

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Análise do perfil de expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em linhagem celular de carcinoma de bexiga humano frente tratamento com compostos de azida de β -arilcalcogênio

Izadora Peter Furtado

Pelotas, 2019

Izadora Peter Furtado

Análise do perfil de expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em linhagem celular de carcinoma de bexiga humano frente tratamento com compostos de azida de β -arilcalcogênio

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Fabiana Seixas

Coorientadora: Fernanda Severo Sabedra Sousa

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F994a Furtado, Izadora Peter

Análise do perfil de expressão de genes antioxidantes em linhagem celular de carcinoma de bexiga humano frente tratamento com compostos de azida de β - arilcalcogênio / Izadora Peter Furtado ; Fabiana Seixas, orientadora. — Pelotas, 2019.

48 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Neoplasias. 2. Atividade antioxidante. 3. Estresse oxidativo. 4. Compostos organocalcogênios. 5. Telúrio. I. Seixas, Fabiana, orient. II. Título.

Izadora Peter Furtado

Análise do perfil de expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em linhagem celular de carcinoma de bexiga humano frente tratamento com compostos de azida de β -arilcalcogênio

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20 de novembro de 2019

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Fabiana Kömmling Seixas (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof^a. Dr^a. Lucielli Savegnago
Doutora em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria

.....
Prof^a. Dr^a. Thaís Larré Oliveira
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

*A todos aqueles que contribuíram e acrescentaram no fechamento deste ciclo,
Dedico.*

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço pela minha vida e por todas as oportunidades que me são concedidas.

Agradeço aos meus pais, João Carlos e Marilizia, por todo o amor, carinho, atenção, cuidado e proteção que tiveram comigo ao longo dos anos. Por sempre acompanharem de perto e torcerem por mim em todas as etapas da minha vida; por nunca medirem esforços pela minha felicidade e bem estar; por nunca terem deixado faltar nada e sempre sobrar amor em nossa relação. Vocês são meus maiores exemplos de vida, por toda resiliência e batalhas que enfrentaram para estarem onde estão hoje e serem o que são. Minha maior ambição é retribuir todo investimento que depositam em mim e ser motivo de orgulho.

Ao meu irmão, Eduardo, por ser meu companheiro e meu porto seguro. Por compartilhar a vida comigo e ser alguém que sempre me transmite muito amor. És meu orgulho e eu te admiro imensamente.

Aos meu avós, principalmente Eloá e Luiz, por serem o maior significado de amor e dedicação. Obrigada por se fazerem presentes em minha vida, me cobrindo de amor, carinho, mimos e serem um exemplo de união. Sou eternamente grata e sempre guardarei com muita gratidão todos os momentos vividos com vocês.

Aos meus tios, tias e primos, pelo incentivo e apoio recebidos ao longo desses anos. Agradeço pelos momentos em família que servem com combustível para as batalhas diárias da vida

Aos meus colegas e amigos da faculdade, mais especificamente a “Panela da Panela”, os quais mais do que ninguém foram grandes companheiros e incentivadores durante esta caminhada. Nada disso teria o mesmo significado sem vocês por perto. Desejo a cada um que tenham um futuro brilhante recheado de sucesso.

Aos meus amigos de longa data Maristela, Júlia, Paulo, Marina, Mariana e Lucas, por estarem há tanto tempo na minha vida e torcerem por mim. Aos meus amigos de não tanta longa data, mas que da mesma forma foram essenciais durante este último ano, Amanda, Luiz, Mycaella e Lucas, especialmente.

Aos meus orientadores, pela oportunidade de iniciar minha vida na ciência, e aos meus colegas de laboratório, grupo GPO, pela convivência, aprendizado, companheirismo e amizade ao longo destes anos de iniciação científica.

À Universidade Federal de Pelotas e ao curso de graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de ensino público de qualidade e produção científica de alto nível.

“Feliz aquele que transfere o que sabe

e aprende o que ensina”

Cora Coralina

Resumo

FURTADO, Izadora Peter. **Análise do perfil de expressão de genes relacionados com estresse oxidativo em linhagem celular de carcinoma de bexiga humano frente tratamento com compostos de azida de β -arilcalcogênio**. 2019. 47f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

O câncer de bexiga é o nono tipo mais comum entre todos os tipos de câncer e o segundo tipo que mais acomete o sistema genitourinário. O tratamento dessas neoplasias é definido a partir do diagnóstico, o qual revela qual o estadiamento dos tumores. O que se observa, no entanto, é que este tipo tumoral representa um dos mais caros para os sistemas de saúde pública mundial devido as altas taxas de recidivas e tempo prolongado de tratamento. O estresse oxidativo, caracterizado como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio e as defesas antioxidantes endógenas, está relacionado fortemente ao surgimento de câncer. Deste modo, tendo em vista a importância da homeostase antioxidante e a busca por tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos para o câncer de bexiga, os compostos organocalcogênicos de telúrio tem chamado atenção da comunidade científica por terem demonstrado na literatura atividade antitumoral e antioxidante promissora. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de expressão de genes de vias oxidativas em células de carcinoma de bexiga humano (5637), após tratamento com dois compostos de azida de β -arilcalcogênio contendo telúrio em sua estrutura, sendo eles (S)-(2-azido-1-fenil-3-teluriofenil)-propano (1a) e (S)-(2-azido-1-fenil-3-telurio-p-metoxi-fenil)-propano (1b). Para isso, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) para avaliação dos níveis de expressão de genes das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e, por fim, da enzima óxido-nítrico sintase (iNOS). Os resultados obtidos revelaram que o composto 1b aumentou a expressão relativa de todos os genes avaliados, enquanto que o composto 1a apenas aumentou os níveis dos genes de SOD e CAT, quando comparados com o controle. Estes dados indicam que os compostos testados de azida de β -arilcalcogênio (1a e 1b) contendo telúrio demonstraram potencial promissor antioxidante em linhagem celular de carcinoma de bexiga. Contudo, o composto 1b apresenta uma maior expressão relativa dos genes avaliados, demonstrando uma maior atividade oxidante frente as células de câncer de bexiga do que o composto 1a. Porém mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos envolvidos no efeitos destes compostos contra as células de câncer de bexiga.

Palavras-chave: neoplasias; atividade antioxidante; estresse oxidativo; compostos organocalcogênicos; telúrio

Abstract

FURTADO, Izadora Peter. **Analysis of expression profile of genes related to oxidative stress in human bladder carcinoma cell line after treatment with β -aryl-chalcogenium azide compounds.** 2019. 47f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

Bladder cancer is the 9th most common type of cancer between all types and the 2nd most frequent that affects the genitourinary tract. The treatment against the tumors is defined by the diagnosis which determines the staging. What we can observe is that the bladder cancer represents one of the most higher costs of treatment for the public health system because the time of treatment is long and there are high relapse rates. The oxidative stress, an imbalance between the ROS/RNS production and antioxidant defenses, is strongly related with the development of cancer. Thus, in view of the importance of antioxidant homeostasis and the need of new more effective treatment against bladder cancer, the organocalcogenic compounds containing tellurium has been called attention for the interesting biological properties that has showed, such as antitumoral and antioxidant activities. Therefore the aim of this study was to analyze the genic expression profile related to oxidative stress in bladder carcinoma cell line (5637), after treatment with 2 β -aryl-chalcogenium azide compounds containing tellurium being them *S*-(2-azido-1-phenyl-3-telurophenyl)-propane (1a) and *S*-(2-azido-1-phenyl-3-teluro-*p*-methoxy-phenyl)-propane (1b). For this, it was used quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) to evaluate the genic expression levels of superoxide dismutase enzyme (SOD), catalase enzyme (CAT), glutathione peroxidase enzyme (GPx), glutathione reductase (GR) and nitric oxide synthase enzyme (iNOS). The obtained results has showed that the 1b compound increased the expression levels of all genes evaluated, while the 1a compound increased just SOD and CAT levels when compared with control group. These data indicate that the β -aryl-chalcogenium azide compounds containing tellurium has demonstrated promising antioxidant potential in bladder carcinoma cell line, being that 1b compound has demonstrated a higher antioxidant capacity. However more studies are necessary to better understand the action mechanism of these compounds in bladder cancer cells.

Key words: tumors; antioxidant activity; oxidative stress; organocalcogenic compounds; tellurium

Lista de Figuras

Figura 1: Tipos e estágios de neoplasias de bexiga.....	21
Figura 2: Representação esquemática do funcionamento das enzimas antioxidantes endógenas.....	26
Figura 3: Estrutura química dos compostos de azida de β -arilcalcogênio.....	30
Figura 4: Visualização microscópica da linhagem celular 5637 em monocamada.....	31
Figura 5: Níveis de expressão gênica das enzimas endógenas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) avaliadas em células de carcinoma de bexiga após 48h de exposição aos compostos 1a e 1b.....	34
Figura 6: Níveis de expressão gênica das enzimas endógenas glutationala peroxidase (GPx) e glutationala reduzida (GSH) avaliadas em células de carcinoma de bexiga após 48h de exposição aos compostos 1a e 1b.....	35
Figura 7: - Expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) avaliada em células de carcinoma de bexiga após 48h de exposição aos compostos 1a e 1b.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.....	33
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

μl	microlitros
μM	micromolar
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAT	catalase
CCTs	carcinoma de células de transição
cDNA	DNA complementar
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
eNOS	óxido nítrico-sintase endotelial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
HAP	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	óxido nítrico-sintase induzida
MAPK	proteína-quinase ativada por mitógenos
mL	mililitros
nNOS	óxido nítrico-sintase neuronal

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	tampão fosfato-salino
P13K	fosfoinosítídeo 3-quinase
P53	proteína p53
qRT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcriptase reversa
RNA	ácido ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	superóxido dismutase
TUR	ressecção transuretral
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UICC	União Internacional Contra o Câncer

Sumário

1. Introdução geral	15
2. Objetivo	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Revisão bibliográfica	18
3.1 Câncer	18
3.2 Câncer de bexiga	18
3.2.1 Fatores de risco	19
3.2.2 Sintomalogia e diagnóstico	20
3.2.3 Estadiamento das neoplasias	21
3.2.4 Abordagens terapêuticas	23
3.3 Estresse oxidativo	24
3.3.1 Agentes Antioxidantes	27
3.4 Compostos organocalcogênios	29
3.4.1 Compostos organocalcogênios de telúrio	29
4. Materiais e Métodos	31
4.1 Síntese dos compostos	31
4.2 Cultivo Celular	32
4.3 Extração de RNA	32
4.4 Confecção de cDNA	33
4.5 Análise da Expressão gênica	33
4.6 Análise Estatística	34
5. Resultados	35
6. Discussão	37
7. Conclusão	42
8. Perspectivas	43

1. Introdução geral

O câncer é designado como um conjunto de doenças heterogêneas e multifatoriais que acomete milhões de pessoas anualmente. É considerado o segundo principal motivo de mortes ao redor do mundo e reconhecido como um dos maiores e principais problemas de saúde pública mundial (WHO, 2019).

