



Universidade Estadual De Maringá
Centro De Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas



RENAN VINÍCIUS DE OLIVEIRA NOCETTI

**T6 induz morte por estresse oxidativo em células de
adenocarcinoma cervical**

Maringá
2025



Universidade Estadual De Maringá
Centro De Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas



RENAN VINÍCIUS DE OLIVEIRA NOCETTI

**T6 induz morte por estresse oxidativo em células de
adenocarcinoma cervical**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Danielle Lazarin
Bidoia

Maringá

2025

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

N756t

Nocetti, Renan Vinícius de Oliveira

T6 induz morte por estresse oxidativo em células de adenocarcinoma cervical / Renan Vinícius de Oliveira Nocetti. -- Maringá, PR, 2025.
49 f. : il. color., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Lazzarin Bidóia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2025.

1. Câncer cervical. 2. Morte celular. 3. Espécies reativas. 4. Apoptose tardia. I. Bidóia, Danielle Lazzarin, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 571.936

Síntique Raquel de C. Eleutério - CRB 9/1641

FOLHA DE APROVAÇÃO

RENAN VINÍCIUS DE OLIVEIRA NOCETTI

T6 induz morte por estresse oxidativo em células de adenocarcinoma
cervical

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências Biológicas pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em: 24 de janeiro de 2025.

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Danielle Lazarin-Bidóia
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Vania Ramos de Sela da Silva
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Raquel Pantarotto Souza Padovan
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Nascido em 18 de março de 1999 em Nova Andradina – MS, segundo filho de Norma Sueli de Oliveira Nocetti e Moacir Nocetti, concluiu o ensino médio no ano de 2015 pela Escola Estadual Reynaldo Massi e no ano de 2018 ingressou no curso bacharelado de bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá. No ano de 2022 graduou o curso e no ano seguinte (2023) ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – PBC. Atualmente integra o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (LITFaC – Bloco B08) da Universidade Estadual de Maringá, desenvolvendo pesquisas que avaliam a atividade de compostos sintéticos e/ou naturais frente à células tumorais.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o apoio, amor e compreensão ao longo desta jornada. Em especial, agradeço aos meus pais, Norma e Moacir, que sempre acreditaram no meu potencial e me ensinaram o valor da perseverança e do esforço.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Danielle Lazarin-Bidóia, pela paciência, dedicação e por compartilhar seus conhecimentos comigo. Sua orientação foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, e sou profundamente grato por sua confiança e suporte.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura e Prof^a Dr^a Tania Ueda Nakamura pelos ensinamentos e disponibilização do laboratório para realização da dissertação.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado nos momentos de dificuldade e celebração. Obrigado por me incentivarem, escutarem e por fazerem parte dessa caminhada de maneira tão especial.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial Amanda Bakoshi, Luis Yamashita, Rayanne Beltrame, Renata Rodrigues e Rodolfo Balbinot, pelos ensinamentos, paciência e, principalmente, pelas gargalhadas e pelos momentos descontraídos nos cafezinhos na copa. Vocês tornaram o caminho mais leve e inspirador.

À CAPES, CNPq pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta conquista fosse possível.

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação é composta de um resumo geral, abstract e um artigo científico dos resultados obtidos durante o mestrado. O artigo descreve a atividade antitumoral da substância 4-[(2E)-N'-(2,2'-bitienil-5-metileno)hidrazinecarbonil]-6,7-di-hidro-1-fenil-1H-pirazol[3,4-d]piridazin-7-ona (**T6**) e seu possível mecanismo de ação. O artigo será submetido na revista *Drug Development Research* com fator de impacto de 3.8.

RESUMO GERAL

As neoplasias constituem um conjunto heterogêneo de doenças caracterizadas pela proliferação celular descontrolada, com perda dos mecanismos regulatórios homeostáticos, também conhecido como câncer. O carcinoma de colo uterino, ou câncer cervical, configura-se como a quarta neoplasia mais incidente na população feminina global. É desenvolvido principalmente pela infecção persistente por genótipos oncogênicos do *Papilomavírus Humano* (HPV). Os tratamentos incluem intervenções cirúrgicas, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, as quais podem ser empregadas isoladamente ou em regimes combinados. O presente estudo investigou a atividade antitumoral *in vitro* da substância 4-[(2E)-N'-(2,2'-bitienil-5-metileno)hidrazinecarbonil]-6,7-di-hidro-1-fenil-1H-pirazol[3,4-d]piridazin-7-ona (**T6**), um derivado pirazólico conjugado a duas unidades tiofênicas, em células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa). Os resultados obtidos revelaram que o composto **T6** exibiu concentração inibitória (CI₅₀) de $2,73 \pm 0,27 \mu\text{M}$ em células HeLa e apresentou baixa toxicidade em queratinócitos humanos da linhagem HaCat, com concentração citotóxica (CC₅₀) de $21,52 \pm 3,44 \mu\text{M}$. O índice de seletividade (IS) calculado foi de 7,88, sugerindo uma maior afinidade do composto por células tumorais em relação às células não neoplásicas. O mecanismo de ação antitumoral elucidado a partir de ensaios bioquímicos e morfológicos demonstraram a indução de disfunção mitocondrial, com consequente redução na produção ATP, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). As ERO induziram danos extensivos à membrana plasmática, eventos que culminaram na interrupção do ciclo celular na fase G₀/G₁ e subsequente morte celular por apoptose tardia, com progressão para necrose. Além disso, **T6** inibiu a migração e proliferação celular, evidenciando seu potencial como agente quimioterápico seletivo.

Palavras-chave: câncer cervical, células HeLa, espécies reativas, morte celular, apoptose tardia.

ABSTRACT

Neoplasms constitute a heterogeneous group of diseases characterized by uncontrolled cell proliferation, with the loss of homeostatic regulatory mechanisms, commonly known as cancer. Cervical carcinoma, or cervical cancer, is the fourth most prevalent neoplasm in the global female population. It is mainly developed by persistent infection with oncogenic genotypes of the *Human Papillomavirus* (HPV). Treatments include surgical interventions, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy, which may be used alone or in combination. This study investigated the *in vitro* antitumor activity of the substance 4-[(2E)-N'-(2,2'-bithiophenyl-5-methylene)hydrazinecarbonyl]-6,7-dihydro-1-phenyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyridazin-7-one (**T6**), a pyrazolic derivative conjugated to two thiophenic units, in cells from human cervical adenocarcinoma (HeLa). The results showed that the compound **T6** exhibited an inhibitory concentration (IC_{50}) of 2.73 ± 0.27 μ M in HeLa cells and demonstrated low toxicity in human keratinocytes from the HaCat lineage, with a cytotoxic concentration (CC_{50}) of 21.52 ± 3.44 μ M. The calculated selectivity index (SI) was 7.88, suggesting a higher affinity of the compound for tumor cells compared to non-neoplastic cells. The elucidated antitumor mechanism, based on biochemical and morphological assays, demonstrated the induction of mitochondrial dysfunction, with a subsequent reduction in ATP production, the generation of reactive oxygen species (ROS), and nitrogen species (RNS). ROS induced extensive damage to the plasma membrane, events that led to cell cycle interruption at the G_0/G_1 phase and subsequent late-stage apoptosis, progressing to necrosis. Additionally, **T6** inhibited cell migration and proliferation, highlighting its potential as a selective chemotherapeutic agent.

Keywords: cervical cancer, HeLa cells, reactive species, cell death, late apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da substância 4-[(2E)-N'-(2,2'-bitienil-5-metileno)hidrazinecarbonil]-6,7- di-hidro-1-fenil-1H-pirazol[3,4-d]piridazin-7-ona (T6).	18
Figura 2. Alterações morfológicas em células HeLa observadas por microscopia eletrônica de varredura pós-tratamento com T6 por 48 h. (A, B) células não-tratadas; (C-F) células tratadas com CI_{50} (2,73 μ M); (G-H) células tratadas com $2\times CI_{50}$ (5,46 μ M). (F) filopódios, (L) lamelipódios, (Mi) microvilosidades, (Mi*) microvilosidades alteradas, (ponta de seta) alterações de filopódios e lamelipódios, (seta) ruptura celular. Barra de escala = 10 μ M (A, C, D, E, G, H, I), 5 μ M (B, F, J).	26
Figura 3. Ensaio de migração celular em células HeLa pós-tratamento com células tratadas com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo) ou $2\times CI_{50}$ (5,46 μ M, em roxo escuro) de T6 por 48 h. (A) microscopia óptica representativa de três experimentos independentes. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir de imagens obtidas por microscopia óptica. ** $p\leq 0,005$	27
Figura 4. Ensaio de formação de colônias em células HeLa pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo) ou $2\times CI_{50}$ (5,46 μ M, em roxo escuro) de T6 por 48 h. (A) microscopia óptica representativa de três experimentos independentes. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir de imagens obtidas por microscopia óptica. ** $p\leq 0,005$	28
Figura 5. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células HeLa marcadas com TMRE (0,025 μ M, em roxo) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo escuro) ou $2\times CI_{50}$ (5,46 μ M) de T6 por 48 h. CCCP (100 μ M, em rosa) utilizado como controle positivo. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráficos de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. *** $p\leq 0,001$ e **** $p\leq 0,0001$	29
Figura 6. Determinação de ERO de células HeLa marcadas com H ₂ DCFDA (10 μ M) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo) ou $2\times CI_{50}$ (5,46 μ M, em roxo escuro) de T6 por 48 h. H ₂ O ₂ (10 mM, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. ** $p\leq 0,005$; *** $p\leq 0,001$ e **** $p\leq 0,0001$	30
Figura 7. Determinação de níveis de óxido nítrico em células HeLa marcadas com a sonda DAF-FM (1 μ M) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo) ou $2\times CI_{50}$ (5,46	

μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. H_2O_2 (10 mM, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. $**p \leq 0,005$ e $***p \leq 0,001$ 31

Figura 8. Determinação de lipoperoxidação em células HeLa marcadas com DPPP (50 μM) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. H_2O_2 (10 mM, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. $**p \leq 0,005$ 32

Figura 9. Determinação da integridade a membrana plasmática em células HeLa marcadas com iodeto de propídio (IP, 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Digitonina (40 μM , em rosa) utilizada como controle positivo, tratada por 5 min. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. $***p \leq 0,001$ e $****p \leq 0,0001$ 33

Figura 10. Determinação de formação de corpos lipídicos em células HeLa marcadas com vermelho do Nilo (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. H_2O_2 (10 mM, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. $***p \leq 0,001$ e $****p \leq 0,0001$ 34

Figura 11. Quantificação de ATP intracelular em células HeLa marcadas pelo kit Cell Titer Glo® pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. KCN (500 μM , em rosa). $***p \leq 0,001$ e $****p \leq 0,0001$.. 35

Figura 12. Determinação da exposição da fosfatidilserina e morte celular em células HeLa marcadas com anexina-V FITC e iodeto de propídio (IP, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Actinomicina D (ActD, 20 μM , em rosa) utilizada como controle positivo. (A) dotplot obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. $***p \leq 0,001$ e $****p \leq 0,0001$ 37

Figura 13. Determinação do tamanho celular em células HeLa pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Actinomicina D (ActD, 20 μM , em rosa) utilizada como controle positivo. (A) histograma

obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. *** $p \leq 0,001$ 38

Figura 14. Determinação do ciclo celular em células HeLa marcadas com IP ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} ($2,73 \mu\text{M}$, em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ ($5,46 \mu\text{M}$, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Taxol ($10 \mu\text{M}$, em rosa) utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$ e *** $p \leq 0,0001$ 39

