



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VINÍCIUS FERREIRA SAMPAIO

LPS208 INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL, ACÚMULO DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS E MORTE CELULAR EM CÉLULAS SIHA DE CÂNCER CERVICAL HUMANO

Londrina – Paraná
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

VINÍCIUS FERREIRA SAMPAIO

**LPS208 INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO
MITOCONDRIAL, ACÚMULO DE GOTÍCULAS
LIPÍDICAS E MORTE CELULAR EM CÉLULAS SIHA
DE CÂNCER CERVICAL HUMANO**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador: Wander Rogério Pavanelli
Coorientador: Fabricio Seidy Ribeiro Inoue**

Londrina – Paraná

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL.

S1921 Ferreira Sampaio, Vinícius.
LPS208 INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL, ACÚMULO DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS E MORTE CELULAR EM CÉLULAS SIHA DE CÂNCER CERVICAL HUMANO / Vinícius Ferreira Sampaio - Londrina, 2025.
24 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli
Coorientador: Fabricio Seidy Ribeiro Inoue.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Tioureia - TCC. 2. Câncer Cervical - TCC. 3. Citotoxicidade - TCC. 4. Apoptose Tardia - TCC.
I. Rogério Pavanelli , Wander . II. Seidy Ribeiro Inoue, Fabricio. III. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli

Profa.Dra. Maiara Voltarelli Providello

Ma. Ellen Mayara Souza Cruz

SUPLENTE

Me. Fabricio Seidy Ribeiro Inoue

Londrina, 09 de dezembro de 2025

Dedico esse trabalho aos colegas do LIDNC e àqueles que confiam na ciência

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a minha família: aos meus pais, Vergílio Sampaio e Claudia Auxiliadora Ferreira, e à minha irmã Carolina Ferreira Sampaio que me auxiliaram durante toda a graduação, oferecendo apoio nos momentos cruciais, acreditando em mim e sempre me incentivando. Sem eles, não seria possível me tornar biólogo.

Ao Laboratório LIDNC, dirijo meus sinceros agradecimentos, em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli, que gentilmente abriu as portas de seu laboratório para mim, em agosto de 2023, depositando sua confiança no meu trabalho, oferecendo incentivo ao longo da minha graduação e proporcionando importantes aprendizados.

Aos colegas de laboratório, expresso minha gratidão, em especial ao colega de trabalho e coorientador, ao mestre Fabrício Seidy Ribeiro Inoue, pela paciência ao compartilhar seu conhecimento, pela dedicação em diversos momentos no dia a dia no laboratório, pelas sugestões, pela constante disponibilidade para ensinar e pela colaboração durante todo esse período.

Estendo meus agradecimentos aos demais membros do laboratório: à Profa. Dra. Danielle Lazarin Bidoia, à Dra. Mariana Barbosa Detoni, à mestra Ellen Mayara Souza Cruz que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste projeto.

Sinto-me profundamente grato pela influência do mestre João Manoel de Sousa Silva, cuja atuação no laboratório, durante o seu período de mestrado, foi essencial para que eu pudesse desenvolver este projeto. Agradeço, também, pela sua notável didática na transmissão de conhecimentos, pelas conversas que tivemos e pelos ensinamentos que tanto contribuíram para a minha formação.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, me apoiaram durante a realização deste trabalho.

SAMPAIO, Vinícius Ferreira. **LPS208 induz estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, acúmulo de gotículas lipídicas e morte celular em células SiHa de câncer cervical humano**. 2025. 24 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

O câncer cervical humano é uma neoplasia originada nas células que revestem o colo uterino, sendo associado pela infecção genital persistente pelo HPV, principalmente do tipo de alto risco. A quimioterapia comumente utilizada é baseada com cisplatina, pembrolizumabe, e combinações como carboplatina e paclitaxel; ou cisplatina e paclitaxel, porém, apresentam diversos efeitos colaterais as pacientes. A classe de compostos das tiouréias, apresentam atividade anticâncer, pois sabe-se que esses compostos podem inibir o crescimento de várias linhagens tumorais, porém estudos com linhagens de câncer cervical do tipo carcinoma de células escamosas são escassos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo de investigar a atividade do composto LPS208 que pertence à classe tiouréia na linhagem SiHa. Nesse contexto, as células foram tratadas com diferentes concentrações do LPS208 e avaliado a atividade metabólica por resazurina, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO); o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), presença de gotículas lipídicas e morte celular. O tratamento com LPS208 reduziu a viabilidade celular, com IC₅₀ de 54,84 μM , induziu aumento de ERO e disfunção mitocondrial nas células SiHa. A partir do ensaio de morte celular, revelou aumento predominante para a população duplo marcada (apoptose tardia), entretanto houve aumento de células PI positivas, demonstrando ativação de mecanismos de morte associados a outras vias, como necroptose e ferroptose. Esses resultados indicam que o LPS208 possui potencial como agente terapêutico contra células tumorais, e tendo este trabalho contribuído para o entendimento sobre o modo de ação desse composto para o câncer cervical.