Dentre os diversos tipos, o câncer de bexiga se caracteriza pelo crescimento e diferenciação anormal de células do epitélio urotelial, originando neoplasias classificadas em diferentes graus, de acordo com o tamanho e camadas atingidas pelos tumores. O diagnóstico é de extrema relevância, pois este retrata o estadiamento das neoplasias, de forma a ser possível designar o tratamento adequado e indicação de prognóstico (SANLI et al., 2017).

Os tratamentos usuais para esse tipo de câncer se resumem em ressecção transuretral, em casos de tumores superficiais, cistectomia parcial ou radical, dependendo do tamanho e localização da massa tumoral maligna, radioterapia, imunoterapia com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), além de quimioterapia intravesical e sistêmica (BELLMUNT et al., 2014). Entre os quimioterápicos mais utilizados destacam-se mitomicina, epirrubicina e gemcitabina, além da combinação entre eles (KAMAT et al., 2016).

No entanto, observa-se que o tempo prolongado de tratamento e as altas taxas de recorrência geram um alto custo para os sistemas de saúde pública (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). Neste mesmo sentido, os efeitos adversos desses fármacos também são notoriamente relatados em pacientes submetidos a esses tratamentos. Com isso, aumenta-se a necessidade da busca por novas composições farmacêuticas com potencial antitumoral, de forma a desenvolver novas alternativas mais eficientes e com menos prejuízos para os pacientes na terapia para o câncer de bexiga. Assim, vários grupos de pesquisa tem relatado a relação entre o câncer de bexiga e o estresse oxidativo (SAWICKA et al., 2015).

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes do organismo. A relação entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e o estresse oxidativo causado por elas no ambiente celular é amplamente relatado na literatura e correlacionado ao surgimento de diversas enfermidades que acometem pacientes no mundo, entre elas doenças

neurodegenerativas (como Alzheimer e doença de Parkinson), doenças inflamatórias (artrite reumatóide), cardiovasculares (distrofia muscular), disfunções no sistema imunológico e ao câncer (KOVÁ et al., 2010). Esses radicais livres acabam por causar danos não apenas devido suas concentrações intracelulares, mas também pelo desequilíbrio entre EROs/ERNs e agentes antioxidantes endógenos. Quando há um desbalanço entres eles o estresse oxidativo é gerado e as células ficam suscetíveis a interações e mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) e seu mecanismo de reparo, fatores essenciais à carcinogênese (MATSUI et al., 2000).

Nesse contexto, compostos organocalcogênios tem despertado a atenção da comunidade científica devido a sua já comprovada atividade antitumoral e antioxidante em estudos *in vitro* (DA ROSA et al., 2017; ROSSATO et al., 2002). Estes compostos são caracterizados por apresentarem em sua estrutura elementos chamados calcogênios, pertencentes à família 16 da tabela periódica, não-metálicos, sendo selênio, telúrio e enxofre os principais representantes (MUGESH; PANDA; SINGH, 2000). De forma similar, compostos orgânicos que possuem azida em sua estrutura também tem demonstrada sua versatilidade e alta estabilidade, além de atividades biológicas relatadas (DE SOUZA et al., 2015)

Deste modo, a combinação e síntese química de compostos orgânicos contendo em sua estrutura elementos calcogênios e grupamento azida, versáteis e estáveis para combinação e introdução de estruturas heterocíclicas, demonstram ser uma interessante classe de compostos com potencial antitumoral e capaz de induzir atividade antioxidante em linhagens celulares, como demonstrado em células de adenocarcinoma de pulmão e investigada sua toxicidade em ensaios *in vivo* (TABARELLI et al., 2017).

Sendo assim, o presente trabalho propõe uma avaliação da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em linhagem celular 56337 de carcinoma de bexiga, após tratamento com compostos de azida de β -arilcalcogênio.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de expressão gênica de genes correlacionados com o estresse oxidativo em linhagem celular de carcinoma de bexiga (5637) tratadas com com (S)-(2-azido-1-fenil-3-teluriofenil)-propano (**1a**) e (S)-(2-azido-1-fenil-3-telurio-p-metoxifenil)-propano) (**1b**).

2.2 Objetivos específicos

Verificar os efeitos dos compostos de azida de β -arilcalcogênio sobre as células de carcinoma de bexiga humano;

Extrair o RNA das células após o tratamento com os compostos;

Confeccionar a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir das amostras de RNA obtidas;

Realizar a amplificação, através da técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), dos genes SOD, CAT, GPx, GR e iNOS na linhagem celular após tratamento com compostos de azida de β -arilcalcogênio;

Realizar análise estatística dos níveis de expressão gênica e, assim, avaliar quais genes relacionados com estresse oxidativo estão envolvidos na atividade dos compostos.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Câncer

A nomenclatura câncer é utilizada para designar um conjunto constituído por mais de cem doenças, as quais possuem como característica principal o crescimento desordenado celular em órgãos e tecidos, podendo invadir demais regiões do organismo. Esse crescimento celular desordenado acaba por gerar um acúmulo de células, os tumores, que podem ser benignos ou malignos, sendo estes últimos aqueles que possuem características metastáticas de migração através de vasos linfáticos e sanguíneos (WHO, 2019).

O câncer é considerado extremamente heterogêneo, pelo fato de que existem diversos tipos de neoplasias que acometem diferentes órgãos e tecidos, além de que cada paciente reage de maneira diferente a elas. Também recebe a característica de ser multifatorial, devido as causas dessa doença serem atribuídas a fatores ambientais, genéticos e de estilo de vida. Foram postuladas seis alterações principais, chamadas como marcas do câncer, que caracterizam o processo de malignidade de células normais em células tumorais: sinalização de crescimento autosuficiente, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão e metástase de tecido (HANAHAN; WEINBERG, 2011)

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), é considerado um dos maiores e principais problemas de saúde pública mundial, sendo a segunda principal causa de mortes no mundo e os números estimados de novos casos no mundo, em 2018, foram 18,1 milhões e 9,6 milhões de mortes. No Brasil, a estimativa de novos casos para os anos de 2018-2019 são de 600 mil novos casos para cada ano (INCA, 2018).

3.2 Câncer de bexiga

Dentre os diversos tipos, destaca-se o câncer de bexiga o qual representa o nono tipo mais recorrente de câncer no mundo (FERLAY et al., 2019) e o segundo tipo que mais acomete o trato genitourinário, precedido apenas pelo câncer de

próstata (JOHN; SAID, 2017). Neste sentido, o câncer de bexiga caracteriza-se por se desenvolver nas células do epitélio da camada de superfície mais interna da bexiga, o urotélio.

Com relação a sua epidemiologia, foram estimados para o ano de 2016 a ocorrência de 430.000 novos casos de câncer de bexiga em escala mundial (FERLAY et al., 2019). Enquanto isso, no Brasil as estimativas para o ano de 2018, segundo o Instituto Nacional do Câncer, foram de 9.480 novos casos, sendo estes 6.690 em homens e 2.790 em mulheres (INCA, 2018).

Observa-se uma prevalência do surgimento dessas neoplasias com maior frequência em homens do que em mulheres, sendo o quarto tipo mais recorrente em homens e o décimo primeiro em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015) e as mortes relatadas decorrentes desse tipo tumoral em 2017 no Brasil correspondem a 3.021 referentes a homens e 1.334 mulheres (INCA, 2017). Além disso, 80% dos novos casos são estimados a surgirem em indivíduos com 60 anos ou mais (RIES et al., 2007). Assim sendo, o envelhecimento natural do ser humano, por si só, traz maior suscetibilidade de transformação maligna de células, levado em consideração maior tempo de exposição a fatores de risco.

O câncer de bexiga merece grande atenção pelo fato de que representa um dos tratamentos neoplásicos mais onerosos e custosos para os sistemas de saúde pública, devido as altas taxas de recorrência, em torno de 70% dos pacientes, e os longos períodos de tratamento (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

3.2.1 Fatores de risco

O tabagismo é o principal fator de risco relacionado diretamente ao câncer de bexiga, sendo objeto de diversos estudos epidemiológicos que buscam elucidar essa relação. Relata-se em torno de 2 a 3 vezes maior risco de desenvolvimento de neoplasias na bexiga em indivíduos fumantes (JANKOVIĆ; RADOSAVLJEVIĆ, 2007) e metade desses casos são atribuídos ao consumo de cigarros, tanto em homens quanto em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A exposição a compostos carcinogênicos, no caso de aminas aromáticas utilizadas na fabricação de corantes químicos e hidrocarbonetos aromáticos

policíclicos (HAP), também é relatada como um dos fatores ambientais mais relacionados ao aumento do surgimento de tumores na bexiga (BURGER et al., 2013). Outro fator ambiental diretamente relacionado ao câncer de bexiga são infecções endêmicas, como exemplo a infecção por *Schistosoma hematobium*, em que sua relação com as neoplasias se deu através da explicação de que a irritação crônica do urotélio gera altos níveis de metabólitos favoráveis à carcinogênese (JACQUELINE et al., 2018). Somado aos fatores ambientais, relatam-se mutações em genes que acabam por gerar instabilidades a nível celular, como é o caso do gene supressor de tumores, p53, e genes envolvidos no metabolismo celular, como Nacetiltransferase 2 e a glutatona S-transferase M1 (BURGER et al., 2013).