Figura 15. Figura resumo do mecanismo de ação do **T6** (setas roxas) causando perda $\Delta\Psi_m$ e diminuição de ATP, gerou aumento de ERO e ERN, consequentemente, lipoperoxidação, perda da integridade da membrana, aumento de corpos lipídicos, diminuição na fase G_0/G_1 , diminuição do tamanho celular culminando na morte celular por apoptose tardia e subsequente evolução para necrose. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da atividade antitumoral de T6 e células HaCat.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ActD	actinomicina D
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BOD	<i>biochemical oxygen demand</i>
CCCP	carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona
CC ₅₀	concentração citotóxica para 50% das células
CI ₅₀	concentração inibitória de 50% das células tumorais
CO ₂	dióxido de carbono
DAF-FM	diacetato de diaminofluoresceína
DCF	diclorofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPP	difenil-1-pirenilfosfina
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
h	horas
H ₂ DCFDA	2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IP	iodeto de propídio
IS	índice de seletividade
KCN	cianeto de potássio
M	molar
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mM	milimolar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
MTT	brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	nanômetro
PBS	tampão salina fosfato
pH	potencial de hidrogênio

SFB	soro fetal bovino
U.A.	unidades arbitrárias
$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana mitocondrial
μg	micrograma
μm	micrômetro
μM	micromolar
λ_{em}	comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	comprimento de onda de excitação
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1.	Reagentes	19
2.2.	Cultura de células.....	19
2.3.	Substância	19
2.4.	Viabilidade celular	20
2.5.	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	20
2.6.	Ensaio de cicatrização celular	20
2.7.	Ensaio de formação de colônias.....	21
2.8.	Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	21
2.9.	Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO)	21
2.10.	Determinação dos níveis de óxido nítrico.....	22
2.11.	Determinação da lipoperoxidação	22
2.12.	Determinação da integridade da membrana plasmática.....	22
2.13.	Determinação da formação de corpos lipídicos	23
2.14.	Determinação da quantidade de ATP intracelular	23
2.15.	Determinação da exposição de fosfatidilserina	23
2.16.	Determinação do tamanho celular	24
2.17.	Determinação do ciclo celular	24
2.18.	Análises estatísticas	24
3.	RESULTADOS	25
3.1.	Ensaio de viabilidade celular	25
3.2.	Alterações morfológicas	25
3.3.	Determinação da cicatrização celular	27
3.4.	Determinação da formação de colônias	28
3.5.	Determinação do $\Delta\Psi_m$	29
3.6.	Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO)	30
3.7.	Determinação dos níveis de óxido nítrico.....	31
3.8.	Determinação da lipoperoxidação	32
3.9.	Determinação da integridade da membrana plasmática.....	33
3.10.	Determinação da formação de corpos lipídicos	34

3.11.	Quantificação de ATP intracelular	35
3.12.	Determinação da exposição da fosfatidilserina	36
3.13.	Determinação do tamanho celular	38
3.14.	Determinação do ciclo celular	39
4.	DISCUSSÃO.....	40
5.	CONCLUSÃO	44
6.	REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

Neoplasia ou câncer são um conjunto de diversas doenças que podem acometer qualquer órgão ou tecido, quando células normais crescem desenfreadas e ignoram seus limites normais. Este crescimento exacerbado pode gerar metástase, quando há a invasão de outros órgãos, sendo esta, a causa mais importante de mortes por câncer (OMS, 2023). No ano de 2018, 9,6 milhões de mortes foram estimadas em decorrência de metástase, sendo a segunda maior causa de morte no mundo neste ano (OMS, 2023). Existem inúmeros tratamentos para o câncer, dependendo do tipo e do estágio que se encontra, sendo eles, quimioterapia, cirurgia, radioterapia, terapia hormonal e imunoterapia, podendo em alguns casos se fazer o uso combinado de terapias para um melhor resultado (WANG; LEI; HAN, 2018).

O câncer de colo de útero ou cervical é o quarto tipo de câncer mais incidente na população feminina. No ano de 2022, foi estimado que 660 mil mulheres foram diagnosticadas no mundo todo, e 350 mil morreram (WHO, 2023). É desenvolvido principalmente pela infecção persistente de alguns tipos do *Papilomavirus Humano* – HPV (AMERICAN CÂNCER SOCIETY, 2020). É bastante frequente na população humana, entretanto, a maioria dos casos não evolui para uma infecção e o sistema imune acaba por eliminar o vírus do organismo. Uma vez que essa infecção se torna crônica, ou seja, quando o organismo não consegue eliminar o vírus, aumenta a probabilidade de desenvolver lesões celulares de baixo à alto grau, que podem levar ao câncer (BURD, 2003). O HPV-16 representa quase 60% dos casos de câncer cervical e o HPV-18 é responsável por 10% dos casos. Outros tipos de HPV contribuem individualmente para menos de 5% dos casos (GRAHAM, 2017; SERRANO, 2018).

O diagnóstico do câncer cervical é feito através da avaliação histológica da biopsia, e os dois tipos de câncer mais comuns são o escamoso e o adenocarcinoma. A prevenção é feita a partir do uso de preservativos e vacinação, que possuem o intuito de evitar a contração de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) e o vírus do HPV (SOCIETY, 2020; WHO, 2023). Adicionalmente, deve ser realizado o exame preventivo Papanicolau de mulheres que estão dentro do intervalo de risco anualmente, já que o preventivo detecta lesões celulares de forma precoce. É crucial a detecção do câncer em estágios iniciais e a realização do tratamento de forma correta, contendo assim a progressão da doença e melhorando o prognóstico da paciente (BURD, 2003; WHO, 2023).

O estágio em que o câncer se encontra é o fator de prognóstico mais importante da doença, sendo divididos em estágios de 1 a 4 e alguns de 0 a 4, de acordo com a International

Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (TSIKOURAS 2016; JOHNSON, 2019). O tratamento do câncer cervical é realizado a partir do estágio em que a doença se encontra, tamanho, presença de metástase ou não, idade e saúde da paciente, sendo feito o uso de cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, sozinha ou combinadas (JOHNSON, 2019; WHO, 2023). Entretanto, esses tratamentos causam efeitos colaterais severos e em casos avançados são ineficientes para o tratamento (ZHANG et al., 2021). Dado esse contexto, fica evidente a necessidade da busca de novos fármacos para o tratamento do câncer cervical.

A substância 4-[(2E)-N'-(2,2'-bitienil-5-metileno)hidrazinecarbonil]-6,7-di-hidro-1-fenil-1H-pirazol[3,4-d]piridazin-7-ona (**T6**) (figura 1) é um derivado de pirazol ligado a duas moléculas de tiofeno (JACOMINI et al., 2016). É descrito na literatura que derivados de pirazol possuem inúmeras atividades biológicas, tais como, antidepressivo, antibacterial, antiviral, antioxidante, anti-inflamatório, leishmanicida, entre outras (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2015). O tiofeno também possui várias atividades biológicas, sendo elas, anticâncer, antiparasitária, antimicrobiana, anticonvulsante, anti-inflamatória etc. (AMR, 2010).

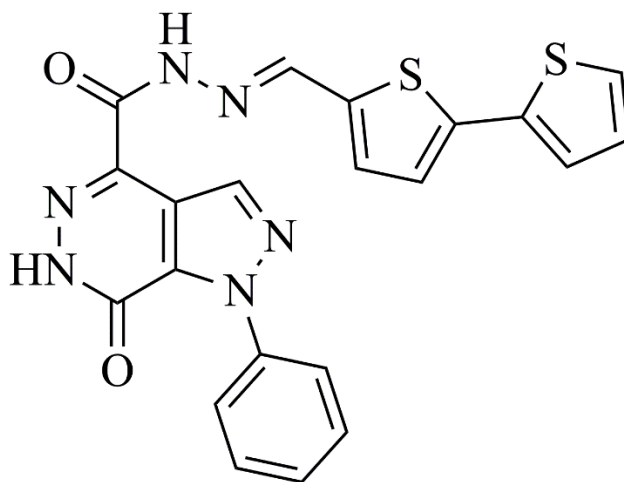


Figura 1. Estrutura química da substância 4-[(2E)-N'-(2,2'-bitienil-5-metileno)hidrazinecarbonil]-6,7- di-hidro-1-fenil-1H-pirazol[3,4-d]piridazin-7-ona (**T6**).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral do composto sintético **T6** em células de adenocarcinoma cervical (HeLa), bem como o seu possível mecanismo de ação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Ácido fólico, carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona (CCCP), cianeto de potássio (KCN), 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA), digitonina, dimetilsulfóxido (DMSO), 1,3-bis(difenilfosfino)propano (DPPP), perclorato de éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE), 9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona (vermelho do Nilo) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anexina V-FITC, 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA), iodeto de propídio (IP) e RNase A foram obtidos da Invitrogen (Grand Island, NY, EUA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (NY, EUA). Cacodilato de sódio, glutaraldeído e resina Polybed[®] 812 foram obtidos da Electron Microscopy Sciences (EMS - Hatfield, EUA). Kit de viabilidade celular luminescente CellTiter-GLO foi obtido da Promega (Madison, Wisconsin, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Cultura de células

Células das linhagens HeLa (adenocarcinoma cervical) e HaCat (queratinócitos humanos) foram cultivadas em meio DMEM suplementadas com 10% de SFB, 5000 U mL⁻¹ de penicilina e 5 mg mL⁻¹ de estreptomicina, mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. O repique celular e/ou plaqueamento foi realizado com a formação de uma monocamada confluyente de células, utilizando tripsina. Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas ($2,5 \times 10^5$ células mL⁻¹, salvo exceções) em placa de 6, 24 ou 96 poços, cultivadas em DMEM, suplementadas com 10% de SFB e incubadas por 24 h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

2.3. Substância

A substância 4-[(2E)-N'-(2,2'-bitienil-5-metileno)hidrazinecarbonil]-6,7- di-hidro-1-fenil-1H-pirazol[3,4-d]piridazin-7-ona (**T6**) (figura 1) foi sintetizada como descrito por Jacomini e colaboradores (2016). Os ensaios biológicos foram realizados com uma solução do composto diluído em DMSO (menor que 1%).

2.4. Viabilidade celular

Células HeLa e HaCat foram plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi removido e adicionado o tratamento com diferentes concentrações (200, 100, 50, 10, 1 µM) do composto **T6** ou DMEM, e incubado por 48 h, nas mesmas condições. Após o tratamento, ele foi retirado e adicionando brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, 2 mg mL⁻¹). A placa foi incubada por 4 h, protegida da luz a 37 °C e 5% de CO₂. O meio contendo MTT foi removido e adicionado DMSO para solubilizar os cristais. O ensaio foi lido na absorbância de 570 nm (Power WaveXS, BIO-TEK, EUA), o CI₅₀ e CC₅₀ foram determinados através da análise de regressão não linear dos dados, e o índice de seletividade foi calculado por meio da seguinte equação: CC₅₀/CI₅₀ (KAPLUM, 2018).

2.5. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 24 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. Em seguida, foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e aderidos a um suporte de poli-L-lisina por 1 h. As células aderidas foram lavadas e desidratadas em gradiente crescente de etanol, secas ao ponto crítico com CO₂, revestidas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico Shimadzu SS-550 (ZANI et al., 2023).

