelo 3D em relação ao 2D o tratamento não possui distribuição uniforme devido ao comportamento organizacional das células tumorais que é propício a condições hipóxicas com vascularização pobre dentro dos núcleos necróticos esse gradiente terapêutico pode ser observado na coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídeo e na perda dos arranjos celulares em três zonas diferentes e sensibilidade variável [241].

7. PERSPECTIVAS

- A solubilidade dos compostos pode ser melhorada aplicando uma tecnologia farmacêutica.
- Aprimorar o microambiente tumoral e a sinalização por co-culturas com fibroblastos e células endoteliais em esferoides 3D.
- Possibilidade de ensaios que proporcionem um maior entendimento do mecanismo de ação de MRK-104 e MRK-107 em células Caco-2 e HT-29, como a geração de EROs, inflamação e vias alternativas de morte.
- Pesquisas de efeito sinérgico.
- Aprimoramento de ferramentas analíticas disponíveis para análises de alto rendimento e alto conteúdo.

8. CONCLUSÃO

Os compostos MRK-104 e MRK-107 apresentam efeito antiproliferativo em células em monocamadas e tridimensional, com seletividade. MRK-107 alcança o efeito antiproliferativo com maior eficácia e gera maior desprendimento celular aliado ao estresse oxidativo que ativa outras vias de morte celular, dentre elas a apoptose,

anoikis e quiescência. De acordo com a atividade evidenciada, os compostos MRK-104 e MRK-107 se apresentam como promissores a serem testados em modelos *in vivo* e demais avaliações como agentes antitumorais.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Foi investigado o impacto dos Se-compostos na proliferação das células colônicas. Os resultados sugerem que o tratamento tem resposta pró-oxidativa, gera dano membranar e proteico, reduz atividade de proliferação pelo marcador ki-67 e efeito metastático em cultura de monocamada. A cultura tridimensional demanda cuidados e apresenta maior resistência ao tratamento, devido as barreiras de permeabilidade a dose estipulada deve ser planejada de acordo com cálculos da cultura convencional para o tempo de tratamento desejado. Nos próximos tratamentos deve ser considerado a diferença da quantidade de células tratadas em monocamada em relação as células 3D pala ajuste de volume e interações moleculares. O modelo 3D exibiu características morfológicas aprimoradas, visto que MRK-104 e MRK-107 tiveram considerável ação antiproliferativa, apesar das barreiras fisiológicas. Os se-compostos além de seletivos, não inibem a migração em células normais e atingem degradação das interações de matriz extracelular na conformação 3D. O ciclo celular corrobora com a atividade antiproliferativa evidenciando redução de ki-67 e aumento de células no momento de quiescência. Houve danos morfológicos inflamatórios e estresse oxidativo com o aumento de TBARS. Os compostos de selênio, possuem potencial para eventos de morte celular por outras vias que sugerem processos oxidativos, inflamatórios e apoptótico nas linhagens Caco-2 e HT-29, contudo há melhorias que devem ser pensadas para a construção da conformação celular 3D. É importante salientar a necessidade de uma análise mais robusta com ferramentas de alto rendimento e linearidade para a pesquisa pré-clínica do câncer.

REFERÊNCIAS

1 LONG, Y.; WANG, D. Inhibition of Colon Cancer Cell Growth by Imidazole Through Activation of Apoptotic Pathway. **Med Sci Monit,** v. 25, p. 7597-7604, Oct 10 2019. ISSN 1643-3750. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31597910 >.

2 SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin,** v. 71, n. 3, p. 209-249, May 2021. ISSN 1542-4863. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338 >.

3 LENER, M. R. et al. Can selenium levels act as a marker of colorectal cancer risk? **BMC Cancer,** v. 13, p. 214, Apr 29 2013. ISSN 1471-2407. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23627542 >.

4 SIEGEL, R. L. et al. Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. **J Natl Cancer Inst,** v. 109, n. 8, Aug 01 2017. ISSN 1460-2105. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28376186 >.

5 SAWICKI, T. et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. **Cancers 2021, Vol. 13, Page 2025,** v. 13, n. 9, 2021-04-22. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2072-6694/13/9/2025 >.

6 FÁBREGAS C. J., R. B., GEORGE J. T. Clinical Updates for Colon Cancer Care in 2022 - PubMed. **Clinical colorectal cancer,** v. 21, n. 3, 2022 Sep. ISSN 1938-0674. Disponível em: < https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35729033/ >.

7 LIU, G.-H. et al. Small molecule inhibitors targeting the cancers. **MedComm,** v. 3, n. 4, p. e181, 2022. Disponível em: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mco2.181 >.

8 CHAKRABARTI, S. et al. Early stage colon cancer: Current treatment standards, evolving paradigms, and future directions. **World Journal of Gastrointestinal Oncology,** v. 12, n. 8, 2020/08/08. ISSN 1948-5204. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7443846/ >.

9 PETERS, U.; TAKATA, Y. Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer. **Mol Nutr Food Res,** v. 52, n. 11, p. 1261-72, Nov 2008. ISSN 1613-4133. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18763256 >.

[10] ZHANG, F.; LI, X.; WEI, Y. Selenium and Selenoproteins in Health. **Biomolecules,** v. 13, n. 5, p. 799, 2023. ISSN 2218-273X. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2218-273X/13/5/799 >.

[11] BARCHIELLI, G. et al. The Role of Selenium in Pathologies: An Updated Review. **Antioxidants 2022, Vol. 11, Page 251,** v. 11, n. 2, 2022-01-27. ISSN 2076-3921. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2076-3921/11/2/251 >.

[12] HOSNEDLOVA, B. et al. A Summary of New Findings on the Biological Effects of Selenium in Selected Animal Species—A Critical Review. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 18, n. 10, 2017/10. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666889/ >.

[13] POWERS, M. et al. Selenite Inhibits Notch Signaling in Cells and Mice. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 2518,** v. 22, n. 5, 2021-03-03. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2518 >.

[14] RUBERTE, A. C. et al. New Formulation of a Methylseleno-Aspirin Analog with Anticancer Activity Towards Colon Cancer. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 9017,** v. 21, n. 23, 2020-11-27. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9017 >.

[15] SEROV, D. A. et al. A Review of the Antibacterial, Fungicidal and Antiviral Properties of Selenium Nanoparticles. **Materials,** v. 16, n. 15, 2023/08. ISSN 1996-1944. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10420033/ >.

[16] TRANG HD NGUYEN, B. V., MENGSHI LIN, AZLIN MUSTAFÁ. Antibacterial properties of selenium nanoparticles and their toxicity to Caco-2 cells. **Food Control,** v. 77, 2017/07/01. ISSN 0956-7135. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713517300282 >.

[17] MAIYO, F.; SINGH, M. Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery. **Nanomedicine (Lond),** v. 12, n. 9, p. 1075-1089, May 2017. ISSN 1748-6963. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28440710 >.

[18] KHERADMAND, E. et al. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against Candida albicans. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2014 22:1,** v. 22, n. 1, 2014-06-06. ISSN 2008-2231. Disponível em: < https://link.springer.com/article/10.1186/2008-2231-22-48 >.

[19] HARIHARAN, S.; DHARMARAJ, S. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. **Inflammopharmacology,** v. 28, n. 3, p. 667-695, Jun 2020. ISSN 1568-5608. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32144521 >.

[20] VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact,** v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006. ISSN 0009-2797. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430879 >.

[21] SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol,** v. 24, n. 10, p. R453-62, May 19 2014. ISSN 1879-0445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24845678 >.

[22] MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Semin Cell Dev Biol,** v. 80, p. 50-64, Aug 2018. ISSN 1096-3634. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28587975 >.

[23] SUN, G. et al. A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death. **J Cell Biol,** v. 216, n. 10, p. 3355-3368, Oct 02 2017. ISSN 1540-8140. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28768686 >.

[24] FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. **Front Pharmacol,** v. 9, p. 1300, 2018. ISSN 1663-9812. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30483135 >.

[25] SHAMBERGER, R. J.; WILLIS, C. E. Selenium Distribution and Human Cancer Mortality. **CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences,** v. 2, n. 2, 1971-1-1. ISSN 0590-8191. Disponível em: < https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408367109151308 >.

[26] LENARDÃO, E.; SANTI, C.; SANCINETO, L. **New Frontiers in Organoselenium Compounds** Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2018. ISBN 978-3-319-92404-5.

[27] NAUREEN, S. et al. Biological evaluation of new imidazole derivatives tethered with indole moiety as potent α-glucosidase inhibitors. **Bioorg Chem,** v. 76, p. 365-369, Feb 2018. ISSN 1090-2120. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29232634 >.

[28] BISTROVIĆ, A. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole amidines as potent multi-target inhibitors for the treatment of

non-small cell lung cancer. **Eur J Med Chem,** v. 143, p. 1616-1634, Jan 01 2018. ISSN 1768-3254. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29133046 >.

29 ZHANG, M. Z.; CHEN, Q.; YANG, G. F. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. **Eur J Med Chem,** v. 89, p. 421-41, Jan 07 2015. ISSN 1768-3254. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25462257 >.

30 MIRABELLI, P.; COPPOLA, L.; SALVATORE, M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. **Cancers,** v. 11, n. 8, 2019/08. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721418/ >.

31 BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **J Cell Sci,** v. 125, n. Pt 13, p. 3015-24, Jul 01 2012. ISSN 1477-9137. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797912 >.

32 CACCIAMALI, A.; VILLA, R.; DOTTI, S. 3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications. **Front Physiol,** v. 13, p. 836480, 2022. ISSN 1664-042X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35936888 >.

33 FEDI, A. et al. In vitro models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review. **J Control Release,** v. 335, p. 247-268, Jul 10 2021. ISSN 1873-4995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34033859 >.

34 FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer,** v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 01 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842 >.

35 SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2022. **CA Cancer J Clin,** v. 72, n. 1, p. 7-33, Jan 2022. ISSN 1542-4863. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35020204 >.

36 HUANG, L. et al. Predictive Values of the Selected Inflammatory Indexes in Colon Cancer. **Cancer Control,** v. 29, p. 10732748221091333, 2022. ISSN 1526-2359. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35403443 >.

[37] ANAND, U. et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes & Diseases,** v. 10, n. 4, 2023/07. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10310991/ >.

[38] LIN, A. et al. Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. **Sci Transl Med,** v. 11, n. 509, Sep 11 2019. ISSN 1946-6242. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31511426 >.

[39] GHASEMI, S. Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? **Pharmacogenomics J,** v. 20, n. 3, p. 367-379, Jun 2020. ISSN 1473-1150. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31819161 >.

[40] CUNNINGHAM, D. et al. Colorectal cancer. **Lancet,** v. 375, n. 9719, p. 1030-47, Mar 20 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304247 >.

[41] DEGETT, T. H. et al. Nationwide cohort study of the impact of education, income and social isolation on survival after acute colorectal cancer surgery. **BJS Open,** v. 4, n. 1, p. 133-144, Feb 2020. ISSN 2474-9842. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32011820 >.

[42] LAURENT-PUIG, P.; BÉROUD, C.; SOUSSI, T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. **Nucleic Acids Res,** v. 26, n. 1, p. 269-70, Jan 01 1998. ISSN 0305-1048. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399850 >.

[43] FEARNHEAD, N. S.; BRITTON, M. P.; BODMER, W. F. The ABC of APC. **Hum Mol Genet,** v. 10, n. 7, p. 721-33, Apr 2001. ISSN 0964-6906. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257105 >.

[44] SEGERITZ, C.-P.; VALLIER, L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**, 2017. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149418/ >.

[45] CHATTERJEE, N. et al. In Vitro Cell Transformation Assays: A Valuable Approach for Carcinogenic Potentiality Assessment of Nanomaterials. **International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 8219,** v. 24, n. 9, 2023-05-04. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1422-0067/24/9/8219 >.

[46] FITZGERALD, S. et al. High CerS5 expression levels associate with reduced patient survival and transition from apoptotic to autophagy signalling pathways in colorectal cancer. **J Pathol Clin Res,** v. 1, n. 1, p. 54-65, Jan 2015. ISSN 2056-4538. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499893 >.

[47] LIAN, P. et al. Hypoxia and heat stress affect epithelial integrity in a Caco-2/HT-29 co-culture. **Sci Rep,** v. 11, n. 1, p. 13186, Jun 23 2021. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34162953 >.

[48] FOGH, J.; FOGH, J. M.; ORFEO, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **J Natl Cancer Inst,** v. 59, n. 1, p. 221-6, Jul 1977. ISSN 0027-8874. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/327080 >.

[49] GAGNON, M. et al. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. **J Microbiol Methods,** v. 94, n. 3, p. 274-9, Sep 2013. ISSN 1872-8359. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835135 >.

[50] KAUFFMAN, A. L. et al. Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia. **Front Pharmacol,** v. 4, p. 79, 2013. ISSN 1663-9812. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847534 >.

[51] ROUSSET, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. **Biochimie,** v. 68, n. 9, p. 1035-40, Sep 1986. ISSN 0300-9084. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096381 >.

[52] HADDAD, M. J. et al. Complexification of In Vitro Models of Intestinal Barriers, A True Challenge for a More Accurate Alternative Approach. **Int J Mol Sci,** v. 24, n. 4, Feb 10 2023. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36835003 >.

[53] CIZKOVA, K. et al. HT-29 and Caco2 Cell Lines Are Suitable Models for Studying the Role of Arachidonic Acid-Metabolizing Enzymes in Intestinal Cell Differentiation. **Cells Tissues Organs,** v. 208, n. 1-2, p. 37-47, 2019. ISSN 1422-6421. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32248197 >.

[54] BARBA-OSTRIA, C. et al. Evaluation of Biological Activity of Natural Compounds: Current Trends and Methods. **Molecules,** v. 27, n. 14, 2022/07. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9324072/ >.

[55] MO NAFIU, A. H., HF MURITALA,SB ADEYEMI. Preparation, Standardization, and Quality Control of Medicinal Plants in Africa. **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**, 2017/01/01. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128092866000078 >.

[56] AYKUL, S.; MARTINEZ-HACKERT, E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. **Analytical biochemistry,** v. 508, 2016/09/09. ISSN 0003-2697. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4955526/ >.

[57] HE, Y. et al. The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. **Oncotarget,** v. 7, n. 43, 2016/10/10. ISSN 1949-2553. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5342590/ >.

[58] GROENEWALD, W.; LUND, A. H.; GAY, D. M. The Role of WNT Pathway Mutations in Cancer Development and an Overview of Therapeutic Options. **Cells,** v. 12, n. 7, 2023/04. ISSN 2073-4409. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10093220/ >.

[59] FAROOQI, A. A. et al. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. **Semin Cancer Biol,** v. 58, p. 65-79, Oct 2019. ISSN 1096-3650. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30633978 >.

[60] GRAZIANO, F.; CASCINU, S. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? **Ann Oncol,** v. 14, n. 7, p. 1026-38, Jul 2003. ISSN 0923-7534. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853343 >.

[61] BROUSSARD, E. K. et al. Identification of putative immunologic targets for colon cancer prevention based on conserved gene upregulation from preinvasive to malignant lesions. **Cancer Prev Res (Phila),** v. 6, n. 7, p. 666-74, Jul 2013. ISSN 1940-6215. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23682078 >.

[62] TEPUS, M.; YAU, T. O. Non-Invasive Colorectal Cancer Screening: An Overview. **Gastrointestinal Tumors,** v. 7, n. 3, 2020/07. ISSN 2296-3774. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7445682/ >.

[63] MAIA, R. et al. Can we use Ki67 expression to predict prostate cancer aggressiveness? **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões,** v. 49, 2022-07-01. ISSN 0100-6991. Disponível em: < https://www.scielo.br/j/rcbc/a/pYjPndLW69VXczN94GMrwqk/ >.