Existem ainda fatores de pré disposição à doença, como gênero, idade e raça, sendo que homens possuem mais propensão ao surgimento de neoplasias, assim como pessoas de idade mais avançada e indivíduos caucasianos possuem duas vezes mais chance de desenvolverem tumores na bexiga (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

3.2.2 Sintomatologia e diagnóstico

Apesar do câncer ser uma doença de amplo conhecimento, nem sempre seu diagnóstico é feito de maneira ágil e rápida, evitando que seja descoberto precocemente. Isso se deve em partes, pelo fato de ser assintomático em estágios iniciais ou pelos sintomas apresentados serem semelhantes a outras doenças, fazendo com que sejam associados a outras patologias que não o câncer. Dessa maneira, de modo geral, existe um tempo considerável entre os primeiros sintomas e o diagnóstico conclusivo.

Em relação ao câncer de bexiga, os principais sinais clínicos apresentados pelos pacientes são mudanças em hábitos urinários, como urinar com mais frequência, urgência ao urinar mesmo sem estar com a bexiga cheia, sensação de irritação e queimação ao expelir urina, (INCA, 2019). A hematuria, presença de sangue na urina, configura-se como um grande, e principal, sinal de alerta para o diagnóstico do câncer de bexiga (SANLI et al., 2017).

O diagnóstico do câncer de bexiga pode ser feito através de exames de urina e de imagem, como tomografia computadorizada e cistosopia, em que é inserido uma câmera pela uretra para possibilitar a visão interna do órgão. Durante esse procedimento é possível coletar células para realizar a biópsia (INCA, 2019). Através do diagnóstico e análise do material da biópsia é possível designar o tipo de neoplasia, além de grau e estadiamento.

3.2.3 Estadiamento das neoplasias

A avaliação do estadiamento e grau dos tumores segue padrão da União Internacional Contra o Câncer (UICC), aceito universalmente, e se denomina Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, o qual se baseia nas características do tumor primário (T), linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M). Porém, esta classificação somente é aplicável aos carcinomas (LESLIE; MARY; CHRISTIAN, 2009).

A subdivisão e nomeação dos subtipos de tumores leva em consideração o tipo celular primordial que sofre modificação de célula normal para maligna. Assim sendo, são três os tipos principais: carcinoma de células de transição (CCTs), maioria dos casos e surge nas células do tecido mais interno da bexiga; carcinoma de células escamosas, afetas as células de morfologia plana e delgada e que surgem após infecções ou irritações prolongadas; e adenocarcinomas, atingem células glandulares da bexiga e podem surgir após períodos longos de irritação ou inflamação (INCA, 2019).

Há ainda, uma subdivisão histológica dos CCTs, de acordo com o grau dos tumores e as camadas de tecidos atingidas por eles, podendo ser músculo-invasivo ou não-músculo invasivo (Figura 1).

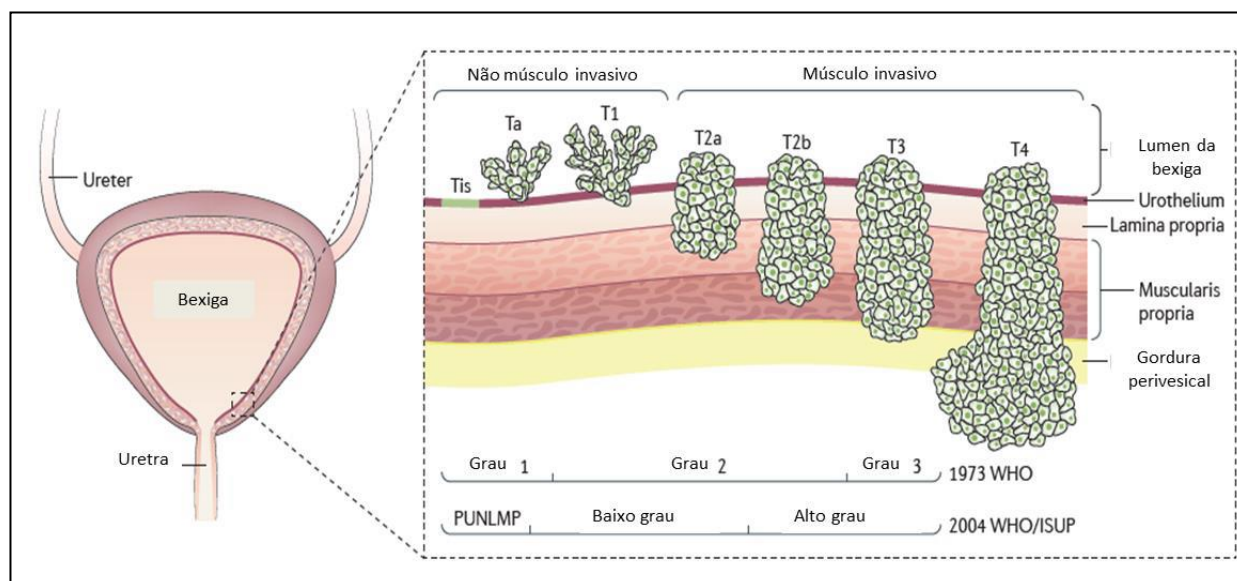


Figura 1- Tipos e estágios de neoplasias de bexiga. Adaptado de SANLI et al. 2017.

Os subtipos Tis, Ta e T1 representam tumores não-músculo invasivo, atingindo apenas o urotélio até a camada da lâmina própria. Cerca de 75% dos pacientes com câncer de bexiga são representados por estes tipos tumorais (KAMAT et al., 2016) de modo que demonstram baixo grau de malignidade, porém os que se encontram em estágio Ta apresentam altas taxas de recorrência, e os de estágio T1 possuem grande tendência de progredirem e atingirem camadas mais profundas (BABJUK et al., 2011; KAMAT et al., 2016).

Os subtipos T2a, T2b, T3 e T4 são menos recorrentes porém bem mais agressivos e mais resistentes aos tratamentos. Estes tipos tumorais começam na superfície do urotélio e progridem seu crescimento de forma a atingirem camadas profundas de tecido ao invés de crescerem no sentido do lúmen da bexiga. Possuem alto grau de malignidade e podem atravessar camada muscular até atingirem tecido de órgãos próximos, como próstata em homens e útero em mulheres, além da camada de tecido pélvico ou abdominal (SANLI et al., 2017). O diagnóstico e avaliação do estadiamento e grau de malignidade das neoplasias é extremamente relevante, pois é através dele que será indicado pelo profissional o tratamento adequado e prognóstico do paciente.

3.2.4 Abordagens terapêuticas

As principais abordagens para o tratamento de câncer de bexiga se resumem a ressecção transuretral (TUR), cistectomia parcial ou radical (dependendo do tamanho e localização da massa tumoral maligna) radioterapia, imunoterapia com (BCG), além de quimioterapia intravesical e sistêmica (BELLMUNT et al., 2014). A indicação do tratamento dependerá da avaliação histopatológica.

Em casos de tumores com menor grau de malignidade, é indicada a TUR para eliminação do agregado de células tumorais localizado. Visto que tendem a apresentar recidivas, há a possibilidade de novas ressecções e uso de terapia adjuvante, podendo ser por quimioterapia ou imunoterapia intravesical (HOUGHTON et al., 2013). Entre os principais quimioterápicos designados para este tratamento destaca-se a mitomicina, epirrubicina e gemcitabina, os quais tem seu mecanismo de ação baseado na interrupção de síntese de DNA (KAMAT et al., 2016). A imunoterapia é considerada o padrão ouro para tumores não-músculo invasivo após TUR e é administrada através de instilações na bexiga de uma preparação de BCG. O BCG é um agente imunoterapêutico que foi desenvolvido a partir de *Mycobacterium Bovis* e seu mecanismo de ação não é ainda completamente elucidado. No entanto, sabe-se que o BCG ativa o sistema imunológico aderido ao urotélio e às células tumorais através da ação da fibronectina, de forma a estimular as células do sistema imune presentes no microambiente tumoral a fazerem o reconhecimento antigênico das células malignas e combatê-las (DONIN et al., 2017).

Entre os principais problemas nas abordagens terapêuticas contra o câncer de bexiga, relata-se diversos efeitos adversos ocasionados pelos quimioterápicos devido o fato destes não atingirem de forma seletiva apenas as células neoplásicas, como náuseas, enjoos, perda de apetite e fraqueza (KAMAT et al., 2016). Além disso, são reportados que cerca de 30-45% pacientes tratados com BCG são não responsivos ao tratamento, apresentando efeitos colaterais locais e sistêmicos (BRAUSI et al., 2014)

Para casos em que os tumores são mais agressivos e possuem alto grau de malignidade é sugerida a cistectomia parcial da bexiga, que refere-se à retirada de parte do órgão onde encontram-se os tumores, ou cistectomia radical, a retirada total do órgão sucedida por reconstrução de outro órgão para armazenamento de urina. A

radioterapia pode ser empregada também em casos graves como forma inicial de tentar evitar a perda do órgão (KAMAT et al., 2016). Para estes casos também é indicada a quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante à base de platina como forma de potencializar o tratamento (SANLI et al. 2017).