2.6. Ensaio de cicatrização celular

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 24 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, a monocamada foi riscada com uma ponteira estéril, lavada com PBS e tratadas com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6**, suplementadas com 0,5% de SFB por 48 h. A migração foi observada por meio de um microscópio invertido em contraste de fase (4x; Olympus CKX41). A área das feridas foi calculada pelo software ImageJ (KAPLUM et al., 2018).

2.7. Ensaio de formação de colônias

Células HeLa foram plaqueadas ($500 \text{ células mL}^{-1}$) em placa de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24 h, foram tratadas com o CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ do **T6** por 48 h. Em seguida, foi feito a remoção do tratamento e adicionado DMEM suplementado com 10% SFB a cada 3 dias, durante 10 dias. Por fim, as células foram fixadas por 10 min em metanol 70% e posteriormente coradas com Giemsa 10% por 45 min. As colônias foram observadas por meio de um microscópio invertido em contraste de fase (4x; Olympus CKX41). Foram quantificadas apenas colônias com pelo menos 50 células (ZANI et al., 2023).

2.8. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ do **T6** por 48 h. Em seguida, foram lavadas com solução salina 0,9%, tripsinizadas e ressuspensas em 500 μL de solução salina 0,9%, centrifugadas a 1.500 rpm por 3 min. Foi removido o sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em 500 μL de solução salina 0,9% e as células marcadas com TMRE (0,025 μM) por 30 min a 37°C e 5% de CO_2 . CCCP 100 μM foi utilizado como controle positivo. Por fim, as células foram centrifugadas novamente à 1.500 rpm por 3 min, e o pellet foi ressuspensão em 500 μL de solução salina 0,9%. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA) onde um total de 10.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida (ZANI et al., 2023).

2.9. Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI_{50} e $2\times\text{CI}_{50}$ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 mM tratado por 1 h. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 μL de PBS, centrifugadas a 1.500 rpm por 3 min. Foi removido o sobrenadante, o pellet ressuspensão em 500 μL de PBS e as células marcadas com H_2DCFDA (10 μM) e incubadas por 30 min a 37°C e 5% de CO_2 . Por fim, foram centrifugadas novamente à 1.500 rpm por 3 min, e o pellet foi ressuspensão em 500 μL de PBS. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, com parâmetros descritos anteriormente (ZANI et al., 2023).

2.10. Determinação dos níveis de óxido nítrico

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi H₂O₂ 10 mM tratado por 1 h. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 µL de PBS, centrifugadas a 1.500 rpm por 3 min. Foi removido o sobrenadante, o pellet ressuspenso em 500 µL de PBS e as células marcadas com DAF-FM DA (1 µM) e incubadas por 30 min a 37 °C e 5% de CO₂. Por fim, foram centrifugadas novamente à 1.500 rpm por 3 min. O pellet foi ressuspenso em 500 µL de PBS e incubado novamente por 15 min. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, com parâmetros descritos anteriormente (ZANI et al., 2023).

2.11. Determinação da lipoperoxidação

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poço e incubadas. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi H₂O₂ 10 mM tratado por 1 h. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 µL de PBS, centrifugadas a 1.500 rpm por 3 min. Foi removido o sobrenadante, o pellet ressuspenso em 500 µL de PBS e as células marcadas com DPPP (50 µM) e incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Por fim, as células foram transferidas em uma placa preta de 96 poços. A intensidade de fluorescência foi quantificada usando o espectrofluorímetro (VICTOR X3, PerkinElmer) e normalizada pela contagem do número de células (ZANI et al., 2023).

2.12. Determinação da integridade da membrana plasmática

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi digitonina 40 µM. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 µL de PBS, centrifugadas a 1.500 rpm por 3 min. O sobrenadante foi removido, o pellet ressuspenso em 500 µL de PBS e as células marcadas com IP (0,2 µg mL⁻¹) e incubadas por 5 min a 37 °C e 5% de CO₂. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, com parâmetros descritos anteriormente (ZANI et al., 2023).

2.13. Determinação da formação de corpos lipídicos

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi H₂O₂ 10 mM tratado por 1 h. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 µL de PBS, centrifugadas a 1.500 rpm por 3 min. Foi removido o sobrenadante, o pellet ressuspenso em 500 µL de PBS e as células marcadas com vermelho do Nilo (10 µg mL⁻¹) e incubadas por 30 min a 37 °C e 5% de CO₂. Por fim, foram centrifugadas novamente à 1.500 rpm por 3 min, e o pellet foi ressuspenso em 500 µL de PBS. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, com parâmetros descritos anteriormente (ZANI et al., 2023).

2.14. Determinação da quantidade de ATP intracelular

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 µL de PBS. Por fim, as células foram transferidas para uma placa branca de 96 poços, adicionado 50 µL do marcador Cell Titer Glo e incubadas no escuro por 10 min. KCN 500 µM foi utilizado como controle positivo. A intensidade de luminescência foi quantificada usando o espectrofluorímetro (VICTOR X3, PerkinElmer). A intensidade de luminescência foi normalizada pela contagem do número de células (ZANI et al., 2023).

2.15. Determinação da exposição de fosfatidilserina

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi ActD 20 µM. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 µL de tampão de ligação (140 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ e 10 mM de HEPES-Na, pH 7,4) e incubadas no escuro a temperatura ambiente com anexina V-FITC por 15 min. Em seguida foi adicionado IP (2 µg mL⁻¹). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, com parâmetros descritos anteriormente (ZANI et al., 2023).

2.16. Determinação do tamanho celular

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi ActD 20 µM. Em seguida, foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspensas em 500 µL de PBS, centrifugadas a 1.500 rpm por 3 min. Foi removido o sobrenadante, e o pellet ressuspenso em 500 µL de PBS. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, com parâmetros descritos anteriormente (ZANI et al., 2023).

2.17. Determinação do ciclo celular

Células HeLa foram plaqueadas em placa de 6 poços e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 h, foi feito o tratamento com o CI₅₀ e 2×CI₅₀ do **T6** por 48 h. O controle positivo foi Taxol 10 µM. Em seguida foram fixadas em metanol 70% a 4 °C e homogeneizados regularmente. Após 24 h, foram lavadas com PBS e incubadas com IP (2 µg mL⁻¹) e RNase A (10 µg mL⁻¹) por 45 min a 37 °C. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, com parâmetros descritos anteriormente (ZANI et al., 2023).

2.18. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Os dados foram analisados por meio da análise de variância one-way ou two-way (ANOVA), acompanhado do pós-teste de Tukey. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio de viabilidade celular

Neste ensaio colorimétrico, o MTT é reduzido pela enzima desidrogenase presente nas mitocôndrias viáveis, gerando cristais púrpuras de formazan. A fluorescência resultante é proporcional à quantidade de células viáveis. A substância **T6** apresentou CI_{50} de $2,73 \pm 0,27$ μM em células HeLa e baixa toxicidade em células de queratinócitos humano (HaCat) com CC_{50} de $21,52 \pm 3,44$ μM , apresentando índice de seletividade de 7,88.

Tabela 1. Avaliação da atividade antitumoral de T6 e células HaCat.

HeLa CI_{50} (μM)	HaCat CC_{50} (μM)	IS
$2,73 \pm 0,27$	$21,52 \pm 3,44$	7,88

3.2. Alterações morfológicas

A figura 2 (A, B) apresenta as células HeLa sem alterações, com suas microvilosidades características intactas (Mi), membrana plasmática íntegra, lamelipódios (L) e filopódios (F) (projeções do citoesqueleto) em seu estado normal. Na figura 2 (C-F), após o tratamento com o CI_{50} do **T6**, é possível observar perda das microvilosidades (Mi*) característica das células HeLa, pequenas rupturas na membrana plasmática, indicadas pelas setas, e alterações nos filopódios (F) e lamelipódios (L), por sua vez indicadas pelas pontas de seta. O tratamento com $2 \times CI_{50}$ do **T6** (figura 2, G-J) intensificou as alterações ocorridas com o tratamento de CI_{50} .

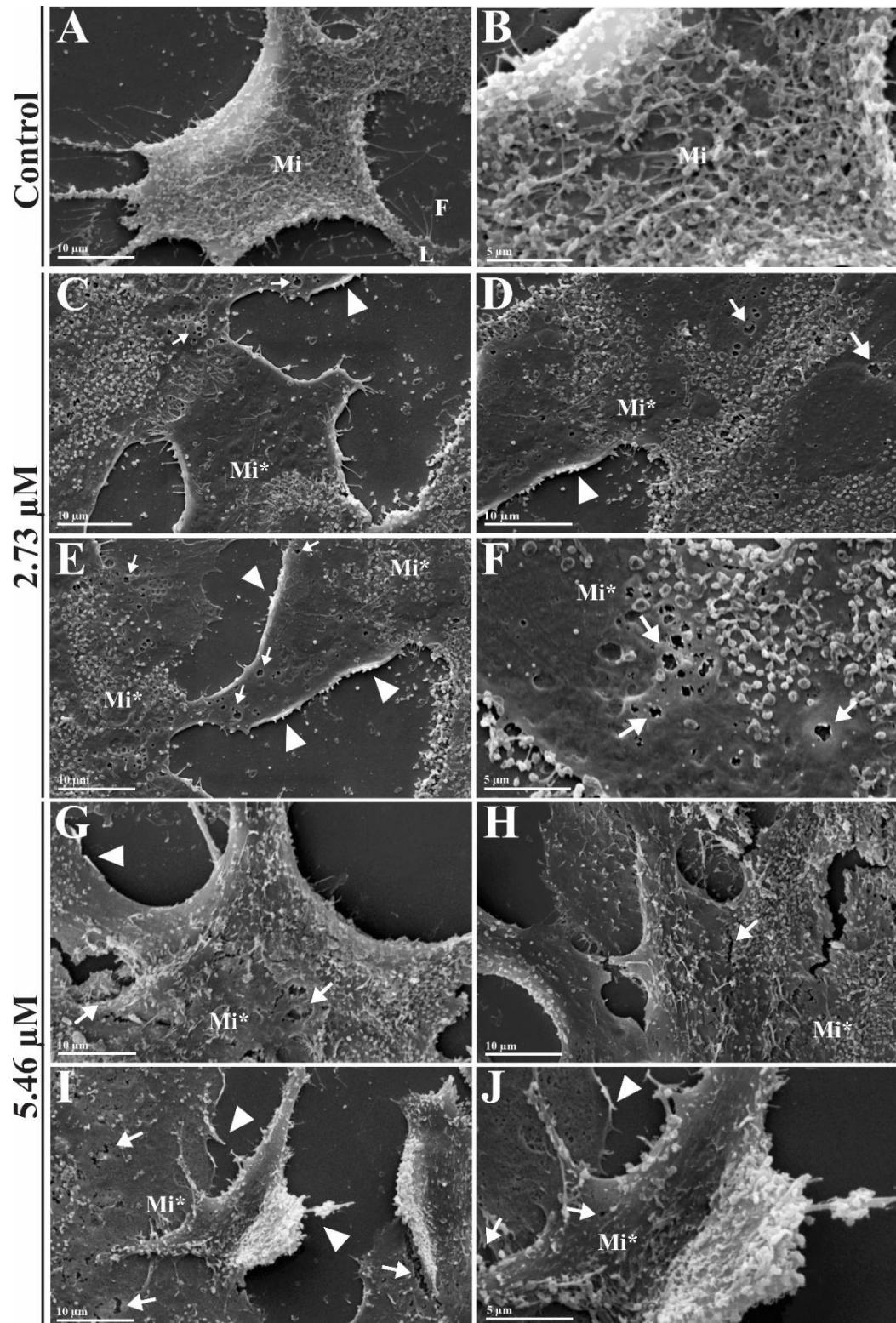


Figura 2. Alterações morfológicas em células HeLa observadas por microscopia eletrônica de varredura pós-tratamento com **T6** por 48 h. (A, B) células não-tratadas; (C-F) células tratadas com CI_{50} (2,73 μ M); (G-H) células tratadas com $2 \times CI_{50}$ (5,46 μ M). (F) filopódios, (L) lamelipódios, (Mi) microvilosidades, (Mi*) microvilosidades alteradas, (ponta de seta) alterações de filopódios e lamelipódios, (seta) ruptura celular. Barra de escala = 10 μ M (A, C, D, E, G, H, I), 5 μ M (B, F, J).