[64] GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol,** v. 133, n. 4, p. 1710-5, Oct 1984. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206131 >.

[65] UXA, S. et al. Ki-67 gene expression. **Cell Death Differ,** v. 28, n. 12, p. 3357-3370, Dec 2021.

[66] SOBECKI, M. et al. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. **Cancer Res,** v. 77, n. 10, p. 2722-2734, May 15 2017. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28283655 >.

[67] KIM, K. H.; SEDERSTROM, J. M. Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. **Curr Protoc Mol Biol,** v. 111, p. 28.6.1-28.6.11, Jul 01 2015. ISSN 1934-3647. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26131851 >.

[68] AHMED, S. T. et al. Proliferative Index (Ki67) for Prediction in Breast Duct Carcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev,** v. 19, n. 4, p. 955-959, Apr 25 2018. ISSN 2476-762X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29693354 >.

[69] CHEN, Y. T. et al. Prognostic significance of tumor markers in colorectal cancer patients: DNA index, S-phase fraction, p53 expression, and Ki-67 index. **J Gastrointest Surg,** v. 1, n. 3, p. 266-72; discussion 273, 1997. ISSN 1091-255X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834357 >.

[70] LEAL-ESTEBAN, L. C. **Cell cycle regulators in cancer cell metabolism**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 1866 2020/05/01.

[71] MURRAY, A.; HUNT, T. **The cell cycle: An introduction**. New York: Oxford University Press 1993.

[72] WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol,** v. 226, n. 2, p. 352-64, Jan 2012. ISSN 1096-9896. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990031 >.

[73] KOUSHOLT, A. N.; MENZEL, T.; SØRENSEN, C. S. Pathways for Genome Integrity in G2 Phase of the Cell Cycle. **Biomolecules,** v. 2, n. 4, 2012/12. ISSN 2218-273X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030857/ >.

[74] ARBER, N. et al. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. **Gastroenterology,** v. 110, n. 3, p. 669-74, Mar 1996. ISSN 0016-5085. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608874 >.

[75] GRANADA, A. E. et al. The effects of proliferation status and cell cycle phase on the responses of single cells to chemotherapy. **Molecular Biology of the Cell,** v. 31, n. 8, 2020/04/04. ISSN 1059-1524. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7185964/ >.

[76] NOE, O. et al. Adenomatous polyposis coli in cancer and therapeutic implications. **Oncology Reviews,** v. 15, n. 1, 2021/02/02. ISSN 1970-5565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8256374/ >.

[77] GARCÍA-HEREDIA, J. M.; CARNERO, A. Role of Mitochondria in Cancer Stem Cell Resistance. **Cells,** v. 9, n. 7, p. 1693, 2020. ISSN 2073-4409. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2073-4409/9/7/1693 >.

[78] FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy 2020 5:1,** v. 5, n. 1, 2020-03-12. ISSN 2059-3635. Disponível em: < https://www.nature.com/articles/s41392-020-0134-x >.

[79] KELM, J. M.; FUSSENEGGER, M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. **Trends Biotechnol,** v. 22, n. 4, p. 195-202, Apr 2004. ISSN 0167-7799. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15038925 >.

[80] FITZGERALD, K. A. et al. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. **J Control Release,** v. 215, p. 39-54, Oct 10 2015. ISSN 1873-4995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26220617 >.

[81] FONTANA, F. et al. In Vitro 3D Cultures to Model the Tumor Microenvironment. **Cancers (Basel),** v. 13, n. 12, Jun 13 2021. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34199324 >.

[82] TLSTY, T. D.; COUSSENS, L. M. Tumor stroma and regulation of cancer development. **Annu Rev Pathol,** v. 1, p. 119-50, 2006. ISSN 1553-4006. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039110 >.

[83] KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 6, n. 5, p. 392-401, May 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572188 >.

[84] ZOETEMELK, M. et al. Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. **Sci Rep,** v. 9, n. 1, p. 7103, May 08 2019. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31068603 >.

[85] KAWAI, S. et al. Three-dimensional culture models mimic colon cancer heterogeneity induced by different microenvironments. **Sci Rep,** v. 10, n. 1, p. 3156, Feb 21 2020. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32081957 >.

[86] LEGGETT, S. E. et al. The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems. **Cell Commun Signal,** v. 19, n. 1, p. 32, Mar 10 2021. ISSN 1478-811x.

[87] CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res,** v. 66, n. 17, p. 8319-26, Sep 01 2006. ISSN 1538-7445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951136 >.

[88] BASAK, D.; UDDIN, M. N.; HANCOCK, J. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). **Cancers (Basel),** v. 12, n. 11, Nov 11 2020. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33187272 >.

[89] FITZGERALD, A. A.; LI, E.; WEINER, L. M. 3D Culture Systems for Exploring Cancer Immunology. **Cancers (Basel),** v. 13, n. 1, Dec 28 2020. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33379189 >.

[90] LOURENÇO, D. et al. Patient-Derived Multiple Myeloma 3D Models for Personalized Medicine-Are We There Yet? **Int J Mol Sci,** v. 23, n. 21, Oct 25 2022. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36361677 >.

[91] FONTANA, F. et al. Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery. **Int J Mol Sci,** v. 21, n. 18, Sep

16 2020. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32948069 >.

92 CURCIO, E. et al. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. **Biomaterials,** v. 28, n. 36, p. 5487-97, Dec 2007. ISSN 0142-9612. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881050 >.

93 BARBÁCHANO, A. et al. Organoids and Colorectal Cancer. **Cancers,** v. 13, n. 11, 2021/06. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8197877/ >.

94 YANG, L. et al. Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. **Cell Metab,** v. 24, n. 5, p. 685-700, Nov 08 2016. ISSN 1932-7420. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829138 >.

95 XIE, Y. H.; CHEN, Y. X.; FANG, J. Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduct Target Ther,** v. 5, n. 1, p. 22, Mar 20 2020. ISSN 2059-3635. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32296018 >.

96 ROSHANI, D.; MORADI, G.; RASOULI, M. A. Survival Analysis of Patients with Colorectal Cancer Undergoing Combined Treatment: A Retrospective Cohort Study. **Journal of Research in Health Sciences,** v. 23, n. 1, Winter 2023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10422145/ >.

97 KIANI, A. K. et al. Ethical considerations regarding animal experimentation. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene,** v. 63, n. 2 Suppl 3, 2022/06. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9710398/ >.

98 VORA, L. K. et al. Artificial Intelligence in Pharmaceutical Technology and Drug Delivery Design. **Pharmaceutics,** v. 15, n. 7, 2023/07. ISSN 1999-4923. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10385763/ >.

99 ANDRÉ, T.; O'NEIL, B. H.; MEYERHARDT, J. A. Stage III Colon Cancer: What Works, What Doesn't and Why, and What's Next. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 32, 2012-05-17. ISSN 1548-8748. Disponível em: < https://ascopubs.org/doi/10.14694/EdBook_AM.2012.32.39 >.

100 REZAYATMAND, H. et al. Drug resistance in cancer therapy: the Pandora's Box of cancer stem cells. **Stem Cell Research & Therapy 2022 13:1,** v. 13, n. 1, 2022-05-03. ISSN 1757-6512. Disponível em: < https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-022-02856-6 >.

[101] KIM, A.-Y. et al. Epithelial-mesenchymal Transition is Associated with Acquired Resistance to 5-Fluorocuracil in HT-29 Colon Cancer Cells. **Toxicological Research,** v. 31, n. 2, 2015/06. ISSN 1976-8257. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505345/ >.

[102] TAIXIANG, W.; MUNRO, A. J.; GUANJIAN, L. Chinese medical herbs for chemotherapy side effects in colorectal cancer patients. **Cochrane Database Syst Rev,** v. 2005, n. 1, p. CD004540, Jan 25 2005. ISSN 1469-493X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15674951 >.

[103] XIONG, S.; XIAO, G. W. Reverting doxorubicin resistance in colon cancer by targeting a key signaling protein, steroid receptor coactivator. **Exp Ther Med,** v. 15, n. 4, p. 3751-3758, Apr 2018. ISSN 1792-0981. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29581735 >.

[104] MANNI, W.; MIN, W. Signaling pathways in the regulation of cancer stem cells and associated targeted therapy. **MedComm,** v. 3, n. 4, 2022/12. ISSN 2688-2663. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9534377/ >.

[105] LE, Q.-D. et al. Bioanalytical method validation, biopharmaceutical and pharmacokinetic evaluation of GSK-650394, a serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 inhibitor. **Arabian Journal of Chemistry,** v. 16, n. 2, p. 104462, 2023/02/01/ 2023. ISSN 1878-5352. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853522200778X >.

[106] INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. **Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol,** v. 46, p. 273-307, 2021. ISSN 1871-5125. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33461699 >.

[107] GAVRILAS, L. I. et al. Plant-Derived Bioactive Compounds in Colorectal Cancer: Insights from Combined Regimens with Conventional Chemotherapy to Overcome Drug-Resistance. **Biomedicines,** v. 10, n. 8, 2022/08. ISSN 2227-9059. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9406120/ >.

[108] LEE, C. S.; RYAN, E. J.; DOHERTY, G. A. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. **World J Gastroenterol,** v. 20, n. 14, p. 3751-61, Apr 14 2014. ISSN 2219-2840. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24744571 >.

[109] AZWAR, S. et al. Recent Updates on Mechanisms of Resistance to 5-Fluorouracil and Reversal Strategies in Colon Cancer Treatment. **Biology,** v. 10, n. 9, 2021/09. ISSN 2079-7737. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8466833/ >.

[110] VAN DEN BOOGAARD, W. M. C.; KOMNINOS, D. S. J.; VERMEIJ, W. P. Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal. **Cancers (Basel),** v. 14, n. 3, Jan 26 2022. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35158895 >.

[111] DOMINGUEZ, O. H.; YILMAZ, S.; STEELE, S. R. Stage IV Colorectal Cancer Management and Treatment. **Journal of Clinical Medicine,** v. 12, n. 5, 2023/03. ISSN 2077-0383. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10004676/ >.

[112] GUPTA, S. C. et al. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. **Antioxid Redox Signal,** v. 16, n. 11, p. 1295-322, Jun 01 2012. ISSN 1557-7716. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22117137 >.

[113] HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol,** v. 141, n. 2, p. 312-22, Jun 2006. ISSN 0032-0889. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760481 >.

[114] ANDRÉS, C. M. C. et al. Superoxide Anion Chemistry—Its Role at the Core of the Innate Immunity. **International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 1841,** v. 24, n. 3, 2023-01-17. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/1841 >.

[115] VONA, R. et al. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. **Antioxidants (Basel),** v. 10, n. 2, Jan 30 2021. ISSN 2076-3921. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33573222 >.

[116] WALLACE, J. L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development. **Br J Pharmacol,** v. 176, n. 2, p. 147-154, Jan 2019. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30357812 >.

[117] PERŠE, M. Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? **Biomed Res Int,** v. 2013, p. 725710, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762854 >.

[118] ARFIN, S. et al. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. **Antioxidants,** v. 10, n. 5, 2021/05. ISSN 2076-3921. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8143540/ >.

[119] G MINOTTI, S. D. A. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation - PubMed. **Chemico-biological interactions,** v. 71, n. 1, 1989. ISSN 0009-2797. Disponível em: < https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2550151/ >.

[120] ENDALE, H. T.; TESFAYE, W.; MENGSTIE, T. A. ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology,** v. 11, 2023/08/01. ISSN 2296-634X. Disponível em: < https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2023.1226044/full >.

[121] SNEZHKINA, A. V. et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity,** v. 2019, 2019. ISSN 1942-0900. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6701375/ >.

[122] CHEN, J.-J.; WANG, A.-Q.; CHEN, Q.-Q. DNA methylation assay for colorectal carcinoma. **Cancer Biology & Medicine,** v. 14, n. 1, 2017/02. ISSN 2095-3941. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5365180/ >.

[123] YANG, Z. H.; DANG, Y. Q.; JI, G. Role of epigenetics in transformation of inflammation into colorectal cancer. **World J Gastroenterol,** v. 25, n. 23, p. 2863-2877, Jun 21 2019. ISSN 2219-2840. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31249445 >.

[124] ALMEIDA, A. J. P. O. D. et al. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity,** v. 2022, 2022. ISSN 1942-0994. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9605829/ >.

[125] QIAN, Q. et al. Targeting Reactive Oxygen Species in Cancer via Chinese Herbal Medicine. **Oxid Med Cell Longev,** v. 2019, p. 9240426, 2019. ISSN 1942-0994. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31583051 >.

[126] ZHAO, Y. et al. Cancer Metabolism: The Role of ROS in DNA Damage and Induction of Apoptosis in Cancer Cells. **Metabolites 2023, Vol. 13, Page 796,** v. 13, n. 7, 2023-06-27. ISSN 2218-1989. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2218-1989/13/7/796 >.

[127] GLORIEUX, C. et al. The Multifaceted Roles of NRF2 in Cancer: Friend or Foe? **Antioxidants 2024, Vol. 13, Page 70,** v. 13, n. 1, 2024-01-02. ISSN 2076-3921. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2076-3921/13/1/70 >.

[128] LUEBECK, E. G.; MOOLGAVKAR, S. H. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 99, n. 23, p. 15095-100, Nov 12 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415112 >.

[129] VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Semin Cancer Biol,** v. 35 Suppl, p. S185-S198, Dec 2015. ISSN 1096-3650. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818339 >.

[130] KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer,** v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027 >.

[131] GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation 2018 25:3,** v. 25, n. 3, 2018-01-23. ISSN 1476-5403. Disponível em: < https://www.nature.com/articles/s41418-017-0012-4 >.

[132] GALLUZZI, L. et al. Cell death and senescence. **Journal of Translational Medicine 2023 21:1,** v. 21, n. 1, 2023-06-29. ISSN 1479-5876. Disponível em: < https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-023-04297-y >.

[133] MAUREEN REDZA-DUTORDOIR, D. A. A.-B. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research,** v. 1863, n. 12, 2016/12/01. ISSN 0167-4889. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916302324 >.

[134] CHEN, T.-H. et al. Mitochondrial Glutathione in Cellular Redox Homeostasis and Disease Manifestation. **International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 1314,** v. 25, n. 2, 2024-01-21. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1422-0067/25/2/1314 >.

[135] TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondrial Regulation of Cell Death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,** v. 5, n. 9, 2013/09. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3753705/ >.

[136] LARTIGUE, L. et al. Caspase-independent Mitochondrial Cell Death Results from Loss of Respiration, Not Cytotoxic Protein Release. **Molecular Biology of the Cell,** v. 20, n. 23, 2009/12/12. ISSN 1059-1524. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785731/ >.

[137] BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. **Methods,** v. 44, n. 3, p. 235-40, Mar 2008. ISSN 1046-2023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314054 >.

[138] MOLDOVAN, C. et al. Current trends in luminescence-based assessment of apoptosis. **RSC Advances,** v. 13, n. 45, 2023/10/10. ISSN 2046-2069. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10613953/ >.

[139] VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods,** v. 184, n. 1, p. 39-51, Jul 17 1995. ISSN 0022-1759. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7622868 >.

[140] GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ,** v. 14, n. 7, p. 1237-43, Jul 2007. ISSN 1350-9047. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431418 >.

[141] KESAVARDHANA, S.; MALIREDDI, R. K. S.; KANNEGANTI, T. D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. **Annu Rev Immunol,** v. 38, p. 567-595, Apr 26 2020. ISSN 1545-3278. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32017655 >.

[142] MARCHI, S. et al. Mitochondrial control of inflammation. **Nat Rev Immunol,** v. 23, n. 3, p. 159-173, Mar 2023. ISSN 1474-1741. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35879417 >.