Palavras-chave: Tioureia. Câncer Cervical. Citotoxicidade. Apoptose Tardia.

SAMPAIO, Vinícius Ferreira. **LPS208 Induces Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, Lipid Droplet Accumulation, and Cell Death in SiHa Human Cervical Cancer Cells**. 2025. 24 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

ABSTRACT

Human cervical cancer is a neoplasm originating from the epithelial cells that line the uterine cervix and is primarily associated with persistent genital infection by high-risk HPV types. Commonly used chemotherapy includes cisplatin, pembrolizumab, and combinations such as carboplatin with paclitaxel or cisplatin with paclitaxel; however, these regimens often produce significant adverse effects in patients. The class of thiourea compounds exhibits anticancer activity, as these molecules are known to inhibit the growth of several tumor cell lines; nevertheless, studies involving cervical cancer cell lines of the squamous cell carcinoma subtype remain scarce. Thus, the present study aimed to investigate the activity of the thiourea-based compound LPS208 in the SiHa cell line. In this context, the cells were treated with different concentrations of LPS208, and metabolic activity was assessed using resazurin, followed by evaluation of reactive oxygen species (ROS) generation, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), presence of lipid droplets, and cell death. Treatment with LPS208 reduced cell viability, with an IC_{50} of 54.84 μM , and induced increased ROS production and mitochondrial dysfunction in SiHa cells. The cell death assay revealed a predominant increase in double-positive cells (late apoptosis); however, an increase in PI-positive cells was also observed, indicating activation of death mechanisms associated with additional pathways such as necroptosis and ferroptosis. These results indicate that LPS208 has potential as a therapeutic agent against tumor cells and contribute to a deeper understanding of its mechanism of action in cervical cancer.

Keywords: Thiourea. Cervical Cancer. Cytotoxicity. Late Apoptosis.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Câncer: desafios e generalidades.....	3
2.2. Câncer cervical: Epidemiologia.....	4
2.3. Câncer cervical: Patogenia e fisiopatologia.....	6
2.4. Câncer cervical: tratamentos.....	8
2.5. Tioureias.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Composto utilizado.....	12
3.2. Linhagem celular e condições de cultura.....	12
3.3. Avaliação da atividade metabólica por ensaio de resazurina.....	12
3.4.1. Citometria de fluxo.....	13
3.4.2. Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	13
3.4.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_M$).....	13
3.4.4. Ensaio de Vermelho de Nilo.....	13
3.4.5. Ensaio por apoptose.....	14
3.5. Análise Estatística.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. LPS208 promoveu a redução na atividade metabólica.....	15
4.2. LPS208 promoveu a produção de ERO, a disfunção mitocondrial e gotículas lipídicas.....	15
4.3. O tratamento com LPS208 induz morte celular.....	18
5. CONCLUSÕES	19
REFERÊNCIAS	20

1

2 1. INTRODUÇÃO

3 O câncer do colo de útero ocorre principalmente pela infecção genital
4 persistente por subtipos de papilomavírus humano (HPV) de alto risco, como o HPV
5 16 e 18. Estima-se um aumento significativo de 570.000 em 2018 para 700.000 novos
6 casos em 2030, e um aumento no número de mortes de 311.000 para 400.000 no
7 mesmo período (2018 a 2030). Dentre os diferentes tipos de câncer cervical,
8 destacam-se o carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o carcinoma
9 adenoescamoso, sendo os dois primeiros tipos mais frequentes, porém o carcinoma
10 adenoescamoso possui comportamento mais agressivo e pior prognóstico, além de
11 ser mais quimiorresistente dentre os três. Apesar de existir terapias disponíveis, como
12 a quimioterapia, a base de cisplatina, pembrolizumabe, combinações como
13 carboplatina e paclitaxel ou cisplatina e paclitaxel, essas drogas apresentam diversos
14 efeitos colaterais devido à alta toxicidade que apresentam, sendo assim, novas
15 pesquisas precisam ser realizadas para desenvolver novos quimioterápicos para
16 auxiliar pacientes que são acometidas por essa doença.