3.3. Determinação da cicatrização celular

Na figura 3A, é possível observar diminuição na taxa de cicatrização após 48 h de tratamento com o CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **T6**, quando comparado ao controle negativo, apenas suplementado com 0,5% de SFB e não tratado, que apresenta cicatrização quase completa. Observa-se na figura 2B uma diminuição na taxa de cicatrização de 59% e 29% para o CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ de **T6**, respectivamente, quando comparado ao controle negativo que apresentou uma taxa de cicatrização de 76%, sendo a concentração de 5,46 μM capaz de reduzir significativamente a cicatrização.

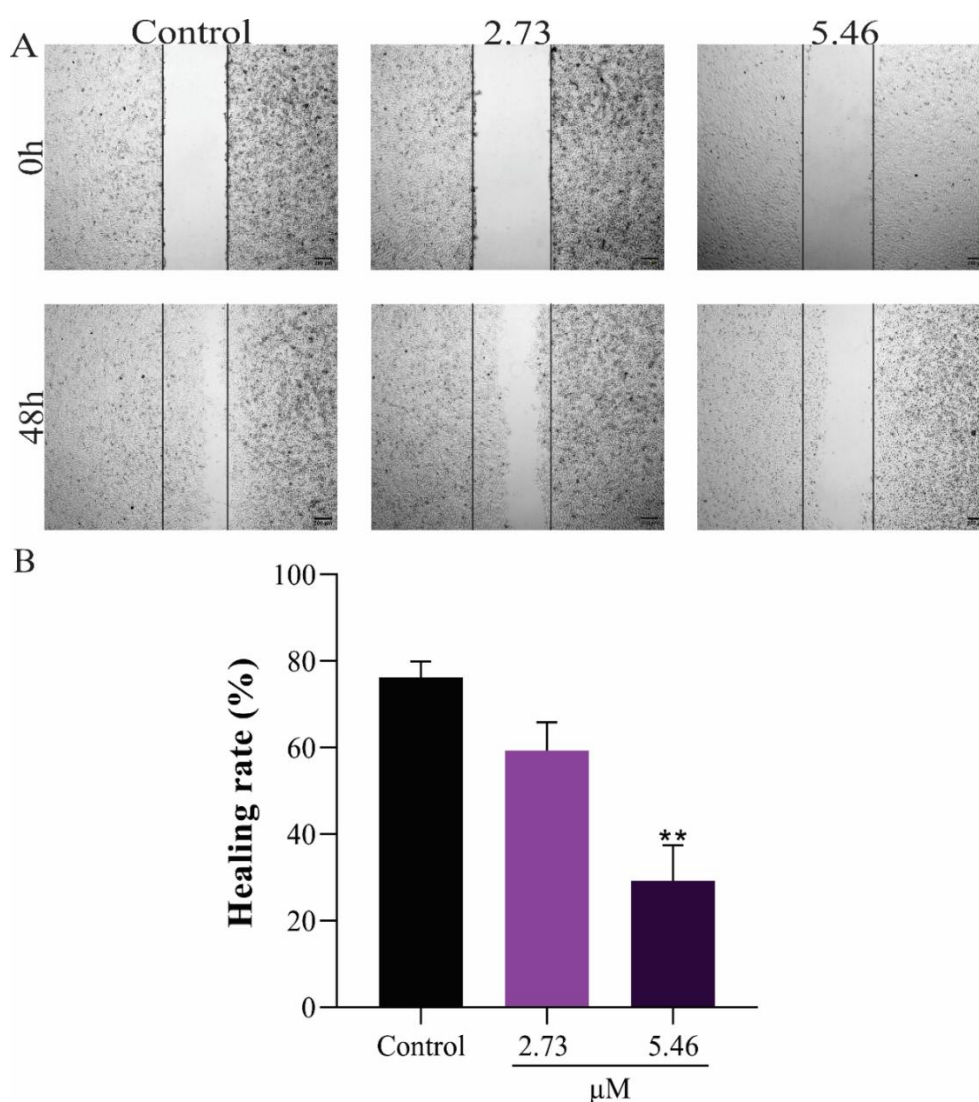


Figura 3. Ensaio de migração celular em células HeLa pós-tratamento com células tratadas com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. (A) microscopia óptica representativa de três experimentos independentes. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir de imagens obtidas por microscopia óptica. ** $p \leq 0,005$.

3.4. Determinação da formação de colônias

A figura 4A apresenta diminuição da formação de colônias pós-tratamento com **T6** quando comparado ao controle negativo, havendo redução de 88% para o CI_{50} (barra em roxo) e de 98,34% para o $2 \times CI_{50}$ (barra em roxo escuro), como demonstrado no gráfico de barras (figura 4B). Ambas as concentrações reduziram de forma significativa a formação de colônias.

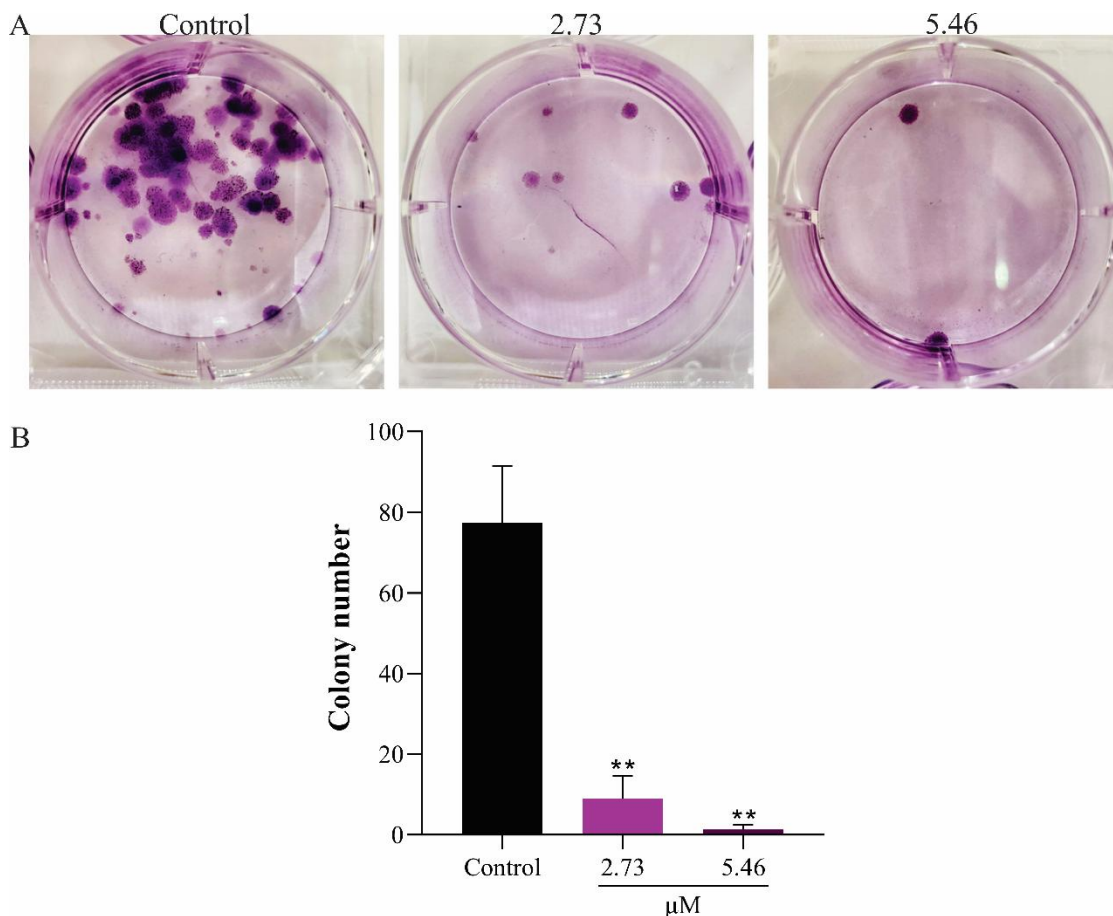


Figura 4. Ensaio de formação de colônias em células HeLa pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. (A) microscopia óptica representativa de três experimentos independentes. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir de imagens obtidas por microscopia óptica. ** $p \leq 0,005$.

3.5. Determinação do $\Delta\Psi_m$

Na figura 5 (A e B), observa-se uma diminuição do $\Delta\Psi_m$ pós-tratamento por 48 h com **T6**. O tratamento com o CI_{50} (curva e barra em roxo) causou uma diminuição de 55% enquanto o $2\times CI_{50}$ (curva e barra em roxo escuro) diminuiu em 68%, indicando uma despolarização significativa da membrana mitocondrial quando comparado com o controle negativo. Já o CCCP causou uma despolarização de 78%. Essa despolarização é observada devido ao deslocamento dos picos roxos e rosa para a esquerda na figura 5A, comparado ao pico do controle negativo, representado em cinza.

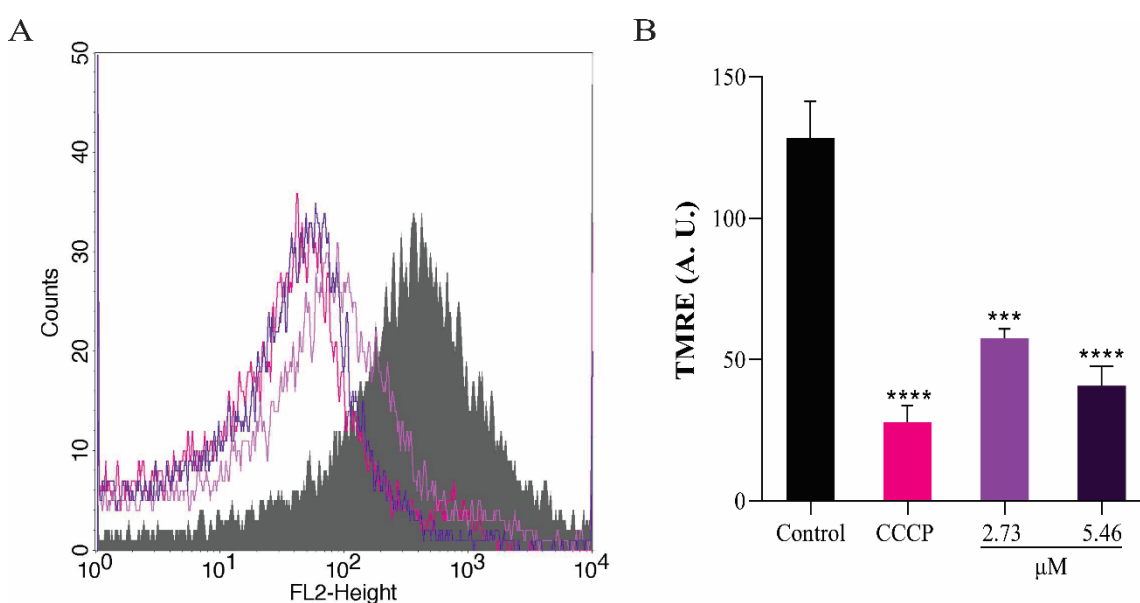


Figura 5. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células HeLa marcadas com TMRE (0,025 μ M, em roxo) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo escuro) ou $2\times CI_{50}$ (5,46 μ M) de **T6** por 48 h. CCCP (100 μ M, em rosa) utilizado como controle positivo. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráficos de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. *** $p\leq 0,001$ e **** $p\leq 0,0001$.