[143] WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis*. **Annu Rev Genet,** v. 43, p. 95-118, 2009. ISSN 1545-2948. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659442 >.

[144] DOYLE, K. M. et al. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. **Journal of Cellular and Molecular Medicine,** v. 15, n. 10, 2011/10. ISSN 1582-1838. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4394214/ >.

145 PAN, B. et al. Non-Canonical Programmed Cell Death in Colon Cancer. **Cancers (Basel),** v. 14, n. 14, Jul 07 2022. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35884370 >.

146 PARK, W. et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review. **Experimental & Molecular Medicine,** v. 55, n. 8, 2023/08. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10474147/ >.

147 GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ,** v. 25, n. 3, p. 486-541, Mar 2018. ISSN 1476-5403. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29362479 >.

148 SHEN, S. et al. Different types of cell death and their shift in shaping disease. **Cell Death Discovery 2023 9:1,** v. 9, n. 1, 2023-08-04. ISSN 2058-7716. Disponível em: < https://www.nature.com/articles/s41420-023-01581-0 >.

149 OPDENBOSCH, N. V.; LAMKANFI, M. Caspases in cell death, inflammation and disease. **Immunity,** v. 50, n. 6, 2019/06/06. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6611727/ >.

150 LI, J. et al. Ferroptosis: past, present and future. **Cell Death & Disease 2020 11:2,** v. 11, n. 2, 2020-02-03. ISSN 2041-4889. Disponível em: < https://www.nature.com/articles/s41419-020-2298-2 >.

151 WANG, Y. N. et al. CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes colorectal cancer cell metastasis by inhibiting anoikis. **Oncogene,** v. 37, n. 46, p. 6025-6040, Nov 2018. ISSN 1476-5594. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29995871 >.

152 GSCHWIND, A.; FISCHER, O. M.; ULLRICH, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nat Rev Cancer,** v. 4, n. 5, p. 361-70, May 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15122207 >.

153 CORKERY, D. P. et al. Loss of PRP4K drives anoikis resistance in part by dysregulation of epidermal growth factor receptor endosomal trafficking. **Oncogene,** v. 37, n. 2, 2018/01/01. ISSN 0950-9232. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5770602/ >.

154 DENG, S. et al. Gp91phox-containing NAD(P)H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH. **Free Radic Biol Med,** v. 42, n. 4, p. 466-73, Feb 15 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275678 >.

155 ARCAMONE, F. et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius. **Biotechnol Bioeng,** v. 11, n. 6, p. 1101-10, Nov 1969. ISSN 0006-3592. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5365804 >.

156 THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics,** v. 21, n. 7, p. 440-6, Jul 2011. ISSN 1744-6880. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048526 >.

157 CHOI, W. G. et al. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Doxorubicin and its Metabolites Doxorubicinol, Doxorubicinone, Doxorubicinolone, and 7-Deoxydoxorubicinone in Mouse Plasma. **Molecules,** v. 25, n. 5, Mar 10 2020. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32164308 >.

158 LI, X. Y. et al. Doxorubicin resistance induces IL6 activation in the colon cancer cell line LS180. **Oncol Lett,** v. 16, n. 5, p. 5923-5929, Nov 2018. ISSN 1792-1074. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30344742 >.

159 LI, X. et al. Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT-29 Cells Induced by Dichloromethane Fraction From. **Front Pharmacol,** v. 9, p. 629, 2018. ISSN 1663-9812. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29950999 >.

160 NOGARA, P. A. et al. The evolution of Selenium and Mercury research from 1700 to 2017 based on bibliometric analysis. **Research, Society and Development,** v. 9, n. 2, 2020/01/01. ISSN 2525-3409. Disponível em: < https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/2177 >.

161 GARZA-JUÁREZ, A. et al. Nutraceuticals and Their Contribution to Preventing Noncommunicable Diseases. **Foods 2023, Vol. 12, Page 3262,** v. 12, n. 17, 2023-08-30. ISSN 2304-8158. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2304-8158/12/17/3262 >.

162 KIELISZEK, M. Selenium–Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. **Molecules,** v. 24, n. 7, 2019/04. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6480557/ >.

163 KIELISZEK, M. et al. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. **Molecules 2016, Vol. 21, Page 609,** v. 21, n. 5, 2016-05-10. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/609 >.

164 LUÍSA B MAIA, B. K. M., ISABEL MOURA, JOSÉ JG MOURA. Selenium-More than Just a Fortuitous Sulfur Substitute in Redox Biology - PubMed. **Molecules (Basel, Switzerland),** v. 29, n. 1, 12/24/2023. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38202704/ >.

165 RIA R. RAMOUTAR, J. L. B. Effects of inorganic selenium compounds on oxidative DNA damage. **Journal of Inorganic Biochemistry,** v. 101, n. 7, 2007/07/01. ISSN 0162-0134. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0162013407000670 >.

166 ERIKA MANGIAPANE , A. P., ENRICA PESSIONE Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems - PubMed. **Current protein & peptide science,** v. 15, n. 6, 2014. ISSN 1875-5550. Disponível em: < https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24910086/ >.

167 DAVID H HOLBEN, A. M. S. The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins: A Review. **Journal of the American Dietetic Association,** v. 99, n. 7, 1999/07/01. ISSN 0002-8223. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0002822399001984 >.

168 RUSETSKAYA, N. Y. et al. [Selenium compounds in redox regulation of inflammation and apoptosis]. **Biomed Khim,** v. 65, n. 3, p. 165-179, Apr 2019. ISSN 2310-6972. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31258141 >.

169 ZOIDIS, E. et al. Selenium-Dependent Antioxidant Enzymes: Actions and Properties of Selenoproteins. **Antioxidants 2018, Vol. 7, Page 66,** v. 7, n. 5, 2018-05-14. ISSN 2076-3921. Disponível em: < https://www.mdpi.com/2076-3921/7/5/66 >.

170 SCHRAUZER, G. N. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. **The Journal of Nutrition,** v. 130, n. 7, 2000/07/01. ISSN 0022-3166. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316622141179 >.

171 GARBO, S. et al. Selenium-Containing Agents Acting on Cancer-A New Hope? **Pharmaceutics,** v. 15, n. 1, Dec 28 2022. ISSN 1999-4923. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36678733 >.

172 FERNANDES, A. P.; GANDIN, V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. **Biochim Biophys Acta,** v. 1850, n. 8, p. 1642-60, Aug 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25459512 >.

[173] MISRA, S. et al. Redox-active selenium compounds--from toxicity and cell death to cancer treatment. **Nutrients,** v. 7, n. 5, p. 3536-56, May 13 2015. ISSN 2072-6643. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25984742 >.

[174] GANDIN, V. et al. Organic selenium compounds as potential chemotherapeutic agents for improved cancer treatment. **Free Radic Biol Med,** v. 127, p. 80-97, Nov 01 2018. ISSN 1873-4596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29746900 >.

[175] GARBO, S. et al. Selenium-Containing Agents Acting on Cancer—A New Hope? **Pharmaceutics,** v. 15, n. 1, 2023/01. ISSN 1999-4923. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9860877/ >.

[176] ULLAH, A. et al. Biogenic Selenium Nanoparticles and Their Anticancer Effects Pertaining to Probiotic Bacteria—A Review. **Antioxidants,** v. 11, n. 10, 2022/10. ISSN 2076-3921. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9598137/ >.

[177] KAUR, R. et al. Anti-cancer pyrimidines in diverse scaffolds: a review of patent literature. **Recent Pat Anticancer Drug Discov,** v. 10, n. 1, p. 23-71, 2015. ISSN 2212-3970. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25230072 >.

[178] PRACHAYASITTIKUL, S. et al. Roles of Pyridine and Pyrimidine Derivatives as Privileged Scaffolds in Anticancer Agents. **Mini Rev Med Chem,** v. 17, n. 10, p. 869-901, 2017. ISSN 1875-5607. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27670581 >.

[179] ANKIT SIWACH , P. K. V. Synthesis and therapeutic potential of imidazole containing compounds - PubMed. **BMC chemistry,** v. 15, n. 1, 02/18/2021. ISSN 2661-801X. Disponível em: < https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33602331/ >.

[180] BAUMANN, M. et al. An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals. **Beilstein Journal of Organic Chemistry,** v. 7, 2011. ISSN 1860-5397. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107522/ >.

[181] LEE, J. H.; LEE, J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. **FEMS Microbiol Rev,** v. 34, n. 4, p. 426-44, Jul 2010. ISSN 1574-6976. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070374 >.

[182] AHMAD, A.; SAKR, W. A.; RAHMAN, K. W. Mechanisms and therapeutic implications of cell death induction by indole compounds. **Cancers (Basel),** v. 3, n. 3, p. 2955-74, Jul 19 2011. ISSN 2072-6694. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212940 >.

[183] SIDHU, J. S. et al. Indole Derivatives as Anticancer Agents for Breast Cancer Therapy: A Review. **Anticancer Agents Med Chem,** v. 16, n. 2, p. 160-73, 2015. ISSN 1875-5992. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25991424 >.

[184] GUERRA, A. S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **Int Immunopharmacol,** v. 11, n. 11, p. 1816-22, Nov 2011. ISSN 1878-1705. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21855654 >.

[185] XIAOTING ZHOU, B. A., YI LIN,YANGHONG NI,XIA ZHAO,XIAO LIANG. Molecular mechanisms of ROS-modulated cancer chemoresistance and therapeutic strategies. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v. 165, 2023/09/01. ISSN 0753-3322. Disponível em: < https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223008260 >.

[186] NELSON, V. K. et al. Frontiers | Reactive oxygen species mediated apoptotic death of colon cancer cells: therapeutic potential of plant derived alkaloids. **Frontiers in Endocrinology,** v. 14, 2023/07/25. ISSN 1664-2392. Disponível em: < https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2023.1201198/full >.

[187] MCVICKER, R. U.; O'BOYLE, N. M. Chirality of New Drug Approvals (2013–2022): Trends and Perspectives. **Journal of Medicinal Chemistry,** v. 67, n. 4, February 12, 2024. ISSN 0022-2623. Disponível em: < https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.3c02239 >.

[188] BETTANIN, L. et al. **NH4I-catalyzed chalcogen(S/Se)-functionalization of 5-membered N-heteroaryls under metal-free conditions**. Tetrahedron. 74**:** 3971-3980 p. 2018.

[189] RAFIQUE, J. et al. Regioselective, Solvent- and Metal-Free Chalcogenation of Imidazo[1,2-a]pyridines by Employing I2 /DMSO as the Catalytic Oxidation System. **Chemistry,** v. 22, n. 33, p. 11854-62, Aug 08 2016. ISSN 1521-3765. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27388454 >.

190 RAFIQUE, J. et al. Direct, Metal-free C(sp. **Chemistry,** v. 24, n. 16, p. 4173-4180, Mar 15 2018. ISSN 1521-3765. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29243330 >.

191 SABA, S. et al. Rose Bengal catalysed photo-induced selenylation of indoles, imidazoles and arenes: a metal free approach. **Org Biomol Chem,** v. 16, n. 6, p. 880-885, Feb 07 2018. ISSN 1477-0539. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340417 >.

192 MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J Natl Cancer Inst,** v. 83, n. 11, p. 757-66, Jun 05 1991. ISSN 0027-8874. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2041050 >.

193 SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst,** v. 82, n. 13, p. 1107-12, Jul 04 1990. ISSN 0027-8874. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2359136 >.

194 ZORZANELLI, B. C. et al. Pro-Apoptotic Antitumoral Effect of Novel Acridine-Core Naphthoquinone Compounds against Oral Squamous Cell Carcinoma. **Molecules,** v. 27, n. 16, 2022/08. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9415509/ >.

195 CARR, B. I. et al. Fluoro-Sorafenib (Regorafenib) effects on hepatoma cells: growth inhibition, quiescence, and recovery. **J Cell Physiol,** v. 228, n. 2, p. 292-7, Feb 2013. ISSN 1097-4652. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22777740 >.

196 FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc,** v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473 >.

197 RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J. L. Wound-healing assay. **Methods Mol Biol,** v. 294, p. 23-9, 2005. ISSN 1064-3745. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576902 >.

198 YANG, C. W. et al. Preoperative prediction of gastrointestinal stromal tumors with high Ki-67 proliferation index based on CT features. **Ann Transl Med,** v. 9, n. 20, p. 1556, Oct 2021. ISSN 2305-5839. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34790762 >.

199 POSSEL, H., NOACK, HEIKO, AUGUSTIN, WOLFGANG, KEILHOFF, GERBURG E WOLF, GERALD. **2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for**

peroxynitrite formation. Federation of European Biochemical Societies. 416**:** 175-178 p. 1997.

200 WONG, W. et al. Interplay of cell death signaling pathways mediated by alternating magnetic field gradient. **Cell Death Discov,** v. 4, p. 49, 2018. ISSN 2058-7716. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29736266 >.

201 HUSSAIN, H. et al. Determination of cell viability using acridine orange/propidium iodide dual-spectrofluorometry assay. **Cogent Food & Agriculture,** v. 5, n. 1, p. 1582398, 2019/01/01 2019. ISSN null. Disponível em: < https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1582398 >.

202 HUANG, L. et al. Propyl isothiocyanate induces apoptosis in gastric cancer cells by oxidative stress via glutathione depletion. **Oncology Letters,** v. 18, n. 5, 2019/11. ISSN 1792-1074. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6781591/ >.

203 GOMES GB, Z. C., WEBER SS, DE LIMA DP, REDDY TN, GUERRERO ATG, MATOS MDFC, PARISOTTO EB, PERDOMO RT. **Thiopyrimidine derivatives induce cytotoxicity, cell cycle arrest and oxidative stress in breast cancer 3D-spheroids.** . Chemical Paper. 75**:** 1211–1220 p. 2020.

204 NAPOLITANO, A. P. et al. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. **Tissue Eng,** v. 13, n. 8, p. 2087-94, Aug 2007. ISSN 1076-3279. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518713 >.

205 SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods,** v. 9, n. 7, p. 671-5, Jul 2012. ISSN 1548-7105. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834 >.

206 MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol,** v. 46, p. 153-85, 1995. ISSN 0091-679X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541883 >.

207 THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science,** v. 281, n. 5381, p. 1312-6, Aug 28 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721091 >.

208 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem, v. 72, p. 248-54, May 07 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051 >.

209 BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol,** v. 105, p. 299-305, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727668 >.

210 BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol,** v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879.

211 MORGAN, E. et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. **Gut,** v. 72, n. 2, p. 338-344, Feb 2023. ISSN 1468-3288. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36604116 >.

212 HU, W. et al. Food Sources of Selenium and Its Relationship with Chronic Diseases. **Nutrients,** v. 13, n. 5, May 20 2021. ISSN 2072-6643. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34065478 >.

213 CHUAI, H. et al. Small molecule selenium-containing compounds: Recent development and therapeutic applications. **Eur J Med Chem,** v. 223, p. 113621, Nov 05 2021. ISSN 1768-3254. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34217061 >.

214 BEGINES, P. et al. Masked Phenolic-Selenium Conjugates: Potent and Selective Antiproliferative Agents Overcoming P-gp Resistance. **Pharmaceuticals (Basel),** v. 13, n. 11, Oct 31 2020. ISSN 1424-8247. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33142908 >.

215 RAMIREZ, T. et al. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. **Arch Toxicol,** v. 92, n. 2, p. 893-906, Feb 2018. ISSN 1432-0738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28965233 >.

216 SCHRÖTEROVÁ, L. et al. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicol In Vitro,** v. 23, n. 7, p. 1406-11, Oct 2009. ISSN 1879-3177. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19607906 >.