Há ainda outro método de tratamento baseado na imunoterapia que se refere à utilização de anticorpos monoclonais. Utilizar esta modalidade de tratamento tem se destacado nos últimos anos, devido ao fato de ser uma abordagem que busca maior seletividade em seu mecanismo de ação, visando atingir apenas células malignas e diminuindo os efeitos adversos causados pelas demais alternativas terapêuticas (SHENG; HUANG, 2011). Entre os anticorpos monoclonais liberados pelo FDA (Food and Drug Administration), principal órgão de liberação de alimentos e medicamentos no mundo, estão nivolumabe e atezolizumabe para carcinomas de bexiga metastizados e irressecáveis (FDA 2019).

O que se observa, no entanto, que o tempo prolongado de tratamento e as altas taxas de recorrência geram um alto custo, além de que os efeitos colaterais desses fármacos também são notoriamente relatados em pacientes submetidos a esses tratamentos (SIEGEL et al., 2013). Com isso, aumenta-se a necessidade da busca por novas composições com potencial antitumoral, de forma a desenvolver novas alternativas mais eficientes terapêuticamente para o câncer de bexiga.

3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado como uma condição fisiológica de desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), combinada ao déficit de agentes de caráter antioxidante no organismo (GUPTA et al., 2014a). Esse desbalanço acaba por atingir de forma negativa diversas reações metabólicas.

As espécies reativas são classificadas em distintos grupos de acordo com o principal átomo da molécula, sendo todas elas derivadas a partir do metabolismo oxidativo. As EROs são as mais abundantes no organismo e incluem radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^-) e oxigênio singleto (O_2) (SIMIC; BERGTOLD; KARAM, 1989). A mais representativa ERN é o óxido nítrico (NO^-), o qual é capaz de interagir com algumas EROs e formar

moléculas reativas, como no caso da interação entre óxido nítrico e radical ânion superóxido, formando peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso agente oxidante, podendo ainda ser protonado e convertido em um radical ainda mais tóxico, o hidroxil (OH^\cdot) (SANT'ANA DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

As EROs e ERNs são produzidas durante processos metabólicos intracelulares, principalmente através da cadeia transportadora de elétrons que ocorre na mitocôndria. Essas moléculas surgem a partir do mecanismo oxidativo e em baixas concentrações participam de diversos eventos subcelulares, como transdução de sinais, ativação enzimática, expressão gênica, ligações dissulfeto durante formação de proteínas e participação no processo de apoptose (GUPTA et al., 2014). Menos de 5% dessas espécies podem vir a apresentar efeito tóxico nas células caso suas concentrações apresentem altos níveis, por condições internas e exposições ambientais, e as defesas antioxidantes estejam em baixa. Em caso de desequilíbrio entre esses fatores, há grande possibilidade de injúria celular (SOSA et al., 2013).

O efeito maléfico dessas espécies reativas surgem pela interação delas com estruturas e componentes celulares. A membrana celular é constituída por diversos lipídeos polinsaturados que são suscetíveis à ação das EROs e ERNs, ocorrendo a peroxidação lipídica de modo a facilitar a permeabilidade da membrana e danificando a estrutura celular (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). As proteínas são gravemente afetadas pela interação com as espécies reativas, gerando um acúmulo de grupamentos carbonil e tiol, alterando a estrutura e consequente funcionalidade proteica (LEVINE, 2002). A molécula de DNA é afetada pela oxidação causada pelas altas concentrações de EROs e ERNs, ocasionando cortes e produção de produtos metabólicos, como 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) que representa um biomarcador de referência para relação entre estresse oxidativo e carcinogênese (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI; FIOTAKIS, 2009), e que favorecem mutações (MATSUI et al., 2000), as quais estão fortemente relacionadas ao câncer (SOSA et al., 2013; GUPTA et al., 2014).

A relação entre câncer e estresse oxidativo já é bem estabelecida na literatura e tem sido foco de diversos estudos pra melhor entender os mecanismos envolvidos nesse processo. Sabe-se que os mecanismos e vias do estresse oxidativo são conservados em células mamíferas e que as EROs são capazes de promover

alguns aspectos de desenvolvimento e proliferação tumoral, envolvendo processos biológicos como proliferação celular acelerada, evasão da apoptose, invasão de tecidos/metástase e angiogênese (processo de formação de vasos sanguíneos) (SOSA et al., 2013). A interferência e indução desses mecanismos ocorre pela chamada regulação redox em vias de sinalização celular, como no caso de MAPK (proteína-quinase ativada por mitógenos) e P13K (fosfoinosítideo 3-quinase) (GUPTA et al., 2014).

Sabe-se que as EROs acabam por interferir em fatores de transcrição de enzimas antioxidantes, fazendo com que haja uma diminuição das expressões desses genes e, conseqüente, prejuízo nas defesas antioxidantes endógenas (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). Por outro lado, as mesmas EROs inativam fatores da sinalização celular responsáveis por mediar a proliferação e diferenciação, bloqueando a ligação de “parada de ativação”, gerando um descontrole no crescimento das células (SUN et al., 2015). Tendo em vista uma perturbação na sinalização de proliferação celular e um decréscimo na produção de enzimas antioxidantes, instaura-se um ambiente propício ao surgimento do câncer.

O NO[•], assim como o oxigênio, constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, envolvido no relaxamento vascular e proteção de vasos sanguíneos, além de ser um mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. É produzido a partir da L-arginina por uma família de enzimas com três isoformas distintas: óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) (presente em células endoteliais vasculares) e óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) (presente nos neurônios) expressas de forma constitutiva e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), expressa pela indução de citocinas e/ou endotoxinas em diversos tipos celulares (MARLETTA, 1994).

No entanto, apesar de estar envolvido em processos normais e imprescindíveis ao funcionamento celular, o óxido nítrico pode apresentar certa dualidade em relação ao câncer, principalmente aquele produzido pela iNOS. O dualismo desse radical se deve ao fato, principalmente, de interagir com algumas EROs e gerar efeitos tóxicos. Há relatos na literatura de estudos *in vitro* os quais demonstraram que o aumento da expressão dessa enzima apresentou efeito citotóxico, elevação da agressividade e vascularização tumoral (CULLIS et al.,

2006), bem como, estes mesmos níveis elevados da enzima e produção de óxido nítrico puderam modular o processo de apoptose (XIE et al., 1992).

3.3.1 Agentes Antioxidantes

Para que a célula esteja em estado de estresse oxidativo e sofra injúrias com os efeitos deletérios, é necessário a presença das espécies reativas em concentrações fora do padrão considerado normal e as defesas antioxidantes do organismos estejam em baixa, de forma a não conseguir inativar a ação dessas EROs e ERNs. Essas defesas são divididas em agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (KOVÁ et al., 2010).

Os agentes antioxidantes enzimáticos, também chamados de endógenos, referem-se a proteínas enzimáticas que tem a capacidade de neutralizar a interação de espécies reativas. As principais enzimas relacionadas as EROs são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (GUPTA et al., 2014). Durante o processo da cadeia transportadora de elétrons, a primeira ER formada é o radical ânion superóxido (O_2^-). A SOD é responsável por dismutar esse radical formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 não é um radical livre, mas sim uma espécie reativa capaz de formar o radical hidroxil (OH^-), o mais danoso às biomoléculas. A enzima CAT fará a decomposição do peróxido em água e oxigênio, ou ainda pela ação da glutathiona peroxidase (GPx). A conversão da glutathiona oxidada (GSSG) novamente à glutathiona reduzida (GSH) ocorre pela ação da glutathiona redutase (GR) (GORRINI et al., 2013) (Figura 2).

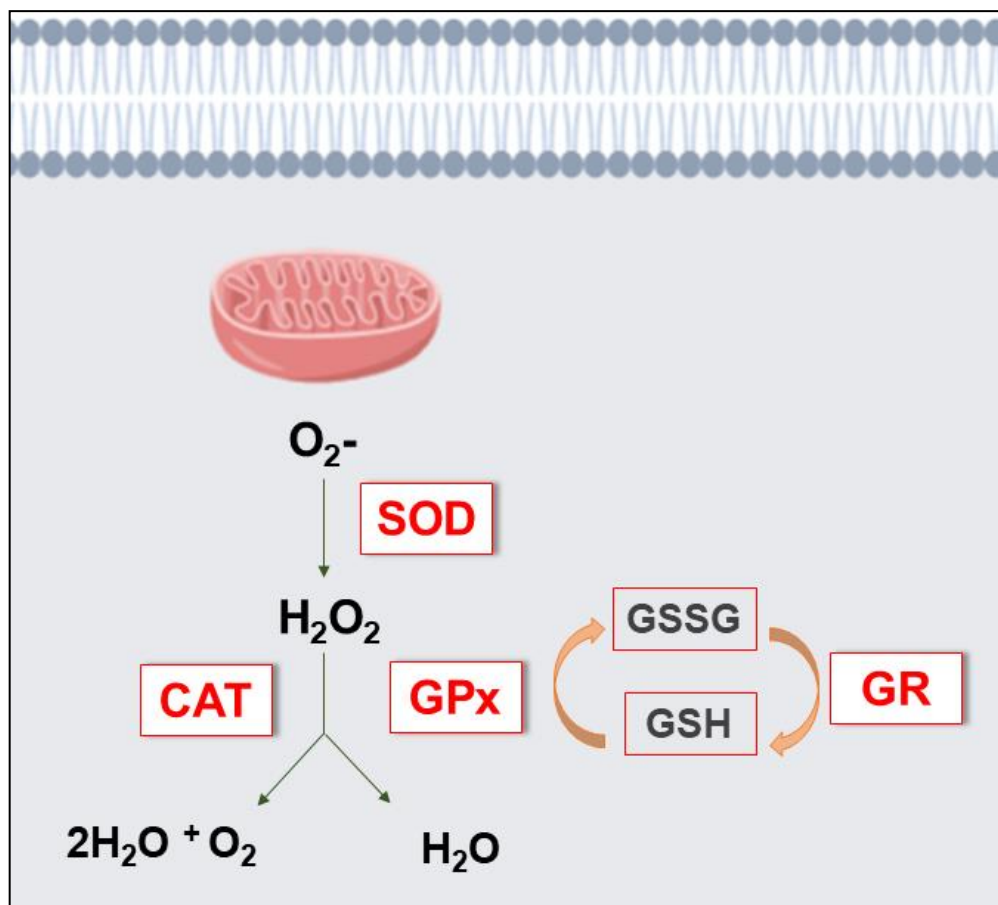


Figura 2 – Representação esquemática do funcionamento das enzimas antioxidantes endógenas. O radical ânion superóxido (O_2^-) é formado a partir da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, sendo desmutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) e convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse peróxido será posteriormente decomposto pela enzima catalase (CAT) ou glutatona peroxidase (GPx), as custas da glutatona, que será convertida pela enzima glutatona redutase (GR). Fonte: Própria