3.6. Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A figura 6A apresenta um aumento de ERO em células HeLa tratadas com CI_{50} (curva e barra em roxo) e $2\times\text{CI}_{50}$ (curva e barra em roxo escuro) do **T6** por 48 h, sendo este aumento de 218% e 476%, respectivamente, e de 398% para o H_2O_2 quando comparado ao controle negativo. Este aumento foi estatisticamente significativo para ambas as concentrações de tratamento, bem como para o H_2O_2 . O aumento de ERO é demonstrado no deslocamento dos picos roxos e rosa para a direita na figura 6A, comparado ao pico do controle negativo, em cinza.

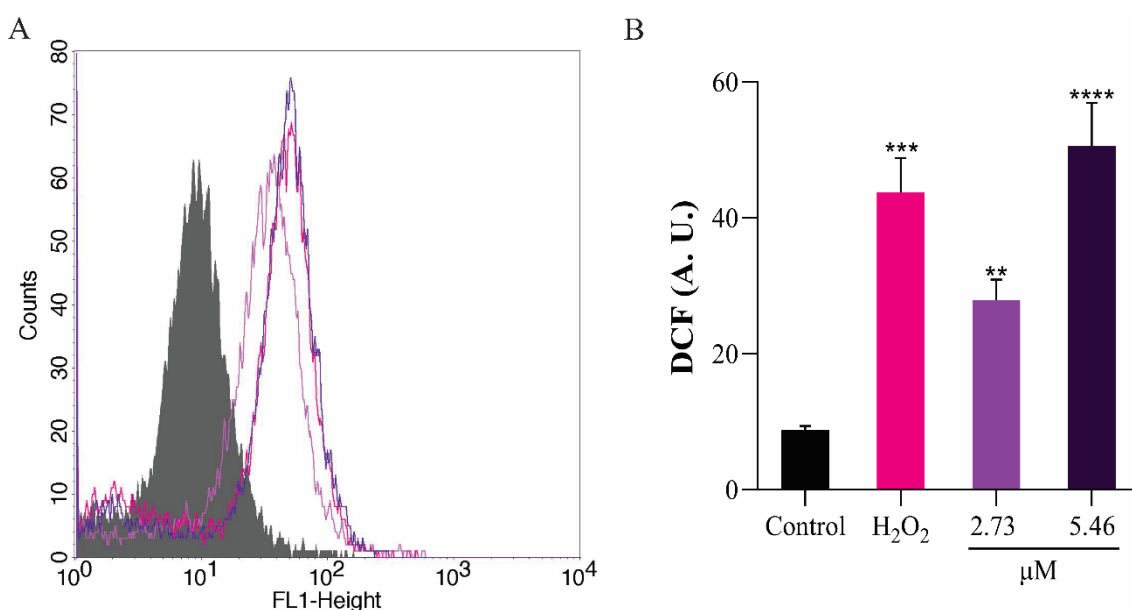


Figura 6. Determinação de ERO de células HeLa marcados com H_2DCFDA (10 μM) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2\times\text{CI}_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. H_2O_2 (10 mM, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. ** $p\leq 0,005$; *** $p\leq 0,001$ e **** $p\leq 0,0001$.

3.7. Determinação dos níveis de óxido nítrico

Na figura 7A, observa-se um aumento de óxido nítrico após tratamento com CI_{50} (curva e barra em roxo), $2 \times CI_{50}$ (curva e barra em roxo escuro) do **T6**, e H_2O_2 (curva e barra em rosa) devido ao deslocamento dos picos roxos e rosa para a direita, comparado ao pico do controle negativo, em cinza. Nota-se um aumento estatisticamente significativo (figura 7B) de 182% e 229%, respectivamente, e 161% para o H_2O_2 quando comparado com o controle negativo.

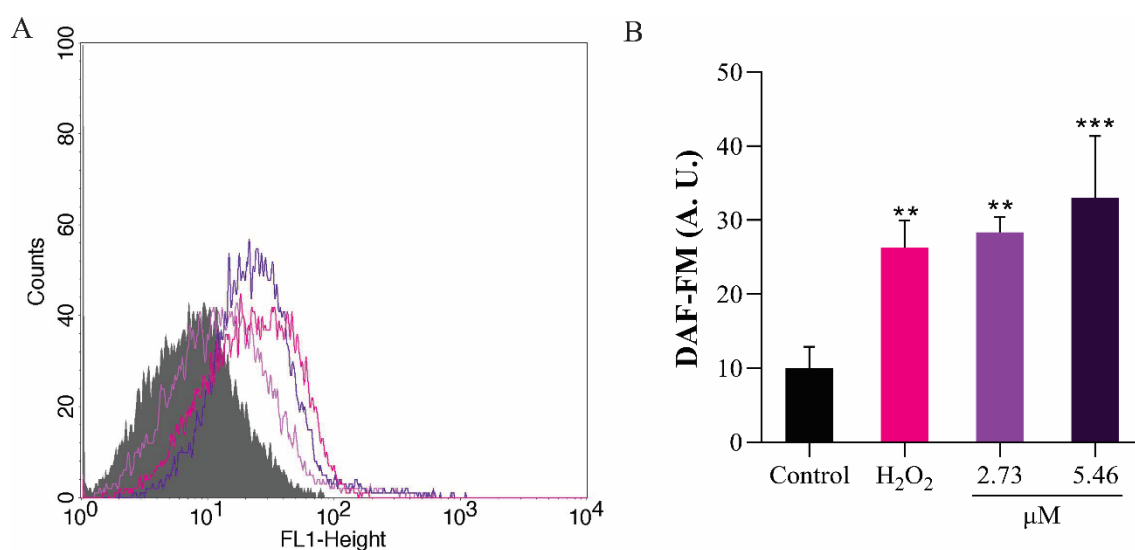


Figura 7. Determinação de níveis de óxido nítrico em células HeLa marcadas com a sonda DAF-FM (1 μ M) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ (5,46 μ M, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. H_2O_2 (10 mM, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. ** $p \leq 0,005$ e *** $p \leq 0,001$.

3.8. Determinação da lipoperoxidação

Na figura 8, observa-se um aumento de lipoperoxidação em células HeLa após o tratamento com CI_{50} (barra em roxo) e $2 \times CI_{50}$ (barra em roxo escuro) de **T6**. Notando um aumento significativo de 770% e 890%, respectivamente, e de 776% para o H_2O_2 (barra em rosa) quando comparado com o controle negativo.

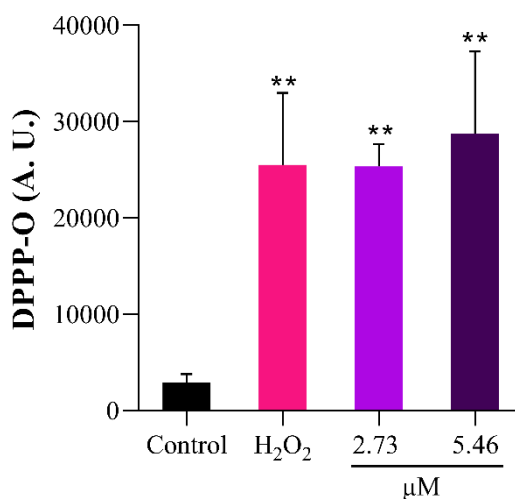


Figura 8. Determinação de lipoperoxidação em células HeLa marcadas com DPPH (50 μM) pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μM , em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ (5,46 μM , em roxo escuro) de **T6** por 48 h. H_2O_2 (10 mM, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. ** $p \leq 0,005$.

3.9. Determinação da integridade da membrana plasmática

Na figura 9A é possível observar um aumento de células positivas para IP após o tratamento com ambas as concentrações de **T6** (curvas e barras em roxo e roxo escuro), bem como para a digitonina (curva e barra em rosa), uma vez que os picos estão deslocados para a direita em relação ao pico em cinza, do controle negativo. O aumento observado foi plotado na figura 9B, sendo de 278% e 405% para os tratamentos com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ do **T6**, respectivamente, e de 1243% para digitonina quando comparado com o controle negativo.

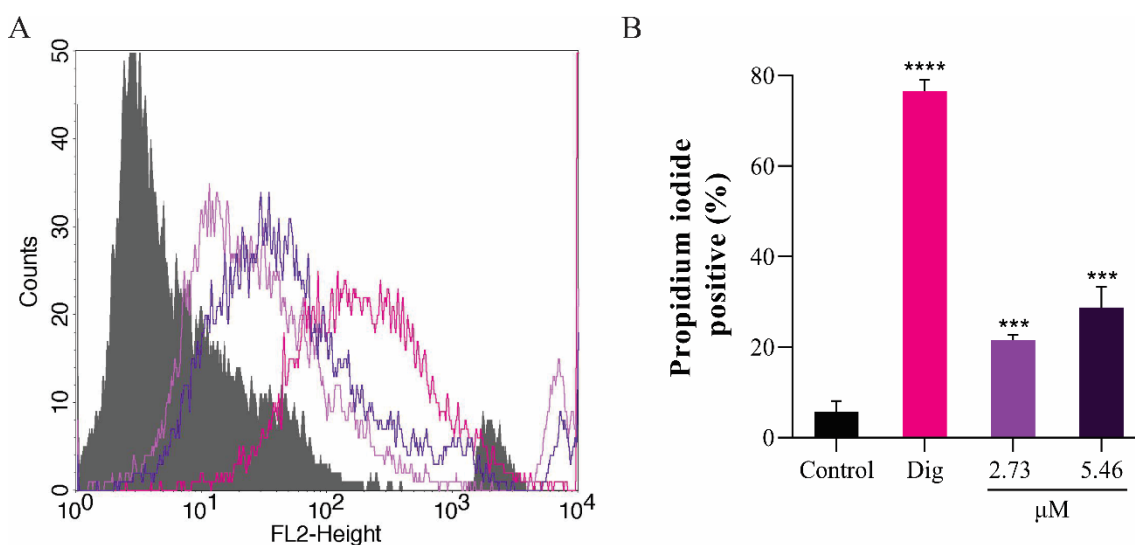


Figura 9. Determinação da integridade da membrana plasmática em células HeLa marcadas com iodeto de propídio (IP, $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} ($2,73 \mu\text{M}$, em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ ($5,46 \mu\text{M}$, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Digitonina ($40 \mu\text{M}$, em rosa) utilizada como controle positivo, tratada por 5 min. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$.

3.10. Determinação da formação de corpos lipídicos

A figura 10A apresenta aumento na formação de corpos lipídicos através da marcação com vermelho do Nilo para os tratamentos realizados com **T6** por 48 h e para o controle positivo H_2O_2 , havendo deslocamento dos picos roxos e rosa para a direita, comparado ao pico do controle negativo, em cinza. Os aumentos foram significativos, sendo de 1.036% e 3.400% para os tratamentos com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ do **T6**, respectivamente, e de 435% para H_2O_2 quando comparado com o controle negativo.