17 Na busca por novos compostos com potencial antitumoral, prioriza-se
18 aqueles que apresentam maior seletividade para células tumorais e menores efeitos
19 adversos. O grupo das tioureias é uma classe de compostos sintéticos orgânicos
20 caracterizado por ter uma estrutura semelhante à ureia, com o enxofre substituindo o
21 átomo de oxigênio. Seus derivados têm se mostrado promissores por apresentarem
22 diversas aplicações biológicas, porém estudos em modelo *in vitro* com células
23 tumorais de câncer cervical do tipo carcinoma de células escamosas ainda são
24 escassos.

1 Diante do problema apresentado, o objetivo geral deste projeto foi
2 avaliar os efeitos citotóxicos do tratamento do composto LPS208, que pertence à
3 classe das tiouréias e seus mecanismos de ação em linhagens de câncer cervical do
4 tipo carcinoma de células escamosas, SiHa; cujos objetivos específicos destacam-se:
5 a avaliação dos efeitos do LPS208 na atividade metabólica celular por meio do ensaio
6 de resazurina e determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀); analisar a atividade
7 do potencial de membrana mitocondrial das linhagens celulares; mensurar a geração
8 de espécies reativas de oxigênio (ERO), avaliar morte celular após tratamento com o
9 composto nas concentrações escolhidas; e por fim, quantificar a biossíntese de
10 gotículas lipídicas e vacúolos autofágicos após os tratamentos determinados.

1

2 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

3 **2.1 CÂNCER: DESAFIOS E GENERALIDADES**

4 Câncer ou neoplasia maligna, em sua definição clássica, é um grupo
5 de doenças complexas, que, na maioria dos casos é genética, no qual células
6 anormais ou danificadas do corpo crescem e se multiplicam descontroladamente e se
7 espalham para outras partes do corpo (National Cancer Institute, 2021). Esse conjunto
8 de doenças apresentam uma série de características comuns entre si, nos quais se
9 destacam por adotar características funcionais como a sua sustentação a sinalização
10 proliferativa; atenuam supressores de crescimento; resistem a morte celular; permitem
11 a sua imortalidade replicativa; induzem ou acessam a vasculatura (angiogênese);
12 promovem a ativação e o potencial migratório a tecidos adjacentes (metástase),
13 evasão ao sistema imunológico; instabilidade e mutação genéticas; a alta capacidade
14 de plasticidade fenotípica; reprogramação epigenética; promovem inflamação
15 promotora do tumor e a senescência (Hanahan, 2022).

16 Devido ao complexo panorama da plasticidade das células tumorais
17 em relação às células normais, isso as conferem resistência aos medicamentos, onde
18 essas células se tornam tolerantes ao tratamento, piorando assim as condições dos
19 pacientes e à progressão da doença, o que leva um dos aspectos desafiadores do
20 enfrentamento à doença, pois há fatores intrínsecos que contribuem para a resistência
21 aos medicamentos, tais como mutações genéticas preexistentes e heterogeneidade
22 tumoral, o que permitem que algumas células sobrevivam, e com o tempo, essas
23 subpopulações resistentes podem se expandir, levando à falha do tratamento. Além
24 disso, o fator da ativação de vias oncogênicas e de sobrevivência em células
25 cancerosas pode modificar os alvos terapêuticos, reduzir a sensibilidade aos fármacos

1 e aprimorar mecanismos de reparo do DNA, permitindo a evasão dos efeitos
2 citotóxicos. Esses processos, associados a alterações epigenéticas e à resistência
3 mediada por organelas, contribuem para a resistência ao tratamento (Sameer Ullah
4 Khan et al., 2024). Somado a isso, a influência do microambiente tumoral (MAT) é
5 crucial, pois, inclui fatores como hipóxia, matriz extracelular, fatores de crescimento,
6 citocinas e células imunes, o que influencia profundamente a plasticidade das células
7 cancerosas e a resistência aos medicamentos (Gh Rassol Bhat et al., 2024).