Os agentes não enzimáticos podem ainda ser divididos em antioxidantes metabólicos ou nutricionais. Os metabólicos atuam juntamente dos agentes endógenos e são produzidos a partir de reações do metabolismo próprio, tendo como exemplos glutatona, L-arginina, melatonina e ácido lipoico. Já os antioxidantes nutricionais, também chamados exógenos, são adquiridos através da dieta e ingestão de alimentos, não podendo ser produzidos pelo organismo próprio, como exemplo destacam-se resveratrol, vitaminas C e E, carotenoides, ômega-3, zinco e selênio (WILLCOX; ASH; CATIGNANI et al., 2004; GUPTA et al., 2014).

3.4 Compostos organocalcogênicos

Os compostos organocalcogênicos são interessantes compostos resultantes de síntese orgânica, os quais contém em sua estrutura elementos chamados calcogênicos, aqueles pertencentes ao grupo 16 da tabela periódica e tem como representantes os átomos de oxigênio (O), telúrio (Te), selênio (Se), enxofre (S) e polônio (Po) (MUGESH; PANDA; SINGH, 2000).

Estes compostos têm sido foco de diversos estudos, devido ao fato de demonstrarem diversas atividades e propriedades biológicas que se tornam relevantes à pesquisa farmacológica. Entre elas destacam-se atividade tipo antidepressiva (BRÜNING et al., 2011), antitumoral (DA ROSA et al., 2017), antiviral (SANCINETO et al., 2015) e antioxidante (BANDEIRA et al., 2019).

3.4.1 Compostos organocalcogênicos de telúrio

O telúrio é um elemento de caráter não metálico, de massa atômica 127,60u e pode apresentar-se em diferentes estados de oxidação, como telurato, telureto, telurito e telúrio elementar (MUGESH; PANDA; SINGH, 2000). Foi descoberto em 1782, sendo relatada certa dificuldade de manuseio e mau odor desse elemento em tentativas de manipulação, sendo observado um grande intervalo de tempo na literatura de publicações sobre sua síntese e utilização (TAYLOR et al., 1996).

É um elemento que foi relacionado, inicialmente, com alta toxicidade. Porém, cada vez mais observa-se que sua ação tem sido foco de estudos que buscam elucidar sua interação em processos bioquímicos e fisiológicos (TAYLOR et al., 1996).

Os compostos organocalcogênicos de telúrio tem demonstrado em diversos estudos propriedades biológicas interessantes, como capacidade de imunomodulação (SREDNI et al., 2012), atividade antitumoral e indução de apoptose (ABONDANZA et al., 2008) e antioxidante (AVILA et al., 2012). Estes compostos e característica antioxidante estão estreitamente relacionados, tendo em vista que já se tem relatada a proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

conferidas pelos organotelúrios e sua capacidade de mimetizar a enzima GPx (BRIVIBA et al., 1998;(NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004)

Neste mesmo contexto, compostos orgânicos contendo grupamento azida em sua estrutura chamam atenção por se mostrarem versáteis e estáveis para combinação e introdução de estruturas heterocíclicas (GRIFFIN, 1994); (BRÄSE et al., 2005) e a combinação deste grupamento com calcogênios tem demonstrado na literatura atividades biológicas de grande relevância (SOUZA et al., 2015; ROSA et al., 2017; TABARELLI et al., 2017). Por esta razão, torna-se interessante investigar o efeito dos compostos organocalcogênios contendo telúrio derivados de azida em células de carcinoma de bexiga.

4. Materiais e Métodos

4.1 Síntese dos compostos

As moléculas utilizadas neste estudo foram sintetizadas pelo laboratório LabSelen-NanoBio, pertencente à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A metodologia empregada na síntese foi feita conforme relata por TABARELLI et al., (2017). Neste trabalho prévio, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação de atividade citotóxica e antioxidante em células de carcinoma de pulmão (linhagem A549), além de avaliação *in vivo* referente à toxicidade no fígado e rins de camundongos *swiss*. Conforme os resultados obtidos neste estudo prévio, foram selecionados dois compostos (Figura 3), os quais apresentaram resultados promissores. Neste sentido, ambos compostos escolhidos apresentam em sua estrutura química o elemento calcogênio telúrio.

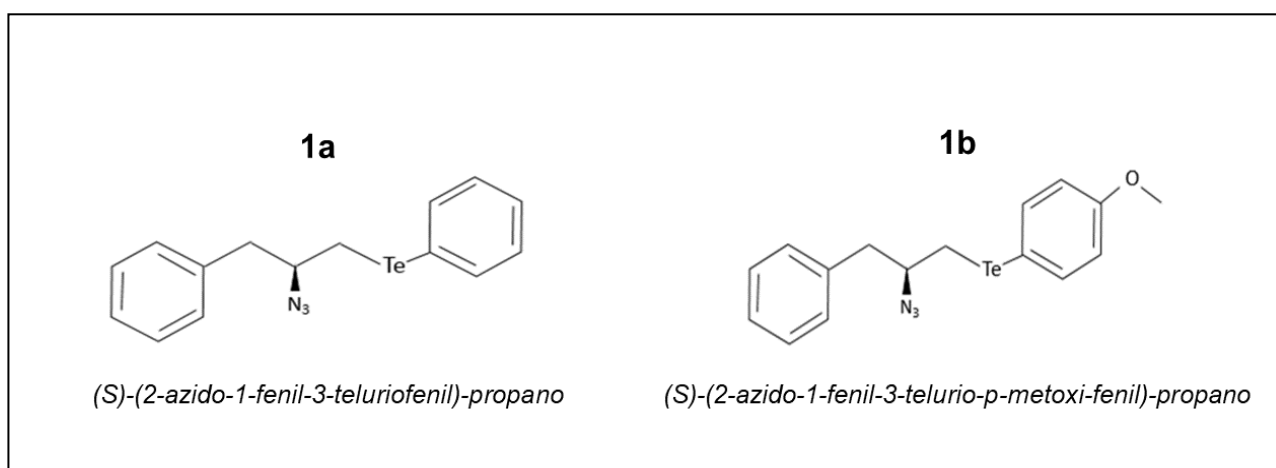


Figura 3 – Estrutura química dos compostos de azida de β-arylcalcogênio. Fonte: Própria

Para realização dos experimentos, os compostos foram pesados e diluídos em 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido) para que ficassem em suas devidas concentrações. A utilização desse volume de DMSO como diluente se baseia no fato de que nestas condições a concentração dele não será tóxica às células.

4.2 Cultivo Celular

A linhagem celular utilizada foi de carcinoma de bexiga humano grau II, nomeada como 5637 (Figura 4), adquirida através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (MOORE et al. at Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em condições de cultivo controladas em estufa a 37°C em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados em triplicata com as células em fase logarítmica de crescimento, quando atingida a confluência.

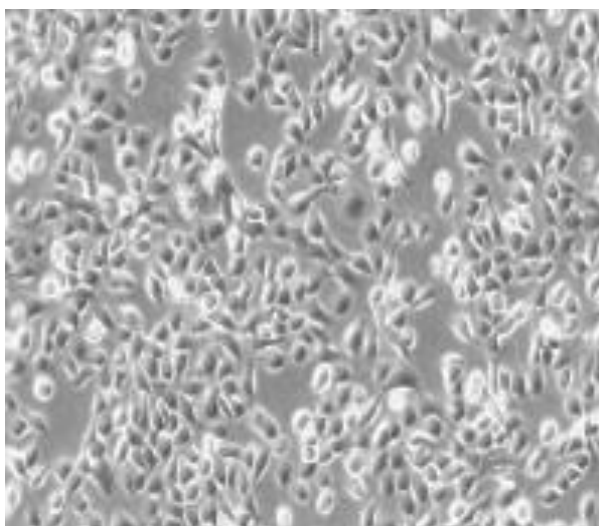


Figura 4 – Visualização microscópica da linhagem celular 5637 em monocamada. Fonte: Própria. Aumento: 40x

4.3 Extração de RNA

Para realização da extração de RNA, as células foram dispostas em placas de 12 poços a uma densidade de 2×10^5 células por poço e mantidas em estufa por 24h para que crescessem em monocamada. Posteriormente, foram tratadas com os compostos **1a** e **1b**, nas concentrações de 1,6 μ M e 0,5 μ M (valores de IC₅₀, os quais se referem a menor concentração do composto capaz de inibir 50% da proliferação celular), respectivamente, e mantidas novamente em estufa por 48h, tempo determinado para tratamento da linhagem celular.

Após o tempo de incubação, o meio dos poços foi retirado e foi feita a lavagem dos mesmos com PBS (tampão fosfato-salino). Assim, foram adicionados 250 μ L de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™, Carlsbad, USA) em cada um dos poços, incubado durante cinco minutos à temperatura ambiente e o volume de cada poço foi transferido para tubo *ependorf* e seguiu-se protocolo disponibilizado pelo fabricante.