217 FOGH, J.; TREMPE, G. **New Human Tumor Cell Lines**. BOSTON, MA: SPRINGER**:** 115–159 p. 1975.

[218] CHENG, Y. et al. Caco-2 Cell Sheet Partially Laminated with HT29-MTX Cells as a Novel In Vitro Model of Gut Epithelium Drug Permeability. **Pharmaceutics 2023, Vol. 15, Page 2338,** v. 15, n. 9, 2023-09-18. ISSN 1999-4923. Disponível em: < https://www.mdpi.com/1999-4923/15/9/2338 >.

[219] SCHROETER, A.; MARKO, D. Resveratrol modulates the topoisomerase inhibitory potential of doxorubicin in human colon carcinoma cells. **Molecules,** v. 19, n. 12, p. 20054-72, Dec 01 2014. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470274 >.

[220] PROTTI, S.; FAGNONI, M. Recent Advances in Light-Induced Selenylation. **ACS Org Inorg Au,** v. 2, n. 6, p. 455-463, Dec 07 2022. ISSN 2694-247X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36855533 >.

[221] PETERS, K. M. et al. Selenoproteins in colon cancer. **Free Radic Biol Med,** v. 127, p. 14-25, Nov 01 2018. ISSN 1873-4596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29793041 >.

[222] SHIMADA, B. K. et al. Metabolism of Selenium, Selenocysteine, and Selenoproteins in Ferroptosis in Solid Tumor Cancers. **Biomolecules,** v. 12, n. 11, Oct 28 2022. ISSN 2218-273X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36358931 >.

[223] HAWKES, W. C.; ALKAN, Z. Regulation of redox signaling by selenoproteins. **Biol Trace Elem Res,** v. 134, n. 3, p. 235-51, Jun 2010. ISSN 1559-0720. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20306235 >.

[224] KIM, S. J. et al. Antitumor Effects of Selenium. **Int J Mol Sci,** v. 22, n. 21, Oct 31 2021. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34769276 >.

[225] KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Front Cell Dev Biol,** v. 9, p. 645593, 2021. ISSN 2296-634X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33855023 >.

[226] SHEN, H. et al. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. **Free Radic Biol Med,** v. 28, n. 7, p. 1115-24, Apr 01 2000. ISSN 0891-5849. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832073 >.

[227] ISMAIL, N. I. et al. Mechanism of Apoptosis Induced by Curcumin in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci,** v. 20, n. 10, May 17 2019. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31108984 >.

228 CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione and apoptosis. **Free Radic Res,** v. 42, n. 8, p. 689-706, Aug 2008. ISSN 1029-2470. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18671159 >.

229 LIU, Z. et al. Apoptin induces pyroptosis of colorectal cancer cells via the GSDME-dependent pathway. **Int J Biol Sci,** v. 18, n. 2, p. 717-730, 2022. ISSN 1449-2288. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35002520 >.

230 ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Curr Biol,** v. 30, n. 16, p. R921-R925, Aug 17 2020. ISSN 1879-0445. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32810447 >.

231 MALINOWSKY, K. et al. Activation of the PI3K/AKT pathway correlates with prognosis in stage II colon cancer. **Br J Cancer,** v. 110, n. 8, p. 2081-9, Apr 15 2014. ISSN 1532-1827. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24619078 >.

232 TAFANI, M. et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. **Oxid Med Cell Longev,** v. 2016, p. 3907147, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26798421 >.

233 RUIZ-TORRES, V. et al. A Nudibranch Marine Extract Selectively Chemosensitizes Colorectal Cancer Cells by Inducing ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress. **Front Pharmacol,** v. 12, p. 625946, 2021. ISSN 1663-9812. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34456713 >.

234 LEE, H. J. et al. Comparison of [3H]-Thymidine, Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester and Ki-67 in Lymphocyte Proliferation. **Front Pediatr,** v. 10, p. 638549, 2022. ISSN 2296-2360. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35547552 >.

235 DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E. et al. Synthesis and antiproliferative activity of novel selenoester derivatives. **Eur J Med Chem,** v. 73, p. 153-66, Feb 12 2014. ISSN 1768-3254. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389510 >.

236 KARIMABAD, M. N. et al. Molecular Targets, Anti-cancer Properties and Potency of Synthetic Indole-3-carbinol Derivatives. **Mini Rev Med Chem,** v. 19, n. 7, p. 540-554, 2019. ISSN 1875-5607. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30444199 >.

237 SAEED ALI, M.; MOHAMED HUSSEIN, R.; AHMED KANDEIL, M. The Pro-Oxidant, Apoptotic and Anti-Angiogenic Effects of Selenium Supplementation on Colorectal Tumors Induced by 1,2-Dimethylhydrazine in BALB/C Mice. **Rep Biochem Mol Biol,** v. 8, n. 3, p. 216-226, Oct 2019. ISSN 2322-3480. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32274393 >.

238 SHARMA, A. K. et al. The Akt inhibitor ISC-4 activates prostate apoptosis response protein-4 and reduces colon tumor growth in a nude mouse model. **Clin Cancer Res,** v. 17, n. 13, p. 4474-83, Jul 01 2011. ISSN 1557-3265. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555373 >.

239 SHARMA, P. et al. Imidazoles as Potential Anticancer Agents: An Update on Recent Studies. **Molecules,** v. 26, n. 14, Jul 11 2021. ISSN 1420-3049. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34299488 >.

240 YOO, B. H. et al. Anoikis of colon carcinoma cells triggered by β-catenin loss can be enhanced by tumor necrosis factor receptor 1 antagonists. **Oncogene,** v. 34, n. 38, p. 4939-51, Sep 17 2015. ISSN 1476-5594. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531320 >.

241 GUPTA, R.; SHARMA, D. Therapeutic response differences between 2D and 3D tumor models of magnetic hyperthermia. **Nanoscale Adv,** v. 3, n. 13, p. 3663-3680, Jun 30 2021. ISSN 2516-0230. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36133021 >.

APÊNDICE A – Artigo submetido

pharmaceuticals

IMPACT FACTOR 5.215

Indexed in: PubMed

Article

Selenylated Imidazo [1,2-*a*]pyridine Induces Apoptosis and Oxidative Stress in 2D and 3D Models of Colon Cancer Cells

Giovana Bicudo Gomes, Claudia Stutz Zubieta, Jhefferson dos Santos Guilhermi, Mônica Cristina Toffoli-Kadri, Adilson Beatriz, Jamal Rafique, Eduardo Benedetti Parisotto, Sumbal Saba and Renata Trentin Perdomo

Special Issue
Methyl-Containing Pharmaceuticals

Edited by
Dr. Anna Fantinati and Dr. Davide Illuminati

MDPI

https://doi.org/10.3390/ph16060814

pharmaceuticals

MDPI

Article

Selenylated Imidazo [1,2-*a*]pyridine Induces Apoptosis and Oxidative Stress in 2D and 3D Models of Colon Cancer Cells

Giovana Bicudo Gomes [1], Claudia Stutz Zubieta [1], Jhefferson dos Santos Guilhermi [2], Mônica Cristina Toffoli-Kadri [1], Adilson Beatriz [3], Jamal Rafique [2,3], Eduardo Benedetti Parisotto [1], Sumbal Saba [2,*] and Renata Trentin Perdomo [1,*]

[1] Postgraduate Course in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79070-900, Brazil; giovana.bicudo@ufms.br (G.B.G.); claudia.stutz@gmail.com (C.S.Z.); monica.kadri@ufms.br (M.C.T.-K.); eduardo.parisotto@ufms.br (E.B.P.)
[2] Instituto de Química (IQ), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiania 74690-900, Brazil; jheffersonguilhermi@discente.ufg.br (J.d.S.G.); jamal.chm@gmail.com or jamal.rafique@ufms.br (J.R.)
[3] Laboratory of Synthesis and Transformation of Organic Molecules (SINTMOL), Institute of Chemistry (INQUI), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79074-460, Brazil; adilson.beatriz@ufms.br
* Correspondence: sumbalsaba@ufg.br (S.S.); renata.trentin@ufms.br (R.T.P.)

Abstract: Colon cancer incidence rates are increasing annually, a scenario aggravated by genetic and epigenetic alterations that promote drug resistance. Recent studies showed that novel synthetic selenium compounds are more efficient and less toxic than conventional drugs, demonstrating biocompatibility and pro-oxidant effects on tumor cells. This study aimed to investigate the cytotoxic effect of MRK-107, an imidazo [1,2-*a*]pyridine derivative, in 2D and 3D cell culture models of colon cancer (Caco-2 and HT-29). Sulforhodamine B results revealed a GI50 of 2.4 µM for Caco-2, 1.1 µM for HT-29, and 22.19 µM for NIH/3T3 in 2D cultures after 48 h of treatment. Cell recovery, migration, clonogenic, and Ki-67 results corroborated that MRK-107 inhibits cell proliferation and prevents cell regeneration and metastatic transition by selectively reducing migratory and clonogenic capacity; non-tumor cells (NIH/3T3) re-established proliferation in less than 18 h. The oxidative stress markers DCFH-DA and TBARS revealed increased ROS generation and oxidative damage. Caspases-3/7 are activated and induce apoptosis as the main mode of cell death in both cell models, as assessed by annexin V-FITC and acridine orange/ethidium bromide staining. MRK-107 is a selective, redox-active compound with pro-oxidant and pro-apoptotic properties and the capacity to activate antiproliferative pathways, showing promise in anticancer drug research.

Keywords: ROS generation; oxidative damage; cytotoxicity; cancer; cell death; selenium

check for updates

Citation: Gomes, G.B.; Zubieta, C.S.; Guilhermi, J.d.S.; Toffoli-Kadri, M.C.; Beatriz, A.; Rafique, J.; Parisotto, E.B.; Saba, S.; Perdomo, R.T. Selenylated Imidazo [1,2-*a*]pyridine Induces Apoptosis and Oxidative Stress in 2D and 3D Models of Colon Cancer Cells. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 814. https://doi.org/10.3390/ph16060814

Academic Editors: Anna Fantinati and Davide Illuminati

Received: 12 April 2023
Revised: 25 May 2023
Accepted: 26 May 2023
Published: 30 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

More than 1.9 million cases of colon cancer are detected each year worldwide, and, for half of these cases, the outcome is death [1,2]. Colon cancer patients may develop drug resistance, resulting in reduced treatment efficacy and the need for chemotherapy [3]. Tumor biological behavior is evaluated through pathological characteristics and molecular markers that indicate the prognostic value of colorectal cancer, assisting in the search for new drugs with more effective responses and lower toxicity [4]

Organoselenium compounds have interesting anti-cancer properties, attributed to their biocompatibility and pro-oxidant effects on tumor cells [5–9]. These compounds have been shown to inhibit colon tumor growth in HT-29 and Caco-2 cells, but their efficacy still needs improvement [10,11]. Selenylated imidazo [1,2-*a*]pyridine, a synthetic organoselenium compound, causes reactive oxygen species (ROS)-induced oxidative damage, which may promote cancer cell death [12–15]; however, the synthetic compound needs to be modulated by including functional groups in the selenium-bound portion for enhanced selectivity toward cancer cells [16–19].

Three-dimensional (3D) cell spheroid models are known to mimic the tumor microenvironment, having been successfully used for drug screening and the study of tumor growth, proliferation, invasion, micrometastasis, and immune cell interactions [20,21]. Another advantage is the reduction in animal experimentation, which is beneficial for ethical and scientific reasons, given the discrepancies in responses between species and the difficulty in extrapolating results to humans [22].

Thus, in view of our continuing interest in biologically relevant organoselenium compounds and functionalization of imidazo [1,2-*a*]pyridines [23–30], this study aimed to investigate the effect of MRK-107 in two-dimensional (2D) and 3D (spheroid) models of colon carcinoma, with a focus on induction of cell death by proliferative, inflammatory, apoptotic, or multiple oxidative stress-related pathways.

2. Results

2.1. MRK-107 Selectively Decreased Caco-2 and HT-29 Viability in Monolayers, Affording Colony Reduction and Impaired Healing/Recovery

The effect of MRK-107 (0.635–635.570 µM) on the viability and recovery of Caco-2 and HT-29 cells was assessed by the sulforhodamine B (SRB) assay (Figure 1). MRK-107 (Figure 1A) significantly reduced the viability of Caco-2 and HT-29 cells after 48 h at concentrations of 6.355, 63.55, and 635.57 µM (Figure 1B), with a half-maximal growth inhibitory concentration (GI_{50}) of 2.40 µM for Caco-2 and 1.13 µM for HT-29.

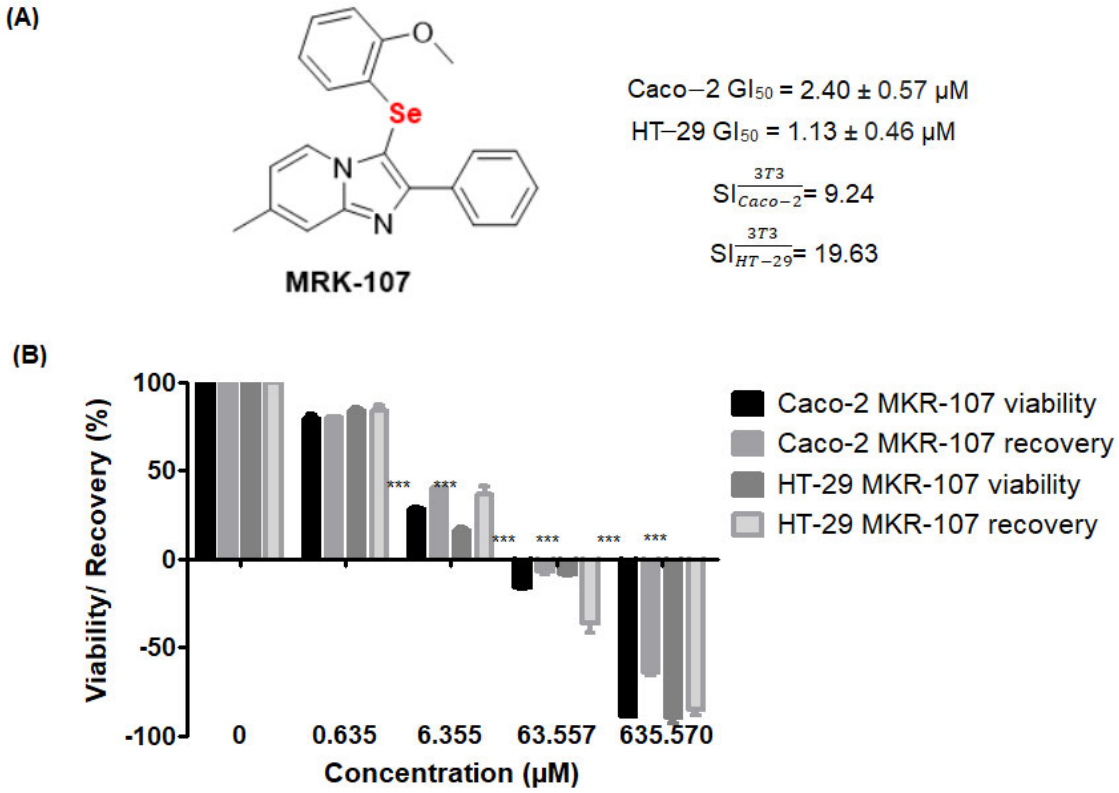


Figure 1. Structure of MRK-107, a selenylated imidazo [1,2-*a*]pyridine derivative, and its effect on cell viability at different concentrations (0.6–635.57 µM). (**A**) Structure of MRK-107, GI_{50} against Caco-2 and HT-29, and selectivity indices (SI). (**B**) Viability and recovery of Caco-2 and HT-29 cells after 48 h of treatment with MRK-107; *** $p < 0.001$. Effects on viability were significant at 6.355, 63.55, and 635.57 µM MRK-107. A recovery of less than 50% was deemed irrelevant.