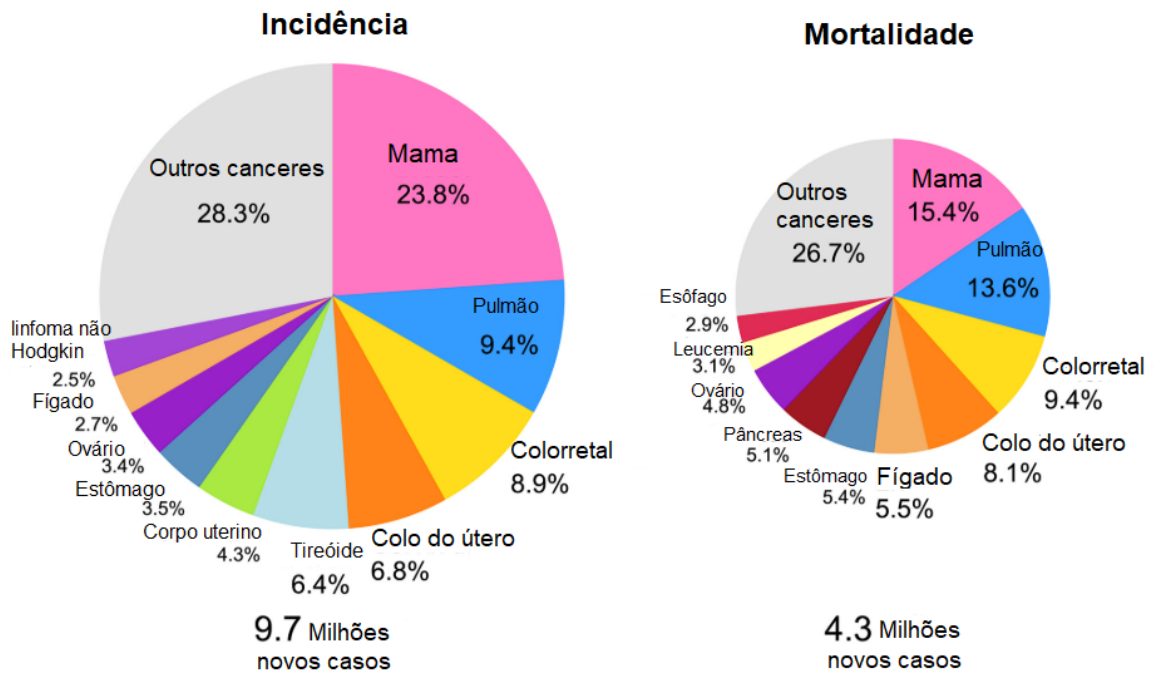
8 Devido a heterogeneidade e a complexidade da doença, há desafios
9 significativos para que os compostos possam atingir uniformemente todas as células
10 dentro de um tumor sólido, visto que há a possibilidade de regeneração, o que acaba
11 por comprometer a eficiência de um medicamento durante o tratamento (Fu et al.,
12 2025). Nesse contexto, cresce o interesse pelos modelos *in vitro* que possam
13 mimetizar o MAT, de modo a identificar o melhor desempenho a terapias antitumorais.

14 **2.2 CÂNCER CERVICAL: EPIDEMIOLOGIA**

15 Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2021, as
16 principais causas de morte global foram doenças não transmissíveis: doenças
17 cardiovasculares, como doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral
18 (AVC), sendo o câncer a segunda causa de morte em todo o mundo. Em 2020, o
19 câncer foi responsável por cerca de 10 milhões de mortes no mundo, o que
20 corresponde a aproximadamente 1 em cada 6 mortes.

21 De acordo com os dados mais recentes do Global Cancer Observatory
22 (GLOBOCAN) âmbito nacional, em 2022, mais de 18 mil novos casos e
23 aproximadamente 10 mil mortes ocasionadas pelo câncer do colo de útero. É
24 classificado como o quarto câncer mais comum em termos de incidência e mortalidade
25 entre mulheres em todo o mundo (BRAY et al., 2024). Para o triênio de 2023-2025,

1 estima-se que haja 17 mil novos casos no Brasil, o que representa uma taxa bruta de
 2 incidência de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022). Em relação à taxa
 3 de mortalidade ajustada pela população mundial foi de 4,51 óbitos/100 mil mulheres,
 4 em 2021 (INCA, 2023).