O protocolo se baseia em uma sequência de centrifugações e adição de reagentes para que seja feita a separação em fases distintas da parte lipídica, proteica e dos ácidos nucleicos da célula, até obter ao final apenas o RNA. Para isso são utilizados clorofórmio, isopropanol, álcool 70% e, por fim, eluição do *pellet* formado ao final do processo com água ultrapura livre de nucleases. Após a extração, foram mensurados os valores de concentração e pureza das amostras através de espectrometria de luz ultravioleta, utilizando equipamento NanoVue.

4.4 Confeção de cDNA

A síntese de cDNA foi feita após a quantificação das amostras. Foram utilizadas as que estavam dentro dos valores considerados padrão de pureza (entre 1,8 e 2,0 entre os comprimentos de onda 260/280) e foram avaliados os valores de concentração para o cálculo de diluição das amostras com água. A confeção foi realizada utilizando kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA).

4.5 Análise da Expressão gênica

Para a amplificação e avaliação da expressão gênica foi utilizada a técnica de Real Time Quantitativo PCR (qRT-PCR), utilizando equipamento Stratagene® x3005PTM Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) utilizando-se SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, UK). As reações de PCR foram efetuadas 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Foram utilizados e primers específicos

para genes humanos SOD, CAT, GPx, GR e iNOS e para o gene normalizador GAPDH, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR

GENE	SEQUÊNCIA
GAPDH	F - 5' GGAGCGAGATCCCTCCAA 3' R - 5' GGCTGTTGTCATACTTCT 3'
SOD	F - 5' GGAAGCCATCAAACGTGACT 3' R - 5'CTGATTTGGACAAGCAGCAA 3'
CAT	F - 5' TTTCCCAGGAAGATCCTGAC 3' R -5' ACCTTGGTGAGATCGAATGG 3'
GPx	F - 5' TCCCGTGCAACCAGTTTG 3' R - 5'TTCACCTCGCACTTCTCGAA 3'
GR	F – 5' CCCGATGTATCACGCAGTTA 3' R –5' TTCACTGCAACAGCAAAACC 3'
iNOS	F- 5' ACAAGCCTACCCCTCCAGAT 3' R - 5' TCCCGTCAGTTGGTAGGT 3'

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando software GraphPad Prism 7.0 através de análise de uma via seguido pelo teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando o $P < 0.05$.

5. Resultados

A Figura 5 demonstra o efeito das moléculas sobre a expressão dos genes SOD e CAT nas células 5637, o que permite observar que houve aumento da expressão desses genes e diferença estatística ($P < 0,01$) em células tratadas com ambos os compostos **1a** e **1b**, quando comparadas com células do grupo controle (Figura 5).

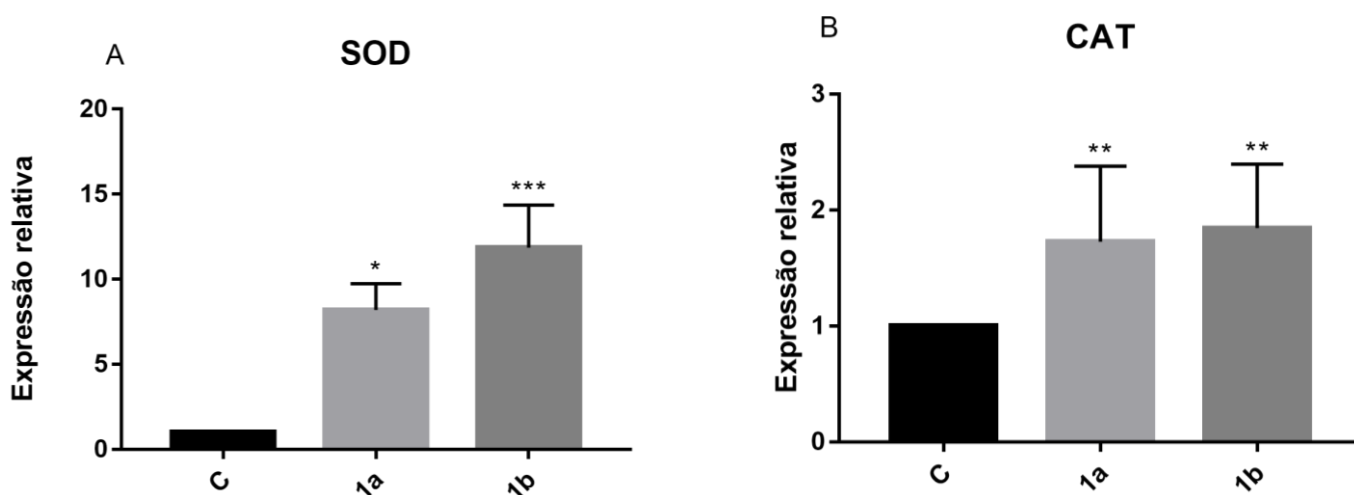


Figura 5 – Níveis de expressão gênica das enzimas endógenas (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) avaliadas em células de carcinoma de bexiga após 48h de exposição aos compostos 1a e 1b. Valores de $P < 0,05$ considerados significativos e asteriscos demonstram onde houve diferença estatística.

Em relação à análise da expressão gênica da enzima GPx e GR percebe-se que há um aumento na expressão de ambos os genes quando tratados com o composto **1b** comparados com o controle. Por outro lado, o tratamento com a molécula **1a** não causou diferença estatística significativa do grupo controle (Figura 6).

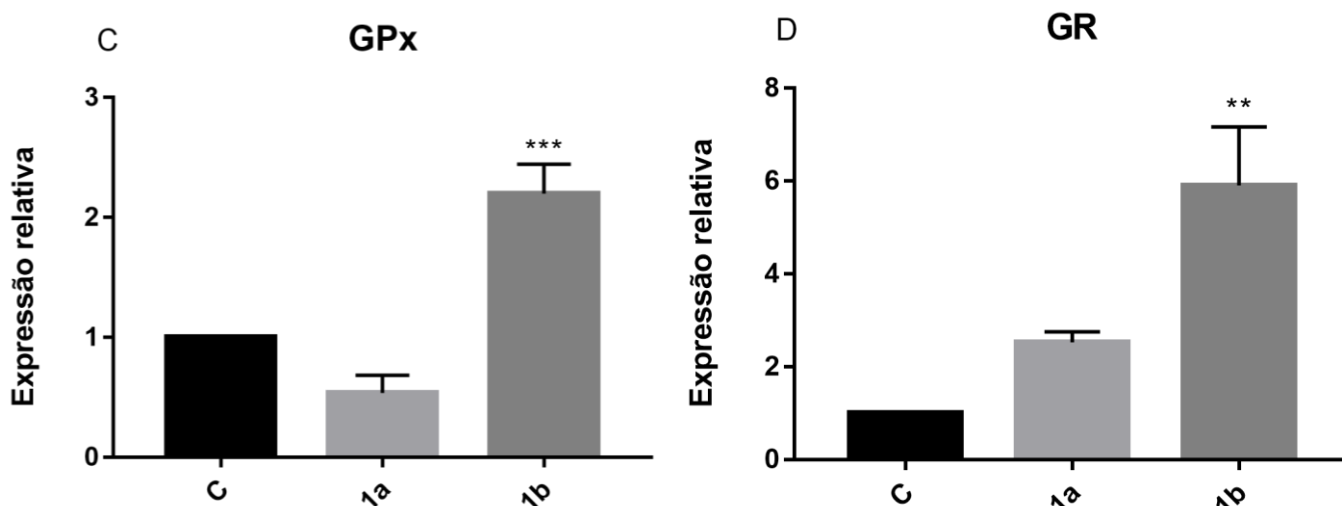


Figura 6 – Níveis de expressão gênica das enzimas endógenas (C) glutathiona peroxidase (GPx) e (D) glutathiona redutase (GR) avaliadas em células de carcinoma de bexiga após 48h de exposição aos compostos 1a e 1b. Valores de $P < 0,05$ considerados significativos e asteriscos demonstram onde houve diferença estatística.

A enzima iNOS, relacionada à produção do óxido nítrico, apresentou uma super expressão na linhagem 5637 tratada com a molécula **1b** ($P < 0,001$), enquanto a molécula **1a** não se mostrou estatisticamente diferente do controle (Figura 7).

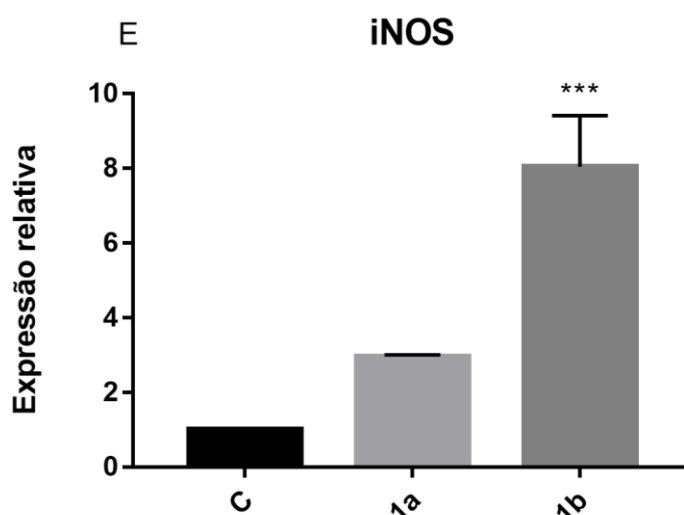


Figura 7 - Expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) avaliada em células de carcinoma de bexiga após 48h de exposição aos compostos 1a e 1b. Valores de $P < 0,05$ considerados significativos e asteriscos demonstram onde houve diferença estatística

6. Discussão

Neste presente estudo, foram avaliados os níveis de expressão dos genes de enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, além da enzima iNOS. Através dos dados obtidos neste estudo, pode-se verificar que o composto 1b obteve um melhor resultado, visto que aumentou a expressão de todos os genes testados quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, o composto 1a apenas teve efeito em aumentar a expressão dos genes de SOD e CAT. Estes dados apontam que, mesmo referindo-se a células neoplásicas que tenham elevados níveis de espécies reativas, aquelas que foram tratadas com os compostos **1a** e **1b** tiveram uma expressão induzida dos genes de enzimas antioxidantes, quando comparadas com células do grupo controle. A expressão desses genes se torna interessante pelo fato de sugerirem a síntese das enzimas antioxidantes, as quais teriam a capacidade de neutralizar e controlar os níveis de EROs presente no ambiente celular, de forma a tentar garantir homeostase antioxidante.