Furthermore, exposure of Caco-2 and HT-29 cells to GI_{50} and double the GI_{50} (DGI_{50}) induced a significant decrease in clone formation (Figure 2A), as well as in migration/healing (Figure 2B). These results suggest that, after 48 h of exposure, the cytotoxic effect of

MRK-107 is independent of incubation time and HT-29 cells are more sensitive to long-term MRK-107 exposure than Caco-2 cells. MRK-107 at DGI_{50} was effective in inhibiting migration. HT-29 cells exhibited reduced individual migration, attributed to the phenotype of the cell line.

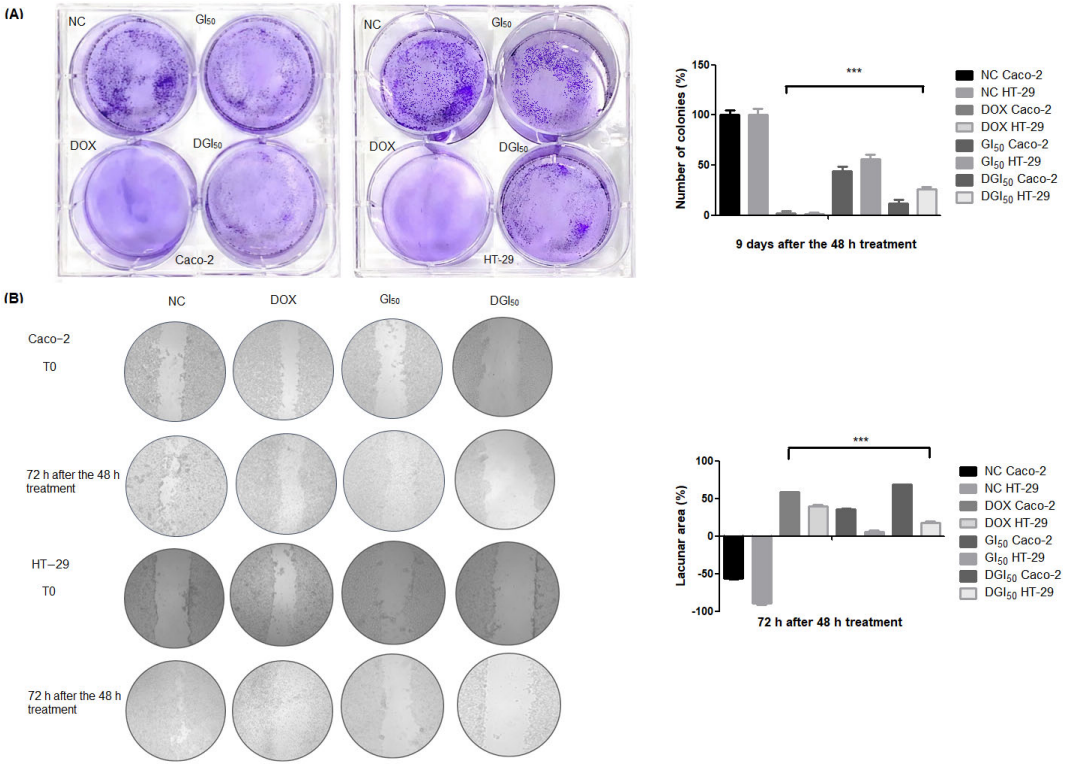


Figure 2. Cytotoxicity and proliferation assays of colon cancer cells treated with MRK-107 and their quantitative analysis. (**A**) Colony formation in the negative control (NC) and Caco-2 and HT-29 cells at 48 h after treatment with MRK-107 or doxorubicin (DOX, positive control) and their quantitative analysis. (**B**) Cell migration of Caco-2 and HT-29 and their quantitative analysis; *** $p < 0.001$ compared with NC. 100× magnification.

2.2. MRK-107 Reduces Proliferation

The Ki-67 index was determined after treatment of Caco-2 and HT-29 cells with MRK-107 at GI_{50} and DGI_{50}. The proliferation index was higher in untreated cells, which translates clinically into hyperproliferation, low tumor differentiation, and worse prognosis. A reduction of Ki-67 expression by at least 14% represents a loss of proliferative capacity, having a direct impact on cell cycle activity. MRK-107 afforded reductions of 50% and 45% in Caco-2 and HT-29 proliferation, respectively (Table 1).

Table 1. Cell proliferation index of Caco-2 and HT-29 at 48 h after treatment with MRK-107.

Cell Line	Treatment	Proliferation Index
Caco-2	Negative control	2.67 ± 0.25
	Doxorubicin	1.65 ± 0.27 a
	GI_{50}	1.32 ± 0.15 a
	DGI_{50}	1.25 ± 0.14 a
HT-29	Negative control	2.41 ± 0.22 a
	Doxorubicin	1.44 ± 0.19 a
	GI_{50}	1.73 ± 0.27 a
	DGI_{50}	1.33 ± 0.13 a

$G1_{50}$, MRK-107 concentration causing 50% cell growth inhibition; $DG1_{50}$, double the GI_{50}. Means followed by lowercase letters indicate significant differences at $p < 0.001$ in relation to the negative control.

2.3. MRK-107 Causes Oxidative Stress, Generates Protein Damage, and Ruptures DNA in Caco-2 and HT-29 Cells in Monolayer and Spheroid Cultures

Oxidative stress caused by MRK-107 treatment was quantified using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). The negative control showed low fluorescence intensities compared with the positive control and MRK-107-treated samples (Figure 3A). In MRK-107 treatments, fluorescence was observed in both cell lines. The TBARS content of Caco-2 remained constant even under increasing MRK-107 concentrations; in HT-29, however, there was a reduction of oxidative damage at the highest MRK-107 concentration, although TBARS content was high (Figure 3B).

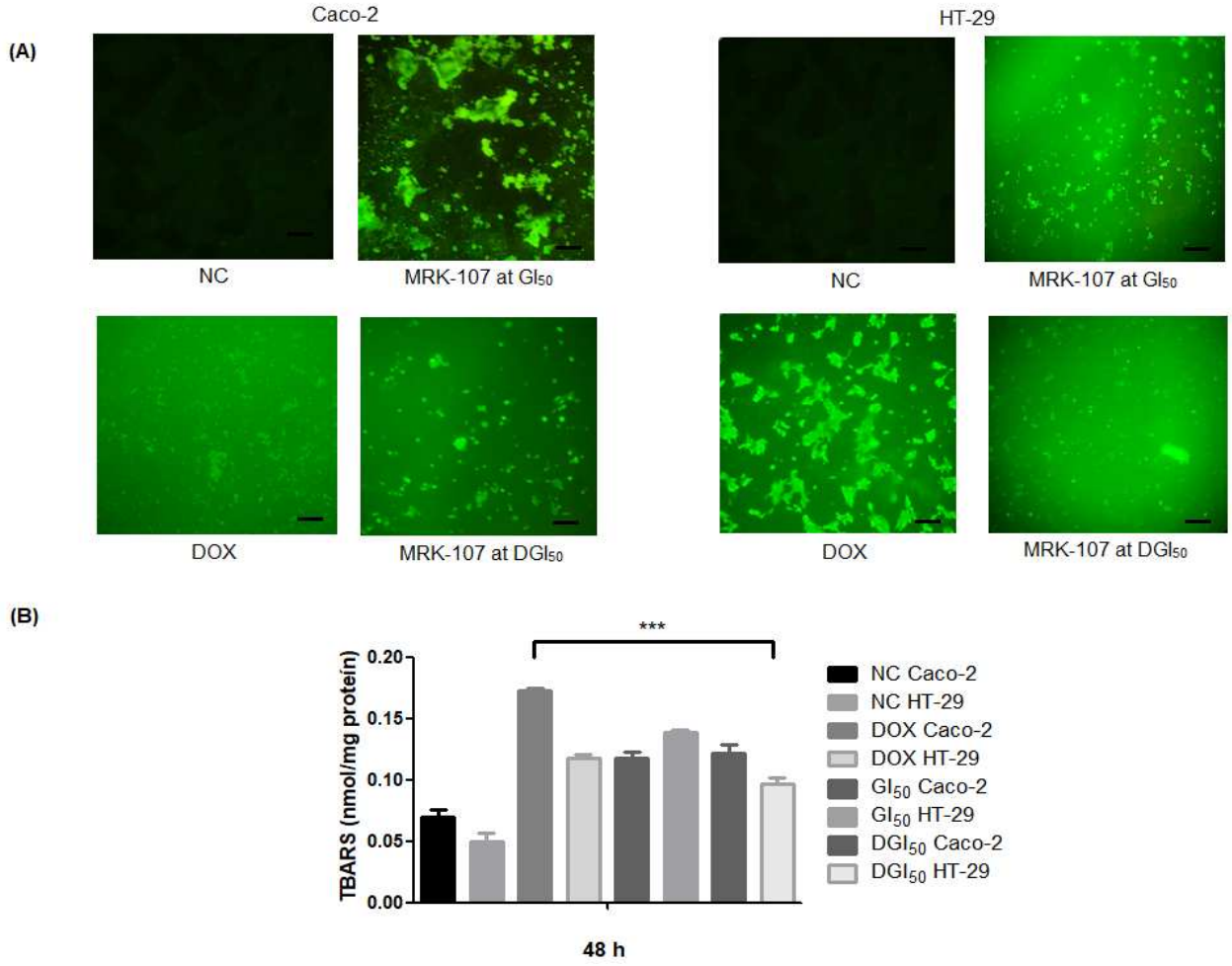


Figure 3. Oxidative stress in colon cancer cells in response to MRK-107 treatment. (**A**) DCFH-DA staining in the negative control (NC) and Caco-2 and HT-29 cells at 48 h after treatment with MRK-107 or doxorubicin (DOX, positive control). (**B**) TBARS content of Caco-2 and HT-29 cells at 48 h after treatment, as assessed by spectrophotometry. *** $p < 0.001$ compared with NC. Scale bar = 20 μm.

2.4. MRK-107 Activates Caspases-3/7 in Caco-2 and HT-29 Cells in Monolayer and Spheroid Cultures

The effect of MRK-107 on caspase-3/7 activities was determined to confirm the flow cytometric results of spheroid cultures. The apoptotic cell death marker CellEvent (Figure 4A) and PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 (Figure 4B) were used for flow cytometry assays. MRK-107 increased caspase-3/7 activities after 24 h of treatment in both cell lines at both concentrations.

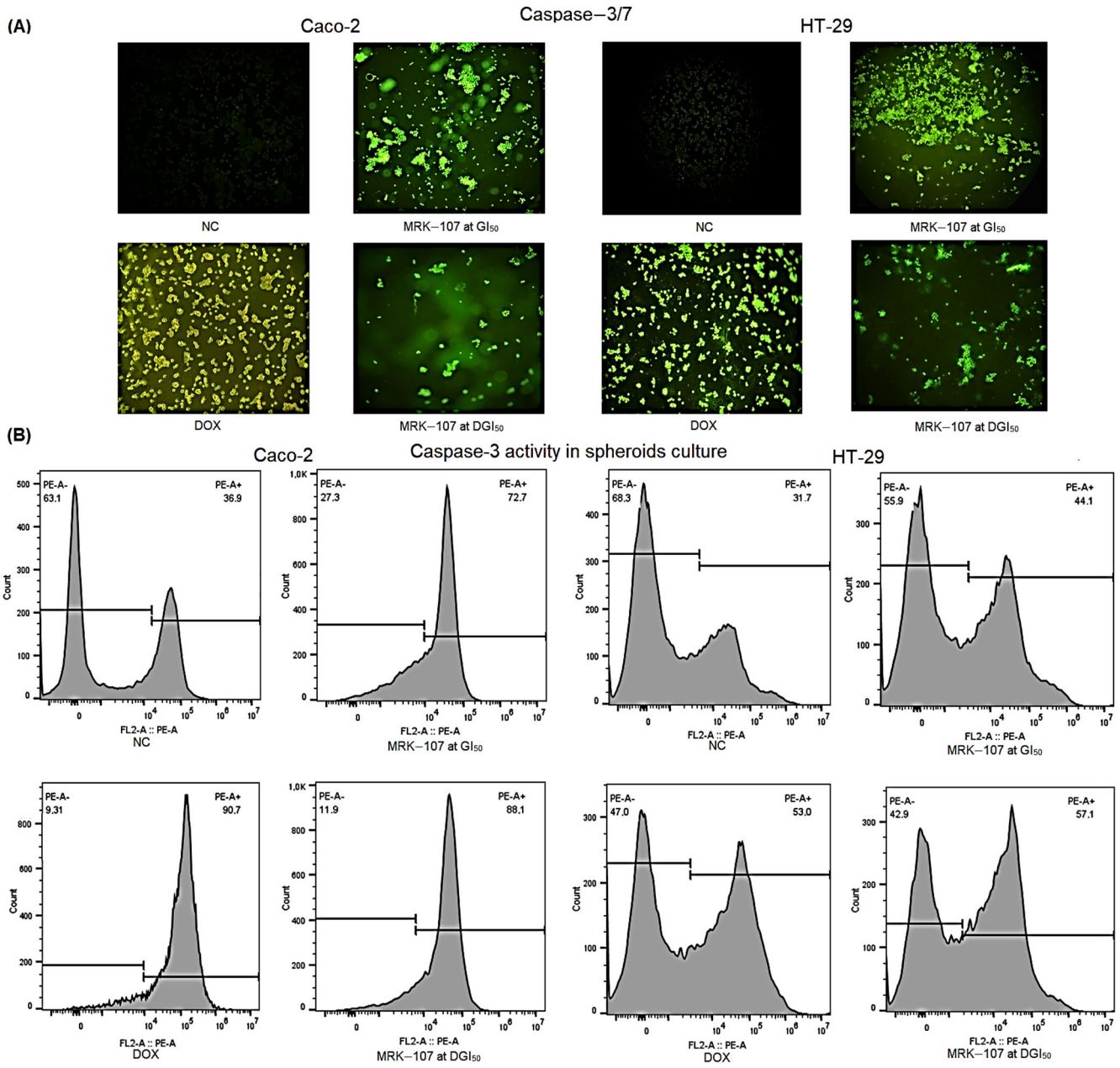


Figure 4. Caspase-3/7 activities in colon cancer cells treated with MRK-107. (**A**) Fluorescent signals of the negative control (NC) and Caco-2 and HT-29 cells at 24 h after treatment with MRK-107 or doxorubicin (DOX, positive control), as assessed using the CellEvent kit. (**B**) Caspase-3 activity in 3D cultures of Caco-2 and HT-29 at 24 h after treatment, as assessed by flow cytometry. Scale bar = 20 μm.

2.5. MRK-107 Induces Apoptosis of Caco-2 and HT-29 Cells

MRK-107-induced cell death of Caco-2 and HT-29 was evaluated using differential fluorescent staining with acridine orange and ethidium bromide. MRK-107 was used at the GI_{50} for Caco-2 (2.40 μM) and HT-29 (1.13 μM), as well as at the DGI_{50}, in 2D and 3D cultures. In monolayer cultures treated with MRK-107, there was a dose-dependent loss of anchorage and presence of early-stage apoptotic cells, as evidenced by the yellow-green fluorescence of the cell nucleus. Stains were located asymmetrically within cells. With increasing MRK-107 concentration and treatment duration, the number of early-stage apoptotic cells increased. Late-stage apoptotic cells, characterized by concentrated and asymmetrically located orange nuclear staining, were also detected (Figures 5 and 6). Necrotic cells increased in volume and showed orange-red fluorescence.