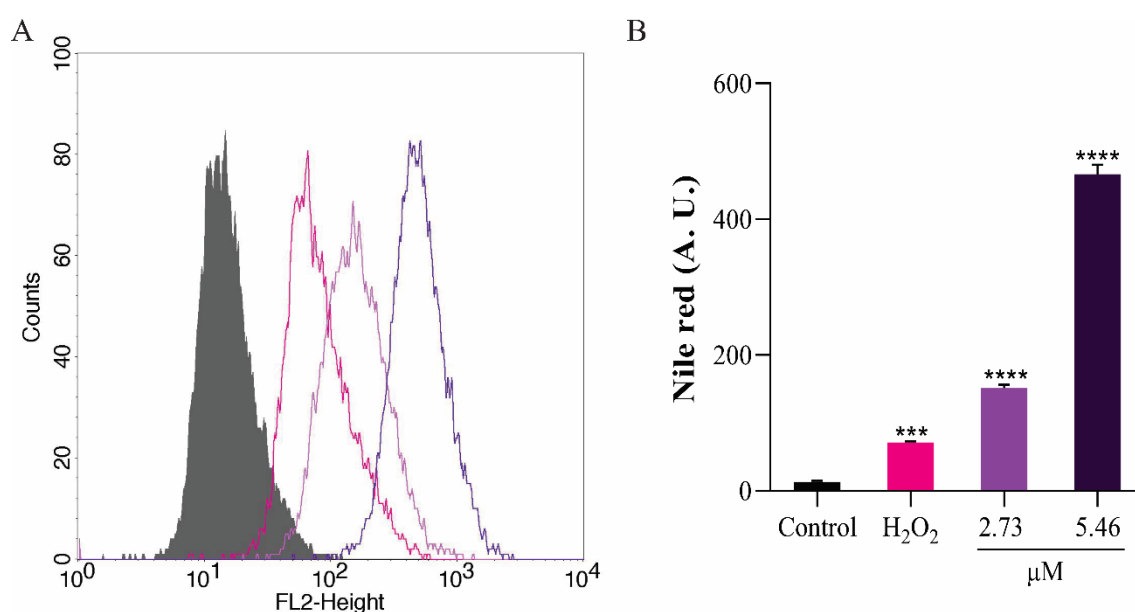


Figura 10. Determinação de formação de corpos lipídicos em células HeLa marcadas com vermelho do Nilo ($10 \mu g mL^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} ($2,73 \mu M$, em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ ($5,46 \mu M$, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. H_2O_2 ($10 mM$, em rosa) utilizado como controle positivo, tratado por 1 h. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$.

3.11. Quantificação de ATP intracelular

Houve diminuição nos níveis de ATP intracelulares quando observados através da marcação com o kit de detecção Cell Titer Glo®, como demonstrado na figura 11. A luminescência foi reduzida de forma estatisticamente significativa em 61% e 66% para os tratamentos com CI_{50} e $2 \times CI_{50}$ do **T6**, respectivamente, e de 66% para o KCN quando comparado com o controle negativo.

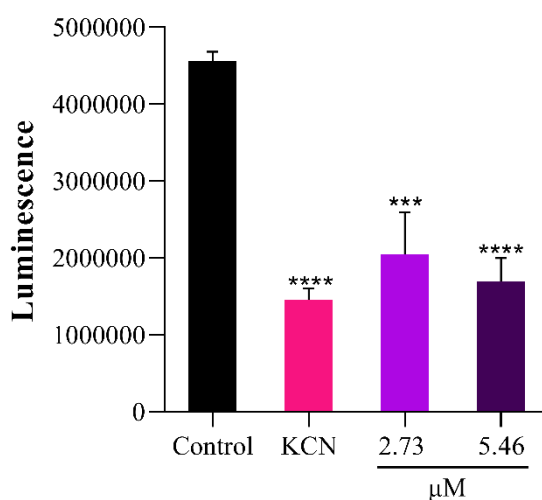


Figura 11. Quantificação de ATP intracelular em células HeLa marcadas pelo kit Cell Titer Glo® pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ (5,46 μ M, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. KCN (500 μ M, em rosa). *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$.

3.12. Determinação da exposição da fosfatidilserina

Na figura 12A, percebe-se um aumento na marcação de células positivas para anexina V-FITC (deslocamento para o quadrante superior esquerdo) e IP (deslocamento para o quadrante superior direito), indicando tanto morte por necrose quanto apoptose tardia, respectivamente. Na figura 12B é possível observar um aumento de 3.450% e 2.600% de células positivas para IP (em necrose) e um aumento de 2.800% e 1.900% de células positivas para anexina V-FITC (em apoptose) para os tratamentos com CI_{50} (em roxo) e $2 \times CI_{50}$ (em roxo escuro) do **T6**, respectivamente, e de 2.000% de células positivas para IP (em necrose) e de 1.600% de células positivas para anexina V-FITC (apoptose) com o tratamento com ActD (em rosa) quando comparado com o controle negativo.

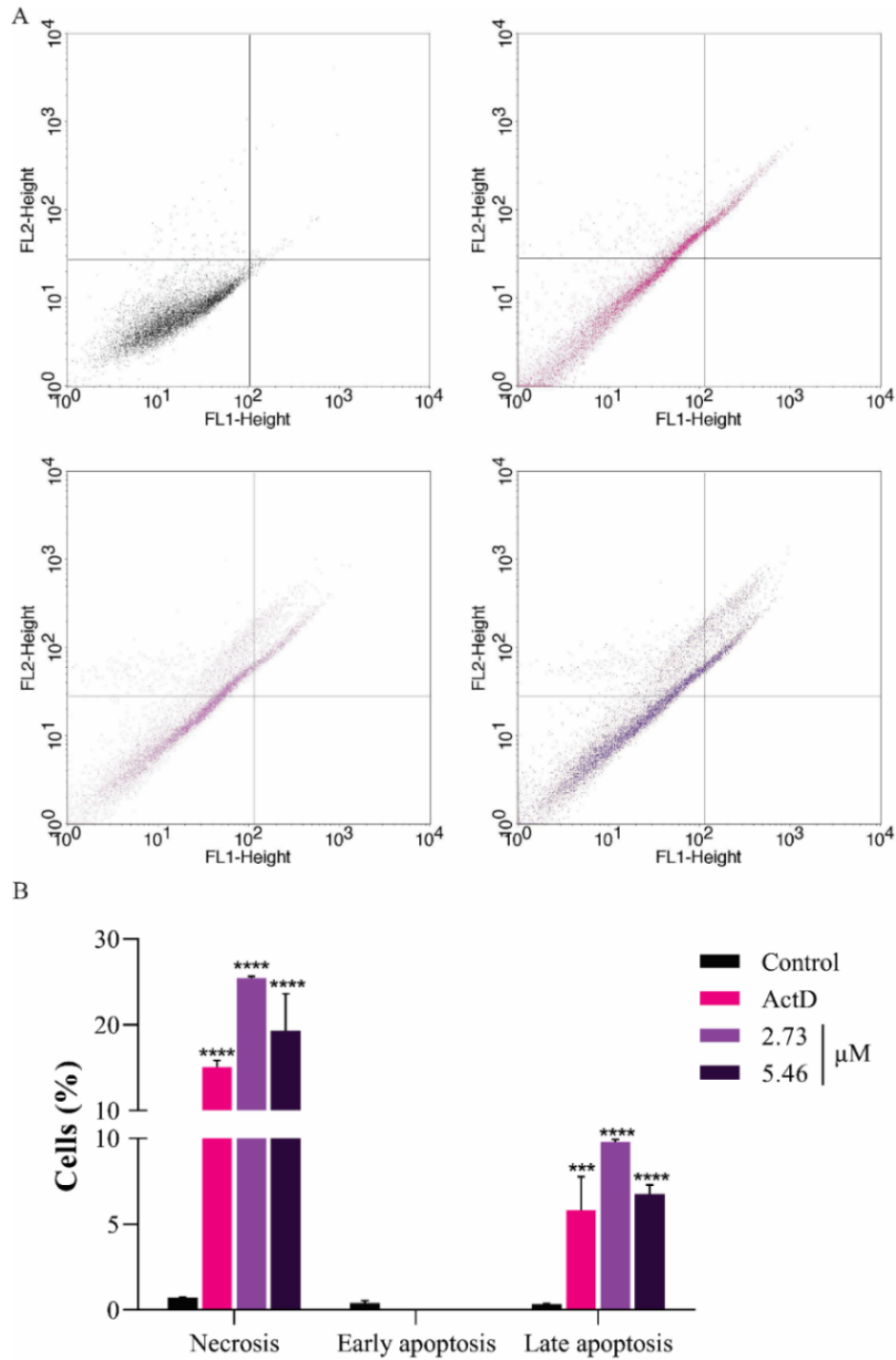


Figura 12. Determinação da exposição da fosfatidilserina e morte celular em células HeLa marcadas com anexina-V FITC e iodeto de propídio (IP, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} ($2,73 \mu\text{M}$, em roxo) ou $2 \times \text{CI}_{50}$ ($5,46 \mu\text{M}$, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Actinomicina D (ActD, $20 \mu\text{M}$, em rosa) utilizada como controle positivo. (A) dotplot obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. ***p $\leq$ 0,001 e ****p $\leq$ 0,0001.

3.13. Determinação do tamanho celular

Na figura 13 (A e B), nota-se uma diminuição significativa do tamanho celular de 44% e 48% para ambos os tratamentos com CI_{50} (curva e barra em roxo) e $2\times CI_{50}$ (curva e barra em roxo escuro) do **T6**, respectivamente, e de 40% para a ActD (curva e barra em rosa) quando comparado com o controle negativo, observado pelo deslocamento dos picos coloridos a esquerda do pico em cinza (figura 13A).

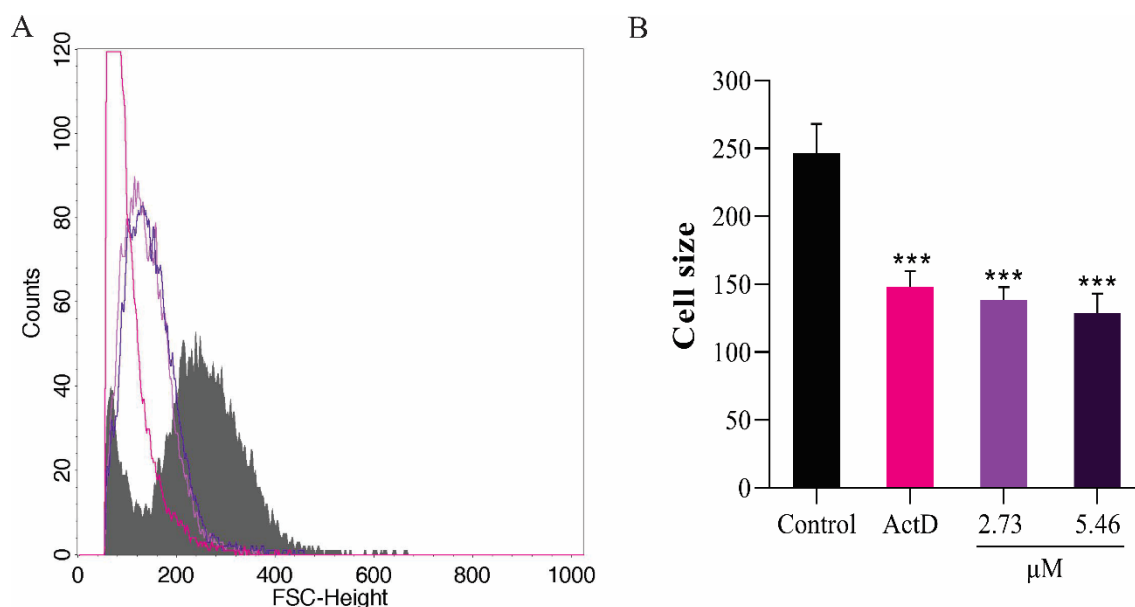


Figura 13. Determinação do tamanho celular em células HeLa pós-tratamento com CI_{50} (2,73 μ M, em roxo) ou $2\times CI_{50}$ (5,46 μ M, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Actnomicina D (ActD, 20 μ M, em rosa) utilizada como controle positivo. (A) histograma obtido em citômetro de fluxo. (B) gráfico de barras obtido com base nos cálculos realizados a partir dos resultados de citometria de fluxo. *** $p\leq 0,001$.