5

6

7 **Fonte:** Adaptado de BRAY et al., 2024

8

9

10

11

12

13

14

15

No Brasil, o país apresenta taxas de mortalidade e incidência do
 câncer cervical com disparidades significativas em suas regiões geográficas e estados
 individuais, sendo notavelmente maior nas regiões Norte e Nordeste, sendo essas
 caracterizadas por perfis socioeconômicos mais baixos, acesso limitado aos serviços
 de saúde e menor escolaridade, fatores que contribuem para o aumento da
 prevalência da doença; e particularmente a região Nordeste, falta de acesso a
 instalações adequadas, recursos diagnósticos e profissionais qualificados em áreas
 menos desenvolvidas, contribuem para piores prognósticos e menores taxas de

1 sobrevivência (EVELIN et al., 2025). Já em contrapartida, a região Sudeste possui as
2 menores taxas médias de mortalidade, com 10,53 mortes por 100.000 mulheres em
3 São Paulo, seguida por Minas Gerais, com 11,22. A região Sul também apresenta
4 reduzidas taxas de mortalidade, semelhantes às do Sudeste. O fator que permitiu a
5 redução no risco de morte nas regiões Sul e Sudeste foi a implementação de um
6 programa nacional de rastreamento e em coortes a partir da década de 1960 com
7 expansão da cobertura do exame citopatológico (Papanicolau) e o aumento dos
8 centros de tratamento de câncer (Meira et al., 2022).

9 Um fator que promoveu redução significativa na incidência de câncer
10 cervical globalmente foi a vacinação contra a HPV. Mais de 100 países em todo o
11 mundo incorporaram a vacinação profilática, com destaque a Inglaterra, que
12 demonstrou redução do câncer cervical e da incidência de neoplasia intraepitelial
13 cervical de grau 3 (CIN3) por meio de seu programa nacional de vacinação contra o
14 HPV, iniciado em 2008 e em meados de 2020, foi estimado que seria prevenido
15 aproximadamente 687 cânceres cervicais e 23.192 de CIN3 (Falcaro et al., 2024).

16 A alta eficácia observada, especificamente de julho de 2019 a junho
17 de 2020 e a sua redução foi notável em mulheres que receberam vacinação de rotina
18 entre 12 e 13 anos, com uma redução estimada de 83,9% no câncer cervical e uma
19 redução de 94,3% na incidência de CIN3 em comparação com coortes não vacinadas
20 (Falcaro et al., 2024). A partir dessa medida preventiva, projeta-se que a vacinação
21 somente para meninas reduza a incidência média de câncer cervical padronizado por
22 idade em países de baixa e média renda, sendo estimada em 19,8 casos por 100.000
23 mulheres/ano para 2,1 casos por 100.000 mulheres/ano no próximo século,
24 representando uma redução de 89,4%, e prevê-se que irá evitar 61 milhões de casos
25 de câncer cervical e quando combinado com o rastreamento duas vezes ao longo da

1 vida, o número total de casos evitados aumenta para cerca de 74,1 milhões em 2120
2 (Brisson et al., 2020).

3 **2.3 CÂNCER CERVICAL: PATOGENIA E FISIOPATOLOGIA**

4 Em relação ao câncer cervical, destacam-se 3 subtipos principais:
5 carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso. O
6 subtipo mais raro é o carcinoma adenoescamoso, com uma taxa de incidência inferior
7 a 6 casos por 100.000 indivíduos e costuma ter prognóstico pior em comparação com
8 outros subtipos (Yordanov et al., 2021). Já o subtipo histológico dominante é o
9 carcinoma de células escamosas, responsável pelos 82,72% de todos os casos de
10 câncer cervical globalmente, enquanto o adenocarcinoma representa
11 aproximadamente 12,18% e geralmente com pior prognóstico (Wang et al., 2024).

12 O HPV é o responsável por aproximadamente 90% dos cânceres
13 cervicais, e são classificados como HPV de alto ou baixo risco. Os HPV de baixo risco
14 estão frequentemente associados a infecções transitórias, nos quais provocam sinais
15 como verrugas genitais e lesões benignas, além de se integrarem ao DNA raramente;
16 causam baixo dano celular e possuem baixo efeito oncogênico. Já os subtipos de alto
17 risco oncogênico, representado pelos HPV-16 e HPV-18, são considerados como os
18 principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical devido a infecção
19 viral persistente (Silva et al., 2023). Além disso, vários fatores têm sido associados a
20 um risco aumentado de persistência e progressão do HPV, como a imunossupressão
21 (particularmente devido ao vírus da imunodeficiência humana), multiparidade,
22 tabagismo e uso de anticoncepcionais orais (Höhn et al., 2021).