Pharmaceuticals **2023**, *16*, 814

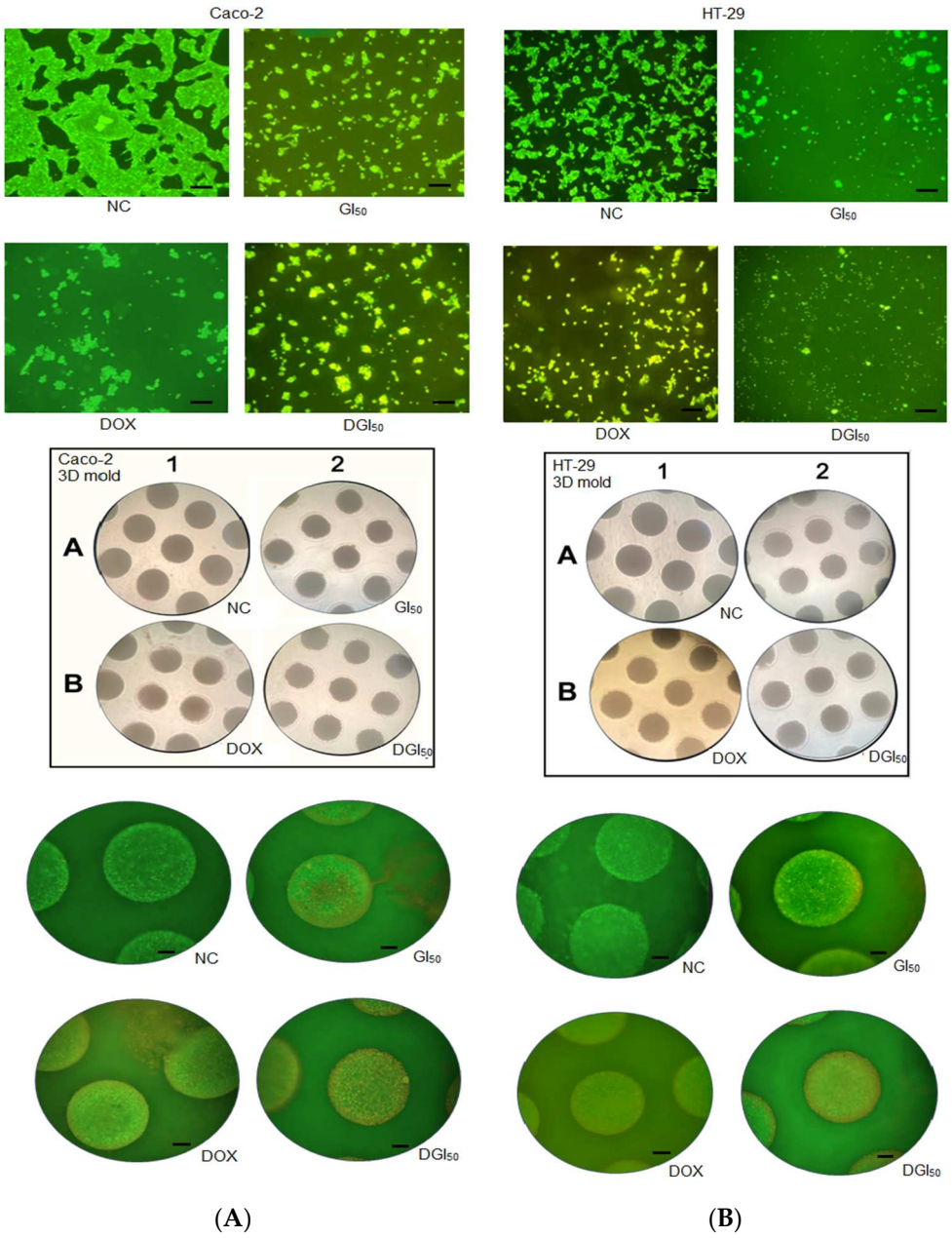


Figure 5. Cell death in response to MRK-107 in 2D and 3D cultures of Caco-2 and HT-29 at 48 h after treatment, as assessed using acridine orange and ethidium bromide staining. In the negative control (NC, normal cells), note the circular nucleus uniformly distributed in the center of cells. MRK-107 and doxorubicin (DOX, positive control) treatments resulted in early and late apoptotic cells, with the nucleus showing yellowish-green fluorescence by acridine orange staining. (**A**) Acridine orange/ethidium bromide staining of 2D and 3D Caco-2 cell cultures and the cells after 48 h of treatment in spheroid molds. (**B**) Acridine orange/ethidium bromide staining of 2D and 3D HT-29 cell cultures and the cells after 48 h of treatment in spheroid molds. Scale bar = 100 μm.

The 3D culture showed higher staining definition, with signs of advanced apoptosis, vacuole formation, and textural changes in cell interactions after treatment with MRK-107. The percentages of viable, early apoptotic, late apoptotic, and necrotic Caco-2 and HT-29 cells are shown in Figure 6. The annexin V-FITC/propidium iodide assay was used to determine the cell death profile of 2D and 3D cultures. Caco-2 and HT-29 cells showed reduced viability, with significant differences between cell lines and culture types. MRK-107 toxicity was found to be dose-dependent. The 2D culture had high peaks of early cell death,

whereas the 3D culture had mainly late apoptosis peaks. Overall, there was a low presence of necrotic cells, being lowest in the HT-29 3D model. Regardless of the cell model used, MRK-107 demonstrated pro-apoptotic action at both concentrations, as assessed using the annexin V-FITC detection kit.

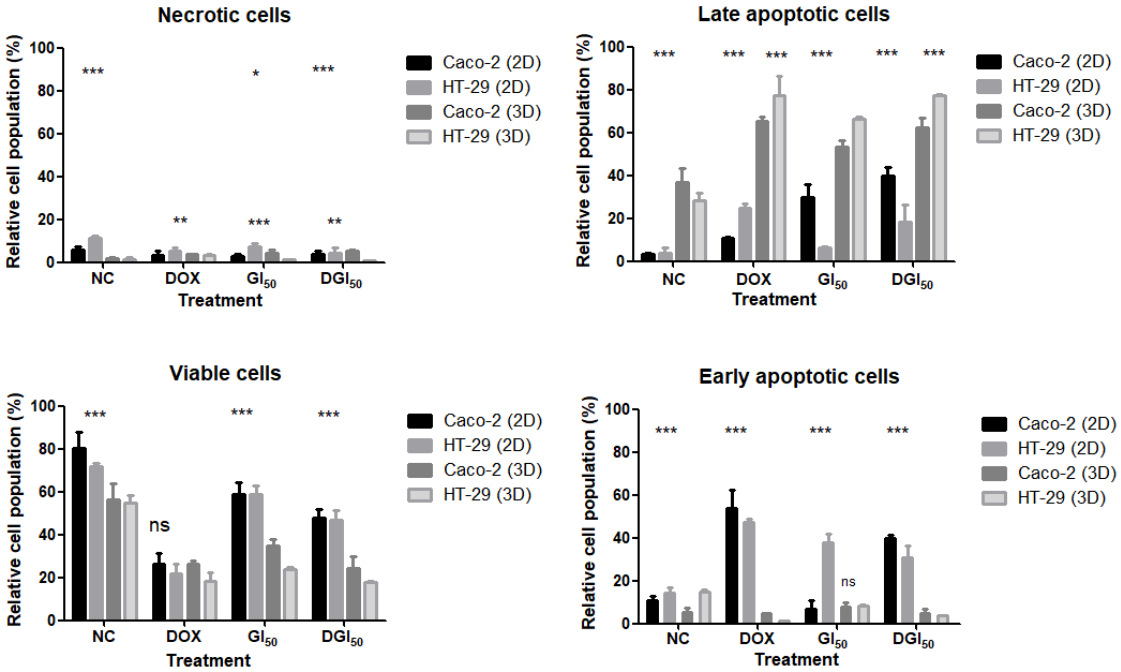


Figure 6. Annexin V and propidium iodide results of negative control (NC) and Caco-2 and HT-29 cells in 2D and 3D models at 48 h after treatment with MRK-107 or doxorubicin (DOX, positive control). Fluorescent population of necrotic, viable, early apoptotic, and late apoptotic cells in 2D and 3D cultures, as evaluated using flow cytometry. Asterisks indicate significant differences between 2D and 3D models; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$; ns—not significant.

3. Discussion

The numerous mutations of colon cancer cells contribute to the poor prognosis of the disease. The incidence and mortality rates of colon cancer are predicted to increase [31], underscoring the importance of improving the survival response, whether through diagnostic markers or chemotherapy [32]. Selenium has been widely evaluated for its chemopreventive potential, but its toxic effects are a cause for concern and its use in food and supplementation is limited [33,34]. New molecules, such as aryl selenoester, may enhance treatment selectivity, thereby minimizing side effects [35]. The selectivity indices of MRK-107 for Caco-2 (9.24) and HT-29 (19.63) were excellent, demonstrating that the compound can be used without altering the proliferative capacity of normal cells. The cell inhibition concentrations of MRK-107 were 2.40 μM for Caco-2 and 1.13 μM for HT-29, representing high anticancer activity [36]. Both cell lines originate from the same region of the colon but have specific characteristics in terms of transepithelial/endothelial resistance [37]. For instance, the physiological barrier of Caco-2 cells is four times more resistant than that of HT-29 cells. This fact might be related to the two-times higher GI_{50} for Caco-2 as compared with HT-29.

A previous study showed that compounds with a similar chemical structure to MRK-107 exhibited moderate activity in vitro and in vivo [38]. Other selenium compounds were shown to have potent anticancer activity against colon cancer cells (GI_{50} = 3.9 μM) but no selectivity (GI_{50} = 3.5 μM for fibroblasts); structural modification with the aim of increasing selectivity resulted in moderate anticancer activity [39]. Chemical modification of MRK-107 with 2-methoxyphenyl seems to be sufficient to confer polarity and electrophilicity when binding to selenium; organoselenium compounds can act as redox

modulators, showing preference for malignant cells and protecting normal cells [40]. The methoxy group reflects a greater possibility of oxidative reactions; thus, MRK-107 has more intense lipoperoxidation because it generates damage to the thiol groups [41]. Another ally in the structure–activity relationship of selenium organocompounds is methyl attached to the aromatic ring, which affects the mitochondrial membrane potential and facilitates the apoptotic process [42]. Cytotoxic effects during treatment may be followed by recovery of proliferation or permanent damage, which leads to cell death [43]. Previous research with selenium compounds showed decreased migration and invasion of cancer cells. MRK-107 caused permanent damage, leading to inefficient proliferation recovery, as evaluated using standards that disregard <50% cell growth; these findings demonstrate that MRK-107 also prevents new clone formation in the long term [44,45]. The proliferation index of cancer cells was 2.4–3, demonstrating concentration-dependent cellular quiescence [46]. MRK-107 reduced the proliferative index by 29% at GI_{50} and by at least 45% at DGI_{50}. The decrease in cell proliferation and induction of cell death by apoptosis was proportional to the inhibition of cell division progression. Selenium compounds were found to increase the proportion of Caco-2 and HT-29 cells in the sub-G1 phase by blocking the progression to the S phase [47]. Some cytotoxic treatments involving selenium, such as MRK-107, are dependent on caspases to generate cytotoxicity [48].

MRK-107 is a selenoether prone to oxidize and release redox-active compounds [49]. A possible mechanism of action of MRK-107 through redox shift toward oxidation would involve the cross-linking of protein thiol groups and the promotion of ROS generation, propitiating lipid peroxidation events, DNA damage, mitochondrial respiratory chain destruction, and protein modifications [50]. The increased fluorescence of DCFH-DA is interpreted primarily as resulting from the increased production of free radicals mediated by hydrogen peroxide, a product of nitric oxide and superoxide reactions [51]. In the 2D model, we detected the most expressive oxidative stress in HT-29 cells. In the 3D model, peroxidation was also highest in HT-29, but values decreased at the highest concentration. In Caco-2 cells, DCFH-DA fluorescence was stronger in the 2D model. In the 3D model, oxidative damage reached a plateau at the highest doses, thereby indicating a great possibility of damage to cell membranes, proteins, amino acids, and DNA [52].

Oxidative stress in the tumor microenvironment has a pro-inflammatory action directed at enhancing antitumor immunity and inducing cell death signaling pathways [53]. There are several intermediate forms of cell death with apoptotic and necrotic morphological features. It is possible to gain insight into such processes by analyzing membrane permeability [54]. Caspases−3 and −7 have an effector function and act downstream of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways [55]. MRK-107 produced expressive results in both 2D and 3D culture models, but activation was more intense in Caco-2 cells upon doxorubicin (DOX) treatment. It is known that the cytotoxic action of compounds commonly differs between 2D and 3D models. This discrepancy is due to the organizational behavior of tumor cells, which are prone to produce necrotic regions with poor vascularization and hypoxic conditions, creating a therapeutic gradient. Such a gradient can be observed by differential staining with acridine orange and ethidium bromide, which reveals the loss of cellular arrangements in three different zones and of variable sensitivity [56].

The main type of cell death was early apoptosis in the 2D model and late apoptosis in the 3D model. Apoptosis susceptibility is determined by interactions between cells, the cell matrix, and ROS production/signaling. In the MRK-107 treatment, it was possible to observe cell deformation and vesicle formation at GI_{50}. At DGI_{50}, the apoptotic effect was evident. A better understanding of ROS generation by cells that constitute the tumor microenvironment is critical to improve therapeutic options and clinical outcomes [57]. The 2D culture overestimates MRK-107 toxicity, but the 3D model achieved more than 50% toxicity at low MRK-107 concentrations. Treatment reduced cell anchorage, characterizing anoikis. As this process depends on activation of oxidation by the detached cell [58], MRK-107 is believed to act via DCFH-DA, TBARS, and annexin V.

Pharmaceuticals **2023**, *16*, 814

Recreating appropriate epithelial–extracellular matrix interactions is a challenge and we are moving toward more robust analyses [59]. Our 3D models supported the formation of an epithelium with a tissue layer similar to the stroma, and MRK-107 was able to disrupt this construction. The Notch proliferation pathway is overexpressed in colon cancer and acts on cell interactions; however, MRK-107 appears to precisely reduce dysregulated expression due to the loss of cell–cell interactions [60]. Other signaling pathways related to reduced cell growth, reduced migration, and increased apoptosis, such as PI3K/Akt, MAPK/ERK, and Wnt/β-catenin, might have been inhibited by MRK-107 treatment [61]. Selenium compounds can inhibit β-catenin, a molecule that generates drug resistance and whose inhibition increases cytotoxicity [62]. In colon cancer, the methylation of histones H3 in K9 generates resistance to the 5-flu chemotherapy, but selenium compounds are associated with the inhibition of these histones and thus the expression of Fas increases and stimulates apoptosis [63,64]. Thus, MRK-107 acts through a combined mechanism based on the accumulation of oxidative stress and the breakdown of signaling molecules necessary for the proliferative activity of cancer cells. Alteration of the membrane potential initiates cytochrome c efflux, which consequently activates caspases-3 and -9. These effects are similar to those of imidazole-derived compounds used to treat colon cancer [65]. Moreover, selenium is considered a promising anticancer agent with lower toxicity, higher bioavailability, and a broad spectrum of biological activities, including antioxidant activity, which allows modulation of aberrant proliferation pathways and activates inflammation, apoptosis, and other cell death-related pathways [66,67].

4. Materials and Methods

4.1. MRK-107 Synthesis

The selenylated imidazo [1,2-*a*]pyridine MRK-107 was synthesized by reaction of imidazo [1,2-*a*]pyridine with diselenide via C(sp^2)–H bond selenylation, as previously reported by us [68–71].