3.14. Determinação do ciclo celular

A partir de dados obtidos pela citometria de fluxo, a análise do ciclo celular após o tratamento com o CI_{50} (barras em roxo) e $2 \times CI_{50}$ (barras em roxo escuro) evidenciou diminuição no número de células estacionadas na fase G_0/G_1 . O Taxol (barras em rosa) causou aumento significativo de células nas fases $< G_0/G_1$ e G_2/M e diminuição na fase G_0/G_1 .

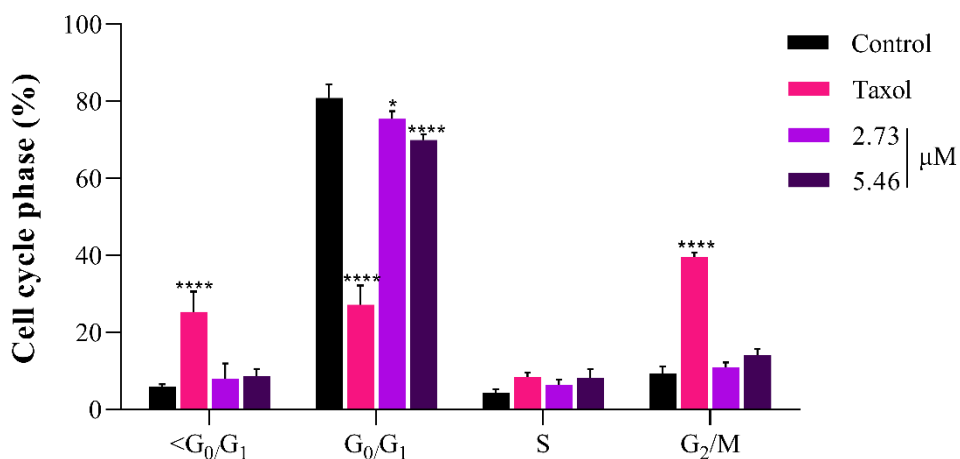


Figura 14. Determinação do ciclo celular em células HeLa marcadas com IP ($2 \mu g mL^{-1}$) pós-tratamento com CI_{50} ($2,73 \mu M$, em roxo) ou $2 \times CI_{50}$ ($5,46 \mu M$, em roxo escuro) de **T6** por 48 h. Taxol ($10 \mu M$, em rosa) utilizado como controle positivo. * $p < 0,05$ e **** $p \leq 0,0001$.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado a atividade antitumoral da substância **T6** frente a células de adenocarcinoma cervical imortalizadas pelo HPV18 (HeLa). A substância apresentou potente atividade inibitória em células HeLa e baixa toxicidade em células de queratinócitos humano (HaCat), exibindo um bom índice de seletividade. De fato, a maior afinidade do **T6** por células tumorais em comparação com células não tumorais destaca seu potencial promissor. Posteriormente, foram realizados ensaios morfológicos e bioquímicos para elucidar o mecanismo de morte causado por **T6** em células HeLa.

Análises morfológicas obtidas por MEV revelaram que o tratamento com **T6** causou danos extensos à membrana plasmática, incluindo pequenas rupturas na membrana, perda de microvilosidades e diminuição de filopódios e lamelipódios. As microvilosidades são protrusões microscópicas na superfície celular que ampliam a área de absorção de nutrientes, facilitam a adesão celular e podem contribuir para a invasividade das células cancerígenas (REN et al., 1990). Filopódios e lamelipódios são projeções do citoesqueleto responsáveis por sustentação, resistência e locomoção e desempenham um papel fundamental no aumento da motilidade e metástase das células cancerígenas (ALBLAZI; SIAR, 2015; CAJULAO; CHEN, 2021; RUIZ-LAFUENTE et al., 2021; PRATIWI et al., 2024). Essas alterações sugerem que o **T6** compromete a locomoção celular ao alterar sua morfologia invasiva, reduzindo o conteúdo de filamentos de actina e, conseqüentemente, prejudicando a motilidade e a adesão célula-célula.

Sabe-se que a proliferação e migração celular desempenham papéis fundamentais e cuidadosamente regulados em diversos processos fisiológicos normais, como a morfogênese, embriogênese, respostas imunológicas, angiogênese, reparo de tecidos, regeneração tecidual e diferenciação celular. No entanto, a migração também está ligada a vários processos patológicos, incluindo a metástase do câncer (DE LA FUENTE et al., 2020). Por essa razão, a avaliação da capacidade migratória celular é essencial no desenvolvimento de novos tratamentos antitumorais. Aqui, nós observamos que o **T6** foi capaz de inibir significativamente a migração de células HeLa, impedindo a cicatrização da ferida. Esses resultados corroboram com os observados por MEV e sugerem que o **T6** pode interferir na atividade migratória e na invasão de tecidos adjacentes pelas células tumorais.

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias, é uma técnica comumente usada para avaliar a sobrevivência e proliferação de células em condições *in vitro* (KABAKOV; GABAI, 2018). Essa metodologia é utilizada para determinar a sensibilidade à radioterapia, quimioterapia e terapias molecularmente direcionadas (BRIX et al., 2021). Nossos resultados

mostraram que o **T6** foi capaz de reduzir significativamente o número de colônias, indicando possível potencial anticâncer.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas como resultado de inúmeros processos endógenos ao organismo, como a cadeia respiratória nas mitocôndrias, células inflamatórias e os peroxissomos, e de processos exógenos ao organismo, como radiação, substâncias químicas, álcool, tabaco e agentes infecciosos. Quando em excesso, causam danos em inúmeras moléculas biológicas, uma vez que o sistema antioxidante endógeno fica sobrecarregado e não é capaz de neutralizar de forma eficiente todas as ERO produzidas (AYALA et al., 2014). São exemplos de moléculas que constituem o sistema antioxidante endógeno as enzimas catalase e superóxido dismutase, que possuem a função de neutralizar as ERO, transformando-as em moléculas menos reativas e, consequentemente, mitigando o dano que elas poderiam causar. Esse processo é conhecido como potencial redox, no qual se tem um balanço entre espécies reativas e antioxidantes, mantendo a homeostase celular (HALLIWELL, 2006; KLAUNIG, 2018; SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018; JELIC, 2021). Quando acontece um desequilíbrio no potencial redox, a quantidade de ERO supera a concentração de moléculas antioxidantes, levando a danos oxidativos irreversíveis em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, podendo induzir à oncogênese (SCHUMACKER, 2006; SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018).

T6 também causou a perda do $\Delta\Psi_m$ de células HeLa, acarretando a diminuição da produção de ATP. Esse achado está em concordância com o estudo de Alharthy et al. (2023), no qual também foi observada uma perda do $\Delta\Psi_m$. O $\Delta\Psi_m$ é fundamental para manter a função fisiológica da cadeia respiratória para a geração de ATP e, a perda significativa do $\Delta\Psi_m$ resulta no esgotamento energético da célula, levando, posteriormente, à morte celular (ZOROVA et al., 2018). Ainda, a despolarização mitocondrial induz inúmeros desequilíbrios celulares, incluindo o aumento de ERO intracelular. As células tumorais, por sua vez, não possuem um potencial redox forte o suficiente para controlar esse aumento exacerbado (KUDRYAVTSEVA et al., 2016). Níveis elevados de ERO foram observados em células HeLa tratadas com **T6**. Resultados similares também foram observados por Bukowski et al. (2023), ao avaliar uma substância derivada de pirazol.

O aumento ERO quando não homeostático, desencadeia uma série de reações que causam danos a moléculas biológicas. Um exemplo disso é a lipoperoxidação, que compromete a integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, alterando sua permeabilidade. Esse processo ocorre devido à degradação oxidativa dos lipídios por radicais livres, resultando na perda da integridade da membrana (ZANI et al., 2023). O tratamento com **T6** demonstrou

causar danos significativos, evidenciados por um aumento expressivo na lipoperoxidação e na degradação da membrana plasmática. Esses resultados indicam que o **T6** promove a degradação dos lipídios da membrana, resultando em danos severos e comprometendo sua integridade. Os resultados por MEV reforçam esses achados, revelando danos extensos à membrana plasmática nas células tratadas.

ERO e ERN são capazes de reagir com moléculas de DNA, causando desaminação do grupo amina e, conseqüentemente, levando à perda de função dessas moléculas (MURATA, 2018). Observou-se que o tratamento com **T6**, além de aumentar a produção de ERO, também resultou em um aumento significativo de ERN, sugerindo indução de estresse oxidativo e nitrosativo. Diante desse cenário de estresse oxidativo e nitrosativo e dos danos extensos causados, as células tendem a adotar mecanismos de mitigação, como o aumento na produção de corpos lipídicos – estruturas responsáveis pelo armazenamento de energia, neutralização de espécies reativas e de reserva para manutenção da membrana plasmática (KOSTECKA et al., 2021; LUO et al., 2022; LEE et al., 2024). O acúmulo de lipídios, observado em células HeLa tratadas com **T6**, foi evidenciado pelo marcador vermelho do Nilo.

O tratamento com **T6** também causou danos significativos ao ciclo celular, evidenciados por diminuição no número de células estacionadas na fase G_0/G_1 . Esse efeito provavelmente resulta do estresse oxidativo e nitrosativo demasiado, iniciando o processo de sinalização de morte celular programada, conhecida como apoptose, cuja característica marcante é a redução do tamanho celular (ELMORE, 2007; NUNEZ et al., 2010; FAROOQUI et al., 2018). Informação corroborada com os resultados obtidos por citometria de fluxo, que mostraram uma diminuição significativa no tamanho das células HeLa após o tratamento com **T6**. Contrariamente, Gimła et al. (2023) relataram em seus experimentos sobre o ciclo celular, observando que uma molécula derivada de pirazol causou a interrupção do ciclo celular na fase G_0/G_1 , destacando a diferença entre os efeitos de ambas as abordagens.

Em células saudáveis, enzimas dependentes de ATP, conhecidas como flipases, mantêm moléculas de fosfatidilserina no interior da célula. No entanto, devido aos danos causados pela perda do $\Delta\Psi_m$, alterações na membrana celular e lipoperoxidação, as fosfatidilserinas interiorizadas são expostas, podendo ser quantificadas através da ligação ao marcador anexina V-FITC e IP, permitindo a diferenciação entre células apoptóticas e necróticas (CROWLEY et al., 2016; KABAKOV; GABAI, 2018). As células tratadas com **T6** apresentaram diminuição no número de células vivas e aumento nas células apoptóticas e necróticas, reveladas pelas marcações de anexina V-FITC e IP.