Os efeitos das EROs e ERNs nos organismos e a relação com diversas doenças são alvo de diversos estudos e grupos de pesquisa. Sabe-se que elas desempenham papéis fundamentais a nível subcelular, participando ativamente de processos de transdução de sinais, ativação enzimática, expressão gênica, ligações dissulfeto durante formação de proteínas (GUPTA et al., 2014a). Além disso, as EROs e ERNs são produzidas naturalmente através de processos metabólicos em organismos aeróbios. Bem como, tem-se elucidado que essas espécies reativas se tornam perigosas quando há um desbalanço entre elas e agentes antioxidantes responsáveis por neutralizá-las (SOSA et al., 2013).

Os efeitos danosos resultantes de um desequilíbrio entre essas espécies e as defesas antioxidantes, nomeado estresse oxidativo, são complexos e correlacionados a diversos distúrbios celulares. Com relação ao câncer, especificamente, é relatada a interferência das espécies reativas nos principais processos de tumorigênese, sendo eles a proliferação celular desregulada, sobrevivência celular aumentada, danos na membrana, proteínas e mutações no DNA, gerando grande instabilidade celular (MOLONEY; COTTER, 2018). Em grande parte, isso se deve ao fato de atingirem vias de sinalização celular pró-tumorigênicas e fatores de transcrição de agentes antioxidantes endógenos, desregulando e diminuindo a capacidade de produção destes.

No caso de células tumorais, os níveis de espécies reativas encontram-se aumentados quando comparados com células normais, havendo maior dificuldade de controle delas pela atividade das enzimas antioxidantes. Sendo assim, a capacidade de modular esse processo se torna uma interessante abordagem anti-câncer (GORRINI; HARRIS; MAK et al., 2013). O interesse em potencializar as defesas antioxidantes endógenas como forma preventiva de evitar diversas doenças já é amplamente difundida. No entanto, tendo em vista os dados alarmantes de casos e mortes decorrentes de câncer no mundo e dificuldades envolvendo o tratamento, a utilização da suplementação antioxidante durante quimioterapia tem potencial para reduzir toxicidade dos fármacos já utilizados na clínica (BLOCK et al., 2008).

A enzima SOD é a primeira linha dos antioxidantes a surgirem no combate às EROs. É responsável por dismutar o radical ânion superóxido (O_2^-), formado durante os processos oxidativos, convertendo-o em H_2O_2 . Caso não haja a ação dessa enzima, esse radical permanece em sua forma original e tem grande potencial oxidativo. Estudos relacionaram a presença e ação do O_2^- no câncer e demonstraram seu potencial altamente capaz de interferir nos processos de diferenciação e proliferação celular, além de atribuírem a baixa atividade da enzima SOD ao processo de malignidade celular (OBERLAY et al., 1993). Church et al, 1993, evidenciou que o aumento da expressão da enzima SOD foi capaz de suprimir a malignidade tumoral em células de melanoma, corroborando com os achados preliminares e afirmando a importância desta enzima no processo antioxidante e sua relação com o câncer (CHURCH et al., 1993); SOSA et al., 2013). Neste presente estudo, os resultados encontrados são pertinentes ao estudo de Church et al., 1993, no qual também houve um aumento da expressão da enzima SOD, e com isso acredita-se que este achado leve a uma redução da malignidade tumoral em células de bexiga.

O H_2O_2 é uma ERO potencialmente danosa e que tem relação direta com crescimento e a proliferação celular. Em estudo realizado para elucidação desse processo, foi feito o cultivo *in vitro* de células epiteliais do urotélio por sete dias e exposição ao peróxido de hidrogênio, sendo observada formação de colônias de células transformadas. Passado este tempo, estas células foram injetadas em camundongos, os quais desenvolveram carcinomas de células de transição

altamente malignas, demonstrando potencial carcinogênico desta espécie reativa em células de bexiga (OKAMOTO et al., 1996).

No trabalho de Chiou et al., 2003, foram realizadas análises de urina de pacientes que tinham ou tivessem tido câncer de bexiga e pessoas saudáveis. Como resultado, foram observados níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) duas vezes mais altos em pacientes atingidos pelas neoplasias do que em saudáveis (CHIOU et al., 2003). Este biomarcador de estresse oxidativo e mutações no DNA é gerado a partir do H_2O_2 quando este não é catalisado, reagindo com íons de Ferro (reação de Fenton), originando radical hidroxil e seus subprodutos, sendo o 8-OHdG um destes.

Ambos estudos anteriores demonstram o potencial genotóxico e indutor proliferativo celular do H_2O_2 e sua relação com tumores de bexiga. A enzima catalase, responsável por fazer a dissociação dele, se mostra um importante alvo capaz de regular essa espécie reativa, bem como a enzima GPx, também responsável pela conversão do H_2O_2 . Desta maneira, a modulação da resposta antioxidante nos tratamentos contra o câncer surge como uma estratégia interessante (GLORIEUX et al., 2015). Neste presente trabalho, observou-se aumento da expressão das enzimas CAT e GPx, bem como da GR, corroborando com estudos prévios. Os níveis de catalase se mostraram elevados significativamente induzidos por ambos compostos **1a** e **1b**, enquanto glutathione peroxidase e reduzida, apenas pelo composto **1b**.

Os compostos organocalcogênicos de telúrio tem demonstrada na literatura a sua atividade antioxidante efetiva em estudos recentes, como em linhagem celular de pulmão A549 (TABARELLI et al., 2017) e de bexiga 5637 (DA ROSA et al., 2017), a mesma utilizada neste presente trabalho. Em ambos estudos foi avaliada uma classe de compostos organocalcogênicos, contendo selênio, telúrio ou enxofre como substituintes, sendo que os que apresentarem melhores resultados foram os que continham telúrio.

A eficiência do Te como agente antioxidante pode ser explicada pelo fato de que os compostos orgânicos de Te são facilmente oxidados do estado divalente para o estado tetravalente. Esta propriedade torna-os atrativos como “sequestrante” de agentes oxidantes reativos, como peróxido e radicais peroxil (ENGMAN et al., 1995) (AVILA et al., 2010), além de inibidores da peroxidação lipídica em sistemas

químicos e biológicos (JACOB et al., 2000). Ademais, alguns compostos de Te são capazes de mimetizar a GPx, às custas de GSH, neutralizando o peróxido de hidrogênio (ANDERSSON et al., 1994; AVILA et al., 2012). Há, ainda, a atribuição de que estes compostos organotelúrios são capazes de alterar o estado redox altamente estressado de células cancerosas, levando-as ao “limiar redox” pelo fato de oferecerem mais condições de oxidação e, por fim, induzindo sua morte pela ativação de vias apoptóticas (COMPARSI et al., 2014).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da L-arginina e considerado um importante mediador de processos intra e extracelulares, envolvido no relaxamento e proteção dos vasos sanguíneos, modulador de eventos celulares e mediador citotóxico de células imunes ativadas e células tumorais (SANT’ANA DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). O NO é conhecido pela sua dualidade no organismo, sendo benéfico por desempenhar importantes eventos celulares, porém, pode vir a ser maléfico, quando este reage com radical superóxido ocasionado a formação do peroxinitrito (ONOO^-). A enzima iNOS é a responsável por produzir NO em maior quantidade e por longos períodos, além de ser a mais presente no microambiente tumoral (SHEETAL KORDE CHOUDHARI et al., 2013).

Relatos na literatura demonstram que a dualidade do óxido nítrico é dependente dos níveis de concentração e tempo de exposição, podendo modular processos de angiogênese, metástase, ciclo celular e apoptose. O NO em baixas concentrações é passível de gerar instabilidades genômicas, devido formação de ONOO^- e interações com DNA, além de inibir apoptose (GRIMM et al., 2013; WINK et al., 2011). Entretanto, em concentrações mais altas, devido sua funcionalidade de mediador citotóxico, se torna um interessante potencial alvo de indução de apoptose capaz de induz a morte de células malignas, modulando ativação de caspases e p53 (SCHONHOFF; GASTON; MANNICK, 2003). Diante disso, a indução da produção de óxido nítrico e a intenção de aumentar os níveis deste no ambiente tumoral sugerem interessantes abordagens terapêuticas contra o câncer (HOLOTIUK et al., 2019), principalmente através da indução da expressão da enzima iNOS (SINGH; GUPTA et al 2011), objetivando aumentar a capacidade citotóxica de células imunes contra as células neoplásicas.

Os resultados deste presente trabalho demonstraram um aumento da expressão de iNOS em células tratadas com composto organocalcogênio de telúrio

1b, sugerindo ser um potencial indutor da superexpressão dessa enzima e, conseqüente, produção de NO. Dentro desse contexto, compostos organocalcogênios contendo telúrio em sua estrutura demonstraram conferir proteção ao peroxinitrito em fibroblastos, um poderoso agente oxidante (BRIVIBA et al., 1998), protegendo as células de reações de nitração. A enzima GPx também demonstrou ser uma chave de proteção aos efeitos deletérios gerados por essas reações e espécies reativas no organismo (SIES et al., 1997), sendo esta também avaliada com níveis de expressão aumentados em células tratadas com composto **1b** neste trabalho.