4.2. Cell Lines and Treatments

Caco-2 (HTB-37) and HT-29 (HTB-38) cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA). Both cell lines were grown in monolayer under the following conditions: 100% humidity, 37 °C, and 95% air, and 5% CO_2 atmosphere. Cells were grown in RPMI 1640 (Gibco (Waltham, MA, USA), Life Technologies, Austin, TX, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies, USA). Three-dimensional model cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Life Technologies, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies, USA). Both complete growth media were also supplemented with 50 IU/mL penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, USA). Cells were collected after the third passage at the logarithmic growth phase. Trypan blue (Sigma–Aldrich, Burlington, MA, USA) was used to count live cells. MRK-107 was synthesized, and a stock solution of MRK-107 was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma–Aldrich, USA). Cells were exposed to MRK-107 and DOX (positive control) (Eurofarma, Brazil) for 48 h.

4.3. Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity of MRK-107 and DOX was determined using SRB (Sigma–Aldrich, USA). Caco-2, HT-29, and NIH/3T3 were seeded in 96-well plates at a density of 3×10^5 cells/mL per well. After overnight culture to reach logarithmic growth, MRK-107 (0.635–635.57 μM) and DOX (0.046–48 μM) were added, and cells were incubated for 48 h. The cells were fixed with 20% trichloroacetic acid and, after rinsing and drying, stained with 0.1% SRB. The controls were DOX (positive control), negative control, sample blank, and reading at time zero (before treatment). The optical density was obtained at 540 nm by using a 96-well microplate reader (SpectraMax 190, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA) [72]. The results are the mean of three independent experiments (n = 3). GraphPad Prism software

was used to calculate the concentration that reduces the growth of treated cells by 50% with respect to untreated controls (GI_{50}) [73].

4.4. Selectivity Assay

The selectivity index was calculated as the ratio of the GI_{50} of the test compound for non-tumor cell lines (3T3/NIH) to the GI_{50} for cancer cells (Caco-2 and HT-29) [74].

4.5. Assay

To study the recovery in cell proliferation after drug removal, we first treated Caco-2 and HT-29 cells as described above (Section 4.3). Then, the medium was removed and replaced with fresh medium without the drug. The rate of cell recovery was assessed over the subsequent 48 h by the SRB assay. Cell viability results were compared between the treatment plate and the plate that was washed and kept in culture after treatment [75].

4.6. Clonogenic Assay

Caco-2 and HT-29 cells were plated in 6-well plates at a density of 500 cells/mL and treated for 48 h with or without MRK-107 at GI_{50} or DGI_{50}. DOX was used at 3.68 µM. After incubation, the medium was removed and replaced with fresh drug-free medium. After 9 days, the supernatant was removed and colonies were fixed with 10% formaldehyde for 15 min, stained with 0.5% crystal violet for another 15 min, and counted under an inverted microscope [76]. The number of colonies was counted using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [77].

4.7. Wound-Healing Assay

Caco-2 and HT-29 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL in 24-well plates. When cells reached 80% confluence, the supernatant was discarded and the cell monolayer was scraped to create a straight-line gap. Treatments were as follows: MRK-107 at GI_{50} and DGI_{50}, negative control, and DOX at 3.68 µM. The results were analyzed after 48 h of incubation by ImageJ program (National Institutes of Health, USA) [78].

4.8. Ki-67 Staining

Caco-2 and HT-29 were plated at a density of 5×10^5 cells/mL and incubated with MRK-107 at GI_{50} or DGI_{50}, a negative control solution, or DOX at 3.68 µM for 48 h. Cells were trypsinized and centrifuged. The supernatant was discarded, and cells received the addition of 100 µL of PBS with pre-diluted Ki-67 antibody [79]. Plates were incubated at 4 °C in the dark for 30 min and then centrifuged and washed with PBS. Readings were taken using a CytoFLEX cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Data were analyzed using FlowJo software version 10.8 (BD Life Sciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.9. DCFH-DA

Caco-2 and HT-29 cells were seeded at a density of 5×10^5 cells/mL and treated with MRK-107 at GI_{50} or DGI_{50}, a negative control solution, or DOX at 3.68 µM for 48 h. Staining was performed using 5 µL of 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (Sigma–Aldrich, USA) diluted in DMSO [80]. Stained cells were observed under a fluorescence microscope.

4.10. Spheroid Formation

For spheroid formation, a suspension containing 2×10^6 cells in 120 µL of agarose-supplemented DMEM was pipetted into micromolds (MicroTissues® 3D Petri Dish®, Sigma–Aldrich) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. Caco-2 and HT-29 cells were used. Treatments were as follows: MRK-107 at GI_{50} and DGI_{50} (1.13 and 2.26 µM for Caco-2 and 2.4 and 4.8 µM for HT-29, respectively), DOX at 3.68 µM, and untreated spheroids [81]. The proportion of cell aggregation was monitored at different time points by light microscopy The collection of spheroids for testing was carried out

Pharmaceuticals **2023**, *16*, 814

with pipettes and cell dissociation was performed with enzymatic action (0.25% trypsin solution) [82].

4.11. TBARS Assay

Lipid peroxidation levels were determined spectrophotometrically at 535 nm in the spheroid homogenate by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) method [83]. TBARS values were calculated using a molar extinction coefficient of 153 mM/cm. The absorbance of a pink chromophore was measured in triplicate, and values are expressed as nmol TBARS/mg protein.

4.12. Caspases-3/7

Caspase-3/7 activities were detected using the CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Life Technologies). Caco-2 and HT-29 cells were seeded (1×10^5 cells/mL) in 6-well plates and treated for 48 h. After incubation, cells were labeled with 100 µL of the reagent and observed under a fluorescence microscope [84]. For spheroids, labeling was performed using the PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 kit (BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA). Caco-2 and HT-29 (5×10^5 cells/well) cells seeded on 3D micromolds were treated, dissociated, and the pellet fixed, permeabilized, incubated with 20 µL of the antibody, and analyzed using FlowJo software version 10.8 (BD Life Sciences, USA).

4.13. Differential Staining

Spheroids were stained with a solution of acridine orange (100 µg/mL, Sigma–Aldrich, USA) and ethidium bromide (100 µg/mL, Invitrogen, USA) at a final concentration of 1 µg/mL. Immediately after incubation, cells were observed in the dark under a fluorescence microscope (Olympus BX41) using UV excitation [85]. Images were analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, USA) to determine the fluorescence intensity of the two dyes, expressed as percentage of viable (green) and non-viable (red) cells.

4.14. Annexin V

Apoptotic cell death in Caco-2 and HT-29 cell cultures was determined using the Annexin-V FITC kit (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Briefly, a suspension containing 5×10^5 cells/mL was seeded in 6-well plates or 3D molds, the supernatant was discarded and washed with PBS, and the cells were resuspended in a binding buffer and incubated with 5 µL of FITC-conjugated annexin-V and, after 15 min, 10 µL of propidium iodide solution (1 mg/mL) at room temperature for 10 min in the dark [86]. Immediately after incubation, cells were analyzed using a flow cytometer (CytoFLEX, Beckham Coulter). Data were analyzed using FlowJo software version 10.8 (BD Life Sciences, USA).

4.15. Statistical Analysis

Data from cytotoxicity assays were analyzed using one-way analysis of variance. The normality of continuous variables was confirmed by Tukey's test using GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA). Significant differences were accepted at $p < 0.05$. Results are presented as mean ± standard deviation.

5. Conclusions

In view of the importance of epigenetic mechanisms in colorectal cancer progression and the possibility of reversal through the application of appropriate drugs, it is concluded that MRK-107, a selenylated imidazo [1,2-*a*]pyridine, is a good candidate in the search for improved tumor therapies, with potential as combination therapy or an enhanced pharmaceutical formulation. The 3D model exhibited improved morphological features, and MRK-107 had considerable cytotoxic action in this model despite physiological barriers. MRK-107 is redox-active, pro-oxidant, pro-inflammatory, pro-apoptotic, and capable of activating additional antiproliferative pathways.

Author Contributions: Conceptualization, G.B.G. and R.T.P.; methodology, C.S.Z., A.B., J.R., E.B.P., G.B.G. and J.d.S.G.; validation, G.B.G. and R.T.P.; investigation, G.B.G.; resources, G.B.G., M.C.T.-K. and R.T.P.; data curation, G.B.G. and R.T.P.; writing—original draft preparation, G.B.G. and R.T.P.; writing—review and editing, J.R., G.B.G., S.S. and R.T.P.; supervision, S.S. and R.T.P.; project administration, G.B.G.; funding acquisition, S.S. and R.T.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-MS), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001). SS and JR are grateful to CNPq (grants Nos. 315399/2020-1, 422645/2021-4, 309975/2022-0, and 403210/2021-6) and FUNDECT—MS (grant No. 204/2022).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), and Universidade Federal de Goiás (UFG) for the support offered in this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
2. Long, Y.; Wang, D. Inhibition of Colon Cancer Cell Growth by Imidazole Through Activation of Apoptotic Pathway. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 7597–7604. [CrossRef] [PubMed]
3. Kawai, S.; Yamazaki, M.; Shibuya, K.; Fujii, E.; Nakano, K.; Suzuki, M. Three-dimensional culture models mimic colon cancer heterogeneity induced by different microenvironments. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3156. [CrossRef] [PubMed]
4. Farooqi, A.A.; de la Roche, M.; Djamgoz, M.B.A.; Siddik, Z.H. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *58*, 65–79. [CrossRef]
5. Radomska, D.; Czarnomysy, R.; Radomski, D.; Bielawski, K. Selenium Compounds as Novel Potential Anticancer Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1009. [CrossRef]
6. Kuršvietienė, L.; Mongirdienė, A.; Bernatonienė, J.; Šulinskienė, J.; Stanevičienė, I. Selenium Anticancer Properties and Impact on Cellular Redox Status. *Antioxidants* **2020**, *9*, 80. [CrossRef]
7. Rodrigues, O.E.D.; de Souza, D.; Soares, L.C.; Dornelles, L.; Burrow, R.A.; Appelt, H.R.; Alves, C.F.; Alves, D.; Braga, A.L. Stereoselective synthesis of selenosteroids. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2237–2240. [CrossRef]
8. Indira Priyadarsini, K.; Singh, B.G.; Kunwar, A. Current Developments on Synthesis, Redox Reactions and Biochemical Studies of Selenium Antioxidants. *Curr. Chem. Biol.* **2013**, *7*, 37–46. [CrossRef]
9. Frizon, T.E.A.; Cararo, J.H.; Saba, S.; Dal-Pont, G.C.; Michels, M.; Braga, H.C.; Pimentel, T.; Dal-Pizzol, F.; Valvassori, S.S.; Rafique, J. Synthesis of Novel Selenocyanates and Evaluation of Their Effect in Cultured Mouse Neurons Submitted to Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, *2020*, 5417024. [CrossRef]
10. He, J.; Wu, Z.; Pan, D.; Guo, Y.; Zeng, X. Effect of selenylation modification on antitumor activity of peptidoglycan from Lactobacillus acidophilus. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *165*, 344–350. [CrossRef] [PubMed]
11. Sharma, A.K.; Kline, C.L.; Berg, A.; Amin, S.; Irby, R.B. The Akt inhibitor ISC-4 activates prostate apoptosis response protein-4 and reduces colon tumor growth in a nude mouse model. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 4474–4483. [CrossRef]
12. Burkner, G.T.; Dias, D.A.; Souza, K.F.; Araújo, A.J.; Basilio, D.C.; Jacobsen, F.T.; Moraes, A.C.; Silva-Filho, S.E.; Cavalcante, M.F.; Moraes, C.A.; et al. Selenylated Imidazo [1,2-a]pyridine Induces Cell Senescence and Oxidative Stress in Chronic Myeloid Leukemia Cells. *Molecules* **2023**, *28*, 893. [CrossRef]
13. Dos Santos, D.C.; Rafique, J.; Saba, S.; Almeida, G.M.; Siminski, T.; Pádua, C.; Filho, D.W.; Zamoner, A.; Braga, A.L.; Pedrosa, R.C.; et al. Apoptosis oxidative damage-mediated and antiproliferative effect of selenylated imidazo [1,2-a]pyridines on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and in vivo. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2021**, *35*, e22663. [CrossRef]
14. Dos Santos, D.C.; Rafique, J.; Saba, S.; Grinevicius, V.M.A.S.; Filho, D.W.; Zamoner, A.; Braga, A.L.; Pedrosa, R.C.; Ourique, F. IP-Se-06, a Selenylated Imidazo [1,2-a] pyridine, Modulates Intracellular Redox State and Causes Akt/mTOR/HIF-1α and MAPK