Os experimentos aqui apresentados fornecem evidências de que o **T6** induziu alterações bioquímicas e morfológicas em células HeLa, resultando na perda do $\Delta\Psi_m$ e na redução dos níveis de ATP, o que causou um desbalanceamento do potencial mitocondrial. Esse desequilíbrio levou ao aumento das ERO e ERN, promovendo lipoperoxidação, perda da integridade da membrana, aumento de corpos lipídicos e diminuição na fase G₀/G₁. Como consequência, houve redução do tamanho celular, culminando na morte celular por apoptose tardia e subsequente evolução para necrose após o tratamento com **T6** (figura 15).

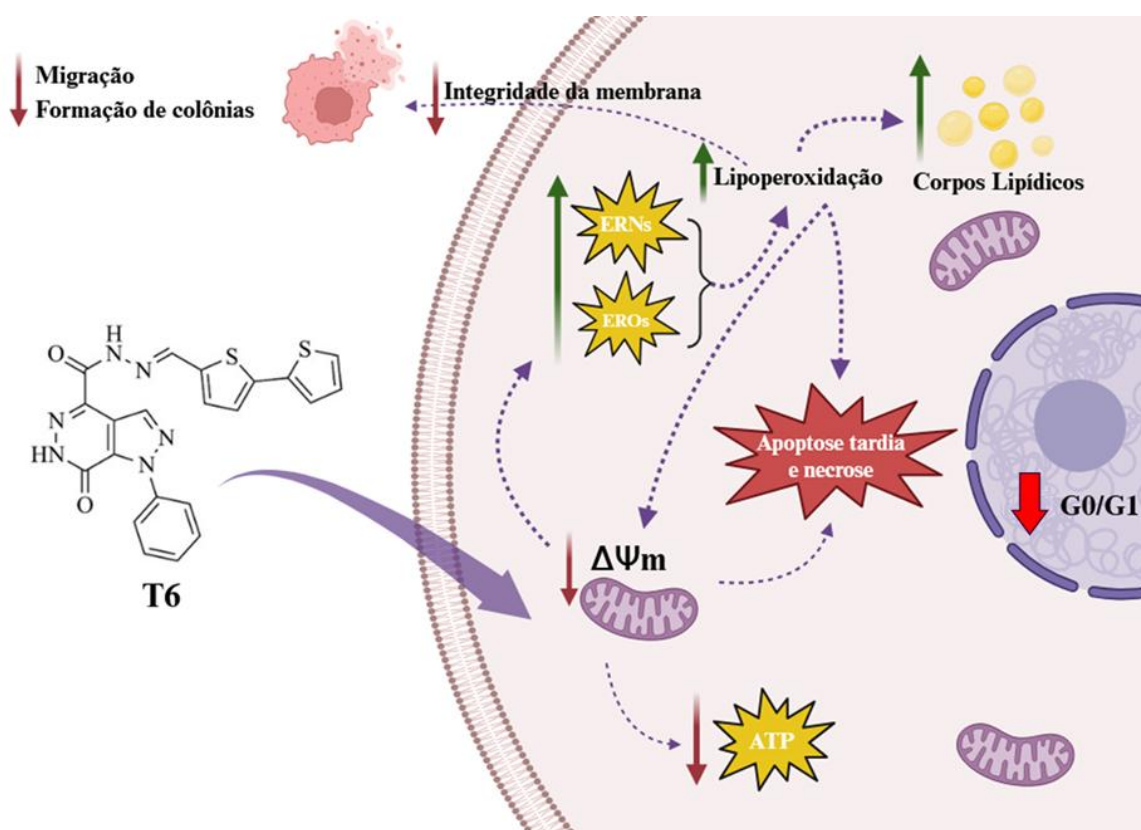


Figura 15. Figura resumo do mecanismo de ação do **T6** (setas roxas) causando perda $\Delta\Psi_m$ e diminuição de ATP, gerou aumento de ERO e ERN, consequentemente, lipoperoxidação, perda da integridade da membrana, aumento de corpos lipídicos, diminuição na fase G₀/G₁, diminuição do tamanho celular culminando na morte celular por apoptose tardia e subsequente evolução para necrose.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o composto sintético **T6** exerce potente atividade antitumoral contra células de adenocarcinoma cervical (HeLa) por meio de múltiplos mecanismos. Os danos causados pela perda de $\Delta\Psi_m$, como a diminuição da produção de ATP, aumento na produção de ERO e ERN, induziram a danos extensos na membrana plasmática, evidenciadas pelas imagens de MEV, levando a peroxidação lipídica, além de reduzir o potencial de migração celular e formação de colônias, e diminuição na população do ciclo celular em G_0G_1 , posterior morte por apoptose tardia e consequente necrose. Esses efeitos, associados ao baixo valor de CI_{50} e à baixa toxicidade em células normais, destacam o potencial de **T6** como candidato a novas quimioterapias direcionadas e seletivas, que podem reduzir efeitos colaterais em tecidos saudáveis, justificando-se assim a continuação dessa pesquisa em experimentos *in vitro* e *in vivo* para melhor avaliar a aplicabilidade clínica de **T6**.

6. REFERÊNCIAS

ALBLAZI, Kamila Mohamed Om; SIAR, Chong Huat. Cellular protrusions-lamellipodia, filopodia, invadopodia and podosomes-and their roles in progression of orofacial tumours: current understanding. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2187-2191, 2015.

ALHARTHY, Rima D. et al. Pyrazole derivatives of pyridine and naphthyridine as proapoptotic agents in cervical and breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 5370, 2023.

AMERICAN CÂNCER SOCIETY. **Risk Factors for Cervical Cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html#written_by>. Acesso em 01 de agosto de 2023.

AMR, Abd El-Galil E. et al. Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4, 5, 6, 7-tetrahydro-N-phenylbenzo [b] thiophene-3-carboxamide. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5935-5942, 2010.

AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, n. 1, p. 360438, 2014.

BRIX, Nikko et al. Analysis of clonogenic growth in vitro. **Nature protocols**, v. 16, n. 11, p. 4963-4991, 2021.

BUKOWSKI, Karol et al. Pyrazolo [4, 3-e] tetrazolo [1, 5-b][1, 2, 4] triazine sulfonamides as novel potential anticancer agents: Apoptosis, oxidative stress, and cell cycle analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8504, 2023.

BURD, Eileen M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

CAJULAO, Jan Mikhale; CHEN, Lily. *Lactobacillus rhamnosus* reduces the cytotoxic effects of group B streptococcus on HeLa cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 105271, 2021.

CHEN, Qiubing et al. Natural exosome-like nanovesicles from edible tea flowers suppress metastatic breast cancer via ROS generation and microbiota modulation. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 2, p. 907-923, 2022.

CROWLEY, Lisa C. et al. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, p. pdb.prot087288, 2016.

DE LA FUENTE, Ildefonso M.; LÓPEZ, José I. Cell motility and cancer. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2177, 2020.

DE PAULA, J. C. et al. Antiproliferative activity of the dibenzylideneacetone derivate (E)-3-ethyl-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-2-one in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 211, n. August, p. 105653, nov. 2020.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FAROOQUI, Arshi et al. Glycyrrhizin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and cell cycle arrest at G0/G1 in HPV18+ human cervical cancer HeLa cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 752-764, 2018.

GIMŁA, Mariola et al. The pyrazole derivative of usnic acid inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Cell International**, v. 23, n. 1, p. 210, 2023.

GRAHAM, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, v. 131, n. 17, p. 2201–2221, 2017.

HALLIWELL, Barry. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

JACOMINI, Andrey P. et al. Synthesis and evaluation against *Leishmania amazonensis* of novel pyrazolo [3, 4-d] pyridazinone-N-acylhydrazone-(bi) thiophene hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 340-349, 2016.

JELIC, Marija Dragan et al. Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 22-28, 2021.

JOHNSON, Cynae A. et al. Cervical cancer: an overview of pathophysiology and management. In: **Seminars in oncology nursing**. WB Saunders, 2019. p. 166-174.

KAPLUM, V. et al. Proanthocyanidin Polymer-Rich Fraction of *Stryphnodendron adstringens* Promotes *in Vitro* and *in Vivo* Cancer Cell Death via Oxidative Stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JUL, 3 jul. 2018.

KABAKOV, Alexander E.; GABAI, Vladimir L. Cell death and survival assays. **Chaperones: methods and protocols**, p. 107-127, 2018

KLAUNIG, James E. Oxidative stress and cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 40, p. 4771-4778, 2018.

KOSTECKA, Laurie G.; PIENTA, Kenneth J.; AMEND, Sarah R. Lipid droplet evolution gives insight into polyan euploid cancer cell lipid droplet functions. **Medical Oncology**, v. 38, n. 11, p. 133, 2021.

KUDRYAVTSEVA, Anna V. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 44879, 2016.

KÜÇÜKGÜZEL, Ş. Güniz; ŞENKARDEŞ, Sevil. Recent advances in bioactive pyrazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 786-815, 2015.

LEE, Hyemin et al. Cell cycle arrest induces lipid droplet formation and confers ferroptosis resistance. **Nature communications**, v. 15, n. 1, p. 79, 2024.

LUO, Wenqin et al. Adding fuel to the fire: The lipid droplet and its associated proteins in cancer progression. **International Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 16, p. 6020, 2022.

MURATA, Mariko. Inflammation and cancer. **Environmental health and preventive medicine**, v. 23, n. 1, p. 50, 2018.

NUNEZ, R. et al. Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 11, p. 1665-1671, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Câncer**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 01 de agosto de 2023.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Câncer**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_2>. Acesso em: 01 de agosto de 2023.

PRATIWI, Laras; ELISA, Elisa; SUTANTO, Henry. Probing the Protrusions: Lamellipodia and Filopodia in Cancer Invasion and Beyond. **Mechanobiology in Medicine**, p. 100064, 2024.

REN, Jin et al. Correlation between the presence of microvilli and the growth or metastatic potential of tumor cells. **Japanese journal of cancer research**, v. 81, n. 9, p. 920-926, 1990.

RUIZ-LAFUENTE, Natalia et al. The roles of Cdc42 and Rac1 in the formation of plasma membrane protrusions in cancer epithelial HeLa cells. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 5, p. 4285-4294, 2021.

SAJADIMAJD, Soraya; KHAZAEI, Mozafar. Oxidative stress and cancer: the role of Nrf2. **Current cancer drug targets**, v. 18, n. 6, p. 538-557, 2018.

SCHUMACKER, Paul T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. **Cancer cell**, v. 10, n. 3, p. 175-176, 2006.

SERRANO, B.; BROTONS, M. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 14–26, 2018.

TSIKOURAS, Panagiotis et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. **J buon**, v. 21, n. 2, p. 320-325, 2016.

WANG, J.-J.; LEI, K.-F.; HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 12, p. 3855–3864, jun. 2018.

ZANI, Aline Pinto et al. Dibenzylideneacetone induces apoptosis in cervical cancer cells through Ros-mediated mitochondrial damage. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 317, 2023.

ZHANG, Xin-Tian et al. Artematrolide A inhibited cervical cancer cell proliferation via ROS/ERK/mTOR pathway and metabolic shift. **Phytomedicine**, v. 91, p. 153707, 2021.

ZOROVA, Ljubava D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical biochemistry**, v. 552, p. 50-59, 2018.