Portanto, os compostos de azida de β -arilcalcogênio contendo telúrio demonstraram capacidade de ativar expressão de genes de enzimas antioxidantes e vias oxidativas em linhagem celular de carcinoma de bexiga. Observou-se que o composto **1b** foi capaz de aumentar os níveis de expressão de todos os genes avaliados, enquanto o composto **1a** apenas os genes de SOD e CAT. Essa melhor atividade do composto pode ser explicada devido a presença do grupamento metoxi na estrutura do composto **1b**, de modo que a adição desse substituinte mostrou melhor atividade anticâncer em estudos prévios (ZHAO et al., 2017). Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar seu mecanismo de ação.

7. Conclusão

A partir do que foi exposto ao longo do presente estudo e dos resultados obtidos, conclui-se que os compostos de azida de β -arilcalcogênio **1a** e **1b** demonstraram capacidade de modular expressão de genes de vias oxidativas em linhagem celular de carcinoma de bexiga humano em baixas concentrações e em intervalo de 48h. Assim sendo, pode-se observar que o composto **1b** apresentou maior indução da expressão dos genes abordados neste estudo nas células de carcinoma de bexiga, quando comparado com o composto **1a**, demonstrando potencial habilidade em potencializar a expressão dessas enzimas, sugerindo uma maior eficiência de homeostase entre agentes oxidantes e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Porém, mais testes e estudos são necessários para melhor elucidar a relação entre câncer e estresse oxidativo, a fim do desenvolvimento de compostos que sejam promissores agentes farmacoterapêuticos para o tratamento do câncer de bexiga.

8. Perspectivas

Considerando os resultados promissores obtidos neste trabalho, objetiva-se realização de mais ensaios a fim de:

- Mensurar EROs e ERNs, além de seus subprodutos;
- Avaliar apoptose por citometria de fluxo, adicionalmente avaliação das possíveis vias apoptóticas ativadas utilizando qRT-PCR;
- Realização da avaliação de citotoxicidade e demais análises em linhagem celular não tumoral, como método de comparação entre resultados.

Referências

- ABONDANZA, T. S. et al. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 2540–2545, 2008.
- ANDERSSON, Carl-Magnus et al. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. **Free radical research**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 401–410, 1994.
- ASHISH M KAMAT, NOAH M HAHN, JASON A EFSTATHIOU, SETH P LERNER, PER-UNO MALMSTRÖM, WOONYOUNG CHOI, CHARLES C GUO, Yair Lotan; KASSOUF, Wassim. Bladder cancer. [s. l.], 2016.
- AVILA, Daiana S. et al. A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. 194–201, 2010.
- AVILA, Daiana Silva et al. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 1903–1910, 2012.
- BANDEIRA, Pamela T. et al. Synthesis, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of N-Functionalized Organotellurides. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 410–415, 2019.
- BELLMUNT, J. et al. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology**, [s. l.], v. 25, n. suppl_3, p. iii40–iii48, 2014.
- BLOCK, Keith I. et al. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. **International journal of cancer**, [s. l.], v. 123, n. 6, p. 1227–1239, 2008.
- BRÄSE, Stefan et al. Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 44, n. 33, p. 5188–5240, 2005.
- BRAUSI, Maurizio et al. Side effects of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) in the treatment of intermediate-and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of the EORTC genito-urinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and. **European urology**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 69–76, 2014.
- BRIVIBA, Karlis et al. Protection by organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 817–823, 1998.
- BRÜNING, César Augusto et al. Antidepressant-like effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in the mouse forced swimming test involves opioid and serotonergic systems. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 658, n. 2–3, p. 145–149, 2011.
- BURGER, Maximilian et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. **European urology**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 234–241, 2013.

CHIOU, Chiu-Chian et al. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. **Clinica chimica acta**, [s. l.], v. 334, n. 1–2, p. 87–94, 2003.

CHURCH, Susan L. et al. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 90, n. 7, p. 3113–3117, 1993.

COMPARI, Bruna et al. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS ATRIBUIDAS AO DITELURETO DE DIFENILA. **REVISTA SAÚDE INTEGRADA**, [s. l.], v. 7, n. 13–14, p. 31–56, 2014.

CULLIS, Elizabeth R. et al. Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. **Microvascular research**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 76–84, 2006.

DA ROSA, Raquel Mello et al. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. **MedChemComm**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 408–414, 2017.

DE SOUZA, Diego et al. New organochalcogen multitarget drug: Synthesis and antioxidant and antitumoral activities of chalcogenozidovudine derivatives. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 8, p. 3329–3339, 2015.

DONIN, Nicholas M. et al. Immunotherapy for the treatment of urothelial carcinoma. **The Journal of urology**, [s. l.], v. 197, n. 1, p. 14–22, 2017.

ENGMAN, Lars et al. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 441–452, 1995.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

GLORIEUX, Christophe et al. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 87, p. 84–97, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017>>

GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 931–947, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd4002>>

GRIFFIN, Roger J. 3 The Medicinal Chemistry of the Azido Group. In: **Progress in medicinal chemistry**. [s.l.] : Elsevier, 1994. v. 31p. 121–232.

GUPTA, Rakesh Kumar et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 4405–4409, 2014. a.

GUPTA, Rakesh Kumar et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 4405–4409, 2014. b.

HALLIWELL, Barry; CHIRICO, Susanna. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 5, p. 715S-725S, 1993.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>

HOLOTIUK*, V. .. et al. Role of nitric oxide in pathogenesis of tumor growth and its possible application in cancer treatment. **Experimental Oncology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 210–215, 2019.

HOUGHTON, Baerin B. et al. Intravesical chemotherapy plus bacille C almette-G uérin in non-muscle invasive bladder cancer: a systematic review with meta-analysis. **BJU international**, [s. l.], v. 111, n. 6, p. 977–983, 2013.

JACOB, Claus et al. Water-soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein. **Chemical research in toxicology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3–9, 2000.

JACQUELINE, Camille et al. The macroecology of cancer incidences in humans is associated with large-scale assemblages of endemic infections. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 61, p. 189–196, 2018.

JANKOVIĆ, Slavenka; RADOSAVLJEVIĆ, Vladan. Risk factors for bladder cancer. **Tumori Journal**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 4–12, 2007.

JOHN, Bincy Anu; SAID, Neveen. Insights from animal models of bladder cancer: recent advances, challenges, and opportunities. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 34, p. 57766, 2017.

LESLIE, H. Sobin; MARY, K. G.; CHRISTIAN, W. TNM classification of malignant tumours. **Aufl. UICC International Union Against Cancer**, [s. l.], 2009.

LEVINE, Rodney L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 790–796, 2002.

MARLETTA, Michael A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. [s. l.], 1994.

MATSUI, Akira et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. **Cancer letters**, [s. l.], v. 151, n. 1, p. 87–95, 2000.

MOLONEY, Jennifer N.; COTTER, Thomas G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 80, p. 50–64, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2017.05.023>>

MUGESH, G.; PANDA, Arunashree; SINGH, Harkesh B. **Aspects of organochalcogen (S, Se, Te) compounds stabilized by intramolecular coordination** *Proceedings of the Indian Academy of Sciences: Chemical Sciences*, 2000.

NOGUEIRA, Cristina W.; ZENI, Gilson; ROCHA, Joao B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 104, n. 12, p. 6255–6286, 2004.

OKAMOTO, Masato et al. Transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by hydrogen peroxide. **Cancer research**, [s. l.], v. 56, n. 20, p. 4649–4653, 1996.

PRASAD, Sahdeo; GUPTA, Subash C.; TYAGI, Amit K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 387, p. 95–105, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>>

RIES, LAGI et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2007.**

ROSSATO, J. I. et al. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 297–303, 2002.

SANCINETO, Luca et al. Design and synthesis of diselenobisbenzamides (DSeBAs) as nucleocapsid protein 7 (NCp7) inhibitors with anti-HIV activity. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 24, p. 9601–9614, 2015.

SANLI, Oner et al. Bladder Cancer supplemental material. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 3, p. 1–19, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.22>>

SANT'ANA DUSSE, Luci Maria; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n4/18548.pdf>>

SCHONHOFF, Christopher M.; GASTON, Benjamin; MANNICK, Joan B. Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 20, p. 18265–18270, 2003.

SHEETAL KORDE CHOUDHARI et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 11, n. 118, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1477-7819-11-118.pdf>>

SHENG, Wei-Yun; HUANG, Leaf. Cancer immunotherapy and nanomedicine. **Pharmaceutical research**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 200–214, 2011.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2019 (US statistics). **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21551>>

SIES, Helmut et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations a new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 272, n. 44, p. 27812–27817, 1997.

SIMIC, Michael G.; BERGTOLD, David S.; KARAM, Lisa R. Generation of oxy radicals in biosystems. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 214, n. 1, p. 3–12, 1989.

SINGH, Simendra; GUPTA, Alok K. Nitric oxide: Role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1211–1224, 2011.

SOSA, Venus et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.

SREDNI, Benjamin. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 60–69, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.003>>

SUN, Yu et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 600–604, 2015.

TABARELLI, Greice et al. Synthesis and Antitumoral Lung Carcinoma A549 and Antioxidant Activity Assays Of New Chiral β -Aryl-Chalcogenium Azide Compounds. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 2, n. 27, p. 8423–8430, 2017.

TAYLOR, Andrew. Biochemistry of tellurium. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 231–239, 1996.

VALAVANIDIS, Athanasios; VLACHOGIANNI, Thomais; FIOTAKIS, Constantinos. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 120–139, 2009.

WILLCOX, Joye K.; ASH, Sarah L.; CATIGNANI, George L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 275–295, 2004.

XIE, Qiao-wen et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, [s. l.], v. 256, n. 5054, p. 225–228, 1992.

ZHAO, Jian et al. Improve the anticancer potency of the platinum (II) complexes through functionalized leaving group. **Journal of inorganic biochemistry**, [s. l.], v. 175, p. 20–28, 2017.