Signaling Inhibition, Promoting Antiproliferative Effect and Apoptosis in Glioblastoma Cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2022**, *2022*, 3710449. [CrossRef] [PubMed]
15. Almeida, G.M.; Rafique, J.; Saba, S.; Siminski, T.; Mota, N.S.R.S.; Filho, D.W.; Braga, A.L.; Pedrosa, R.C.; Ourique, F. Novel selenylated imidazo [1,2-a]pyridines for breast cancer chemotherapy: Inhibition of cell proliferation by Akt-mediated regulation, DNA cleavage and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *503*, 1291–1297. [CrossRef]
16. Domínguez-Álvarez, E.; Plano, D.; Font, M.; Calvo, A.; Prior, C.; Jacob, C.; Palop, J.A.; Sanmartín, C. Synthesis and antiproliferative activity of novel selenoester derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *73*, 153–166. [CrossRef] [PubMed]
17. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40. [CrossRef]
18. Hariharan, S.; Dharmaraj, S. Selenium and selenoproteins: It's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacology* **2020**, *28*, 667–695. [CrossRef]
19. Boulahjar, R.; Rincon Arias, A.; Bolteau, R.; Renault, N.; Coevoet, M.; Barczyk, A.; Duroux, R.; Yous, S.; Melnyk, P.; Agouridas, L. Design and synthesis of 2,6-disubstituted-8-amino imidazo [1,2*a*]pyridines, a promising privileged structure. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 3296–3307. [CrossRef]
20. Lourenço, D.; Lopes, R.; Pestana, C.; Queirós, A.C.; João, C.; Carneiro, E.A. Patient-Derived Multiple Myeloma 3D Models for Personalized Medicine-Are We There Yet? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12888. [CrossRef] [PubMed]
21. Reidy, E.; Leonard, N.A.; Treacy, O.; Ryan, A.E. A 3D View of Colorectal Cancer Models in Predicting Therapeutic Responses and Resistance. *Cancers* **2021**, *13*, 227. [CrossRef]
22. Fitzgerald, A.A.; Li, E.; Weiner, L.M. 3D Culture Systems for Exploring Cancer Immunology. *Cancers* **2020**, *13*, 56. [CrossRef] [PubMed]
23. Veloso, I.C.; Delanogare, E.; Machado, A.E.; Braga, S.P.; Rosa, G.K.; De Bem, A.F.; Rafique, J.; Saba, S.; da Trindade, R.N.; Galetto, F.Z.; et al. A selanylimidazopyridine (3-SePh-IP) reverses the prodepressant- and anxiogenic-like effects of a high-fat/high-fructose diet in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **2021**, *73*, 673–681. [CrossRef]
24. Franco, M.S.; Saba, S.; Rafique, J.; Braga, A.L. KIO. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 18454–18460. [CrossRef] [PubMed]
25. Doerner, C.V.; Neto, J.S.S.; Cabreira, C.R.; Saba, S.; Sandjo, L.P.; Rafique, J.; Braga, A.L.; de Assis, F.F. Synthesis of 3-selanyl-isoflavones from 2-hydroxyphenyl enaminones using trichloroisocyanuric acid (TCCA): A sustainable approach. *New J. Chem.* **2023**, *47*, 5598–5602. [CrossRef]
26. Pedroso, G.J.; Costa, D.M.S.; Felipe Kokuszi, L.T.; da Silva, E.B.V.; Cavalcante, M.F.O.; Junca, E.; Moraes, C.A.O.; Pich, C.T.; de Lima, V.R.; Saba, S.; et al. Selenylated indoles: Synthesis, effects on lipid membrane properties and DNA cleavage. *New J. Chem.* **2023**, *47*, 2719–2726. [CrossRef]
27. Peterle, M.M.; Scheide, M.R.; Silva, L.T.; Saba, S.; Rafique, J.; Braga, A.L. Copper-Catalyzed Three-Component Reaction of Oxadiazoles, Elemental Se/S and Aryl Iodides: Synthesis of Chalcogenyl (Se/S)-Oxadiazoles. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 13191–13196. [CrossRef]
28. Rafique, J.; Farias, G.; Saba, S.; Zapp, E.; Bellettini, I.C.; Momoli Salla, C.A.; Bechtold, I.H.; Scheide, M.R.; Santos Neto, J.S.; Monteiro de Souza Junior, D.; et al. Selenylated-oxadiazoles as promising DNA intercalators: Synthesis, electronic structure, DNA interaction and cleavage. *Dyes. Pigm.* **2020**, *180*, 108519. [CrossRef]
29. Saba, S.; Dos Santos, C.R.; Zavarise, B.R.; Naujorks, A.A.S.; Franco, M.S.; Schneider, A.R.; Scheide, M.R.; Affeldt, R.F.; Rafique, J.; Braga, A.L. Photoinduced, Direct C(sp^2)−H Bond Azo Coupling of Imidazoheteroarenes and Imidazoanilines with Aryl Diazonium Salts Catalyzed by Eosin Y. *Chemistry* **2020**, *26*, 4461–4466. [CrossRef] [PubMed]
30. Saba, S.; Preve, N.B.; Granja, I.J.A.; Pedroso, G.J.; Cabreira, C.R.; Dreyer, J.P.; Ribeiro, L.F.B.; Horn, A.P.; Marinho, M.A.G.; Bellettini, I.C.; et al. Synthesis of silver nanoparticles coupled with aromatic diselenides: Greener approach, potential against glioma cells and DNA interaction. *New J. Chem.* **2023**, *47*, 2727–2735. [CrossRef]
31. Morgan, E.; Arnold, M.; Gini, A.; Lorenzoni, V.; Cabasag, C.J.; Laversanne, M.; Vignat, J.; Ferlay, J.; Murphy, N.; Bray, F. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut* **2023**, *72*, 338–344. [CrossRef] [PubMed]
32. Xie, Y.H.; Chen, Y.X.; Fang, J.Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 22. [CrossRef] [PubMed]
33. Fernandes, A.P.; Gandin, V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 1642–1660. [CrossRef]
34. Zakharia, Y.; Bhattacharya, A.; Rustum, Y.M. Selenium targets resistance biomarkers enhancing efficacy while reducing toxicity of anti-cancer drugs: Preclinical and clinical development. *Oncotarget* **2018**, *9*, 10765–10783. [CrossRef] [PubMed]
35. Álvarez-Pérez, M.; Ali, W.; Marć, M.A.; Handzlik, J.; Domínguez-Álvarez, E. Selenides and Diselenides: A Review of Their Anticancer and Chemopreventive Activity. *Molecules* **2018**, *23*, 628. [CrossRef]
36. Indrayanto, G.; Putra, G.S.; Suhud, F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* **2021**, *46*, 273–307. [CrossRef]
37. Haddad, M.J.; Sztupecki, W.; Delayre-Orthez, C.; Rhazi, L.; Barbezier, N.; Depeint, F.; Anton, P.M. Complexification of In Vitro Models of Intestinal Barriers, A True Challenge for a More Accurate Alternative Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3595. [CrossRef] [PubMed]

38. Chuai, H.; Zhang, S.Q.; Bai, H.; Li, J.; Wang, Y.; Sun, J.; Wen, E.; Zhang, J.; Xin, M. Small molecule selenium-containing compounds: Recent development and therapeutic applications. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *223*, 113621. [CrossRef] [PubMed]
39. Begines, P.; Sevilla-Horrillo, L.; Puerta, A.; Puckett, R.; Bayort, S.; Lagunes, I.; Maya, I.; Padrón, J.M.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J.G. Masked Phenolic-Selenium Conjugates: Potent and Selective Antiproliferative Agents Overcoming P-gp Resistance. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 358. [CrossRef]
40. Gandin, V.; Khalkar, P.; Braude, J.; Fernandes, A.P. Organic selenium compounds as potential chemotherapeutic agents for improved cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *127*, 80–97. [CrossRef] [PubMed]
41. Stefanello, S.T.; Mizdal, C.R.; Gonçalves, D.F.; Hartmann, D.D.; Dobrachinski, F.; de Carvalho, N.R.; Salman, S.M.; Sauer, A.C.; Dornelles, L.; de Campos, M.M.A.; et al. The insertion of functional groups in organic selenium compounds promote changes in mitochondrial parameters and raise the antibacterial activity. *Bioorg. Chem.* **2020**, *98*, 103727. [CrossRef]
42. Metes-Kosik, N.; Luptak, I.; Dibello, P.M.; Handy, D.E.; Tang, S.S.; Zhi, H.; Qin, F.; Jacobsen, D.W.; Loscalzo, J.; Joseph, J. Both selenium deficiency and modest selenium supplementation lead to myocardial fibrosis in mice via effects on redox-methylation balance. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 1812–1824. [CrossRef] [PubMed]
43. Sebaugh, J.L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm. Stat.* **2011**, *10*, 128–134. [CrossRef]
44. Brix, N.; Samaga, D.; Belka, C.; Zitzelsberger, H.; Lauber, K. Analysis of clonogenic growth in vitro. *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 4963–4991. [CrossRef]
45. Agena, R.; de Jesús Cortés-Sánchez, A.; Hernández-Sánchez, H.; Jaramillo-Flores, M.E. Pro-Apoptotic Activity of Bioactive Compounds from Seaweeds: Promising Sources for Developing Novel Anticancer Drugs. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 182. [CrossRef] [PubMed]
46. Lee, H.J.; Gau, C.C.; Lee, W.F.; Lee, W.I.; Huang, J.L.; Chen, S.H.; Yeh, H.Y.; Liang, C.J.; Fu, S.H. Comparison of [^{3}H]-Thymidine, Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester and Ki-67 in Lymphocyte Proliferation. *Front. Pediatr.* **2022**, *10*, 638549. [CrossRef] [PubMed]
47. Sobecki, M.; Mrouj, K.; Colinge, J.; Gerbe, F.; Jay, P.; Krasinska, L.; Dulic, V.; Fisher, D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2722–2734. [CrossRef] [PubMed]
48. Sanmartín, C.; Plano, D.; Sharma, A.K.; Palop, J.A. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: An overview for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 9649–9672. [CrossRef]
49. Misra, S.; Boylan, M.; Selvam, A.; Spallholz, J.E.; Björnstedt, M. Redox-active selenium compounds—from toxicity and cell death to cancer treatment. *Nutrients* **2015**, *7*, 3536–3556. [CrossRef]
50. Razaghi, A.; Poorebrahim, M.; Sarhan, D.; Björnstedt, M. Selenium stimulates the antitumour immunity: Insights to future research. *Eur. J. Cancer* **2021**, *155*, 256–267. [CrossRef]
51. Marrocco, I.; Altieri, F.; Peluso, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 6501046. [CrossRef] [PubMed]
52. Lian, P.; Braber, S.; Varasteh, S.; Wichers, H.J.; Folkerts, G. Hypoxia and heat stress affect epithelial integrity in a Caco-2/HT-29 co-culture. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13186. [CrossRef]
53. Aboelella, N.S.; Brandle, C.; Kim, T.; Ding, Z.C.; Zhou, G. Oxidative Stress in the Tumor Microenvironment and Its Relevance to Cancer Immunotherapy. *Cancers* **2021**, *13*, 986. [CrossRef] [PubMed]
54. Ziegler, U.; Groscurth, P. Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* **2004**, *19*, 124–128. [CrossRef] [PubMed]
55. Li, X.; Qiu, Z.; Jin, Q.; Chen, G.; Guo, M. Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT-29 Cells Induced by Dichloromethane Fraction From. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 629. [CrossRef]
56. Gupta, R.; Sharma, D. Therapeutic response differences between 2D and 3D tumor models of magnetic hyperthermia. *Nanoscale Adv.* **2021**, *3*, 3663–3680. [CrossRef]
57. Basak, D.; Uddin, M.N.; Hancock, J. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). *Cancers* **2020**, *12*, 3336. [CrossRef]
58. Wang, Y.N.; Zeng, Z.L.; Lu, J.; Wang, Y.; Liu, Z.X.; He, M.M.; Zhao, Q.; Wang, Z.X.; Li, T.; Lu, Y.X.; et al. CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes colorectal cancer cell metastasis by inhibiting anoikis. *Oncogene* **2018**, *37*, 6025–6040. [CrossRef]
59. Darling, N.J.; Mobbs, C.L.; González-Hau, A.L.; Freer, M.; Przyborski, S. Bioengineering Novel. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 992. [CrossRef]
60. Koveitypour, Z.; Panahi, F.; Vakilian, M.; Peymani, M.; Seyed Forootan, F.; Nasr Esfahani, M.H.; Ghaedi, K. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci.* **2019**, *9*, 97. [CrossRef]
61. Malinowsky, K.; Nitsche, U.; Janssen, K.P.; Bader, F.G.; Späth, C.; Drecoll, E.; Keller, G.; Höfler, H.; Slotta-Huspenina, J.; Becker, K.F. Activation of the PI3K/AKT pathway correlates with prognosis in stage II colon cancer. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 2081–2089. [CrossRef] [PubMed]
62. Hashem, S.; Ali, T.A.; Akhtar, S.; Nisar, S.; Sageena, G.; Ali, S.; Al-Mannai, S.; Therachiyil, L.; Mir, R.; Elfaki, I.; et al. Targeting cancer signaling pathways by natural products: Exploring promising anti-cancer agents. *Biomed. Pharm.* **2022**, *150*, 113054. [CrossRef] [PubMed]
63. Toubhans, B.; Alkafri, N.; Quintela, M.; James, D.W.; Bissardon, C.; Gazze, S.; Knodel, F.; Proux, O.; Gourlan, A.T.; Rathert, P.; et al. Selenium nanoparticles modulate histone methylation via lysine methyltransferase activity and S-adenosylhomocysteine depletion. *Redox Biol.* **2023**, *61*, 102641. [CrossRef] [PubMed]

64. Paschall, A.V.; Yang, D.; Lu, C.; Choi, J.H.; Li, X.; Liu, F.; Figueroa, M.; Oberlies, N.H.; Pearce, C.; Bollag, W.B.; et al. H3K9 Trimethylation Silences Fas Expression To Confer Colon Carcinoma Immune Escape and 5-Fluorouracil Chemoresistance. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 1868–1882. [CrossRef]
65. Liu, Z.; Li, Y.; Zhu, Y.; Li, N.; Li, W.; Shang, C.; Song, G.; Li, S.; Cong, J.; Li, T.; et al. Apoptin induces pyroptosis of colorectal cancer cells via the GSDME-dependent pathway. *Int. J. Biol. Sci.* **2022**, *18*, 717–730. [CrossRef]
66. Protti, S.; Fagnoni, M. Recent Advances in Light-Induced Selenylation. *ACS Org. Inorg. Au* **2022**, *2*, 455–463. [CrossRef]
67. Rusetskaya, N.Y.; Fedotov, I.V.; Koftina, V.A.; Borodulin, V.B. Selenium compounds in redox regulation of inflammation and apoptosis. *Biomed. Khim.* **2019**, *65*, 165–179. [CrossRef]
68. Bettanin, L.; Saba, S.; Doerner, C.V.; Franco, M.S.; Godoi, M.; Rafique, J.; Braga, A.L. NH4I-catalyzed chalcogen(S/Se)-functionalization of 5-membered N-heteroaryls under metal-free conditions. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 3971–3980. [CrossRef]
69. Rafique, J.; Saba, S.; Rosário, A.R.; Braga, A.L. Regioselective, Solvent- and Metal-Free Chalcogenation of Imidazo [1,2-a]pyridines by Employing I2/DMSO as the Catalytic Oxidation System. *Chemistry* **2016**, *22*, 11854–11862. [CrossRef]
70. Rafique, J.; Saba, S.; Franco, M.S.; Bettanin, L.; Schneider, A.R.; Silva, L.T.; Braga, A.L. Direct, Metal-free C(sp_2)−H Chalcogenation of Indoles and Imidazopyridines with Dichalcogenides Catalysed by KIO_3. *Chemistry* **2018**, *24*, 4173–4180. [CrossRef]
71. Saba, S.; Rafique, J.; Franco, M.S.; Schneider, A.R.; Espíndola, L.; Silva, D.O.; Braga, A.L. Rose Bengal catalysed photo-induced selenylation of indoles, imidazoles and arenes: A metal free approach. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 880–885. [CrossRef] [PubMed]
72. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. [CrossRef] [PubMed]
73. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757–766. [CrossRef] [PubMed]
74. López-Lázaro, M. How many times should we screen a chemical library to discover an anticancer drug? *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 167–169. [CrossRef]
75. Carr, B.I.; Cavallini, A.; Lippolis, C.; D'Alessandro, R.; Messa, C.; Refolo, M.G.; Tafaro, A. Fluoro-Sorafenib (Regorafenib) effects on hepatoma cells: Growth inhibition, quiescence, and recovery. *J. Cell Physiol.* **2013**, *228*, 292–297. [CrossRef]
76. Franken, N.A.; Rodermond, H.M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315–2319. [CrossRef]
77. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [CrossRef]
78. Rodriguez, L.G.; Wu, X.; Guan, J.L. Wound-healing assay. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *294*, 23–29. [CrossRef]
79. Yang, C.W.; Liu, X.J.; Zhao, L.; Che, F.; Yin, Y.; Chen, H.J.; Zhang, B.; Wu, M.; Song, B. Preoperative prediction of gastrointestinal stromal tumors with high Ki-67 proliferation index based on CT features. *Ann. Transl. Med.* **2021**, *9*, 1556. [CrossRef]
80. Possel, H.; Noack, H.; Augustin, W.; Keilhoff, G.; Wolf, G. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 175–178. [CrossRef]
81. Gomes, G.B.; Zubieta, C.S.; Weber, S.S.; de Lima, D.P.; Reddy, T.N.; Guerrero, A.T.G.; Matos, M.D.F.C.; Parisotto, E.B.; Perdomo, R.T. Thiopyrimidine derivatives induce cytotoxicity, cell cycle arrest and oxidative stress in breast cancer 3D-spheroids. *Chem. Pap.* **2020**, *75*, 1211–1220. [CrossRef]
82. Napolitano, A.P.; Chai, P.; Dean, D.M.; Morgan, J.R. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 2087–2094. [CrossRef]
83. Bird, R.P.; Draper, H.H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 299–305. [CrossRef]
84. Wong, W.; Gan, W.L.; Teo, Y.K.; Lew, W.S. Interplay of cell death signaling pathways mediated by alternating magnetic field gradient. *Cell Death Discov.* **2018**, *4*, 49. [CrossRef]
85. McGahon, A.J.; Martin, S.J.; Bissonnette, R.P.; Mahboubi, A.; Shi, Y.; Mogil, R.J.; Nishioka, W.K.; Green, D.R. The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell. Biol.* **1995**, *46*, 153–185. [CrossRef]
86. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39–51. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.