23 O mecanismo molecular sugere o fato de que o DNA do HPV se
24 integra ao genoma do hospedeiro, levando a síntese das oncoproteínas virais E6 e E7
25 que interferem na interrupção e degradação de proteínas supressoras de tumor, a p53

1 e a retinoblastoma (Rb). A partir da degradação da p53 resulta na inibição da apoptose
2 e conseqüentemente no aumento de mutações genéticas, enquanto a degradação de
3 Rb leva, conseqüentemente, à divisão celular descontrolada e à proliferação celular.
4 Da mesma forma, E6 e E7 afetam outras vias celulares, incluindo o suporte à
5 instabilidade genômica, a angiogênese e a organização da evasão do sistema
6 imunológico. É a partir dessas mudanças ocorridas nas células epiteliais, que ocorre
7 a transformação de células normais em malignas, levando ao desenvolvimento do
8 câncer cervical (Nelson; Mirabello, 2023).

9 Outro fato há de se destacar que mais de 70% dos carcinomas de
10 células escamosas apresentam alterações genômicas em uma ou ambas as vias de
11 sinalização PI3K/MAPK, embora essas vias de geralmente exibem exclusividade
12 mútua em suas alterações genômicas, o que significa que tendem a ocorrer de forma
13 independente, e TGF- β e genes como ERBB3 (HER3), CASP8, HLA-A, SHKBP1 e
14 TGFBR2 foram relatados como significativamente mutados (“Integrated genomic and
15 molecular characterization of cervical cancer”, 2017).

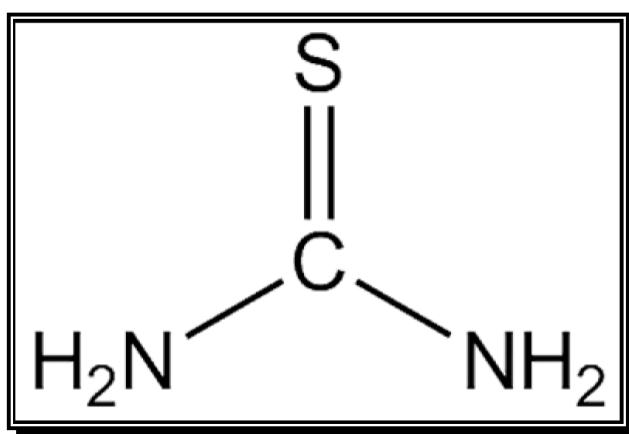
16 **2.4 CÂNCER CERVICAL: TRATAMENTOS**

17 Em relação aos tratamentos mais empregados para as pacientes
18 acometidas pelo câncer cervical, em estágios iniciais, o tratamento primário envolve
19 cirurgia ou radioterapia. Quando se trata de câncer cervical localmente avançado, a
20 quimiorradioterapia continua sendo a abordagem convencional. Já para câncer
21 cervical recidiva ou metastático, a incorporação da imunoterapia combinada com
22 quimioterapia como tratamento de primeira linha e como monoterapia na segunda
23 linha após a quimioterapia e especificamente, na quimioterapia, opções comumente
24 mais aplicadas é a base de platina com pembrolizumabe, mas também combinações
25 como carboplatina e paclitaxel; ou cisplatina e paclitaxel (Manso et al., 2024). Embora

1 os quimioterápicos sejam opções viáveis para o tratamento, eles apresentam alta
2 toxicidade, o que torna um notável problema, dentre os quais se destacam,
3 principalmente, a insuficiência renal, fístula gastrointestinal ou geniturinária; azotemia,
4 hipertensão e proteinúria (Kim et al., 2025; Manso et al., 2024).

5 2.5 TIOURÉIAS

6 A tiouréia e seus derivados se refere a uma classe de compostos que
7 é utilizada em muitos produtos comerciais, como filmes fotográficos, corantes,
8 elastômeros, plásticos e têxteis, porém têm atraído atenção com foco em seu
9 potencial como agentes terapêuticos e por suas diversas aplicações biológicas,
10 incluindo propriedades antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas, anti-
11 inflamatórias, anti-Alzheimer, antituberculose e antimaláricas. Trata-se de um
12 composto organossulfurado com fórmula química $SC(NH_2)_2$, e sendo semelhante à
13 da ureia ($H_2N-C(=O)-NH_2$), sendo o átomo de oxigênio que é substituído por um
14 átomo de enxofre, indicado pelo prefixo “tio-” e o termo “tioureia” se refere a um grupo
15 de compostos com a fórmula $(R_1 R_2 N) (R_3 R_4 N) C=S$ (AGILI, 2024).



16

17 **Fonte:** Adaptado de AGILI, 2024

18 O composto LPS208, sintetizado e cedido pela Prof.^a Dr.^a Marcelle de
19 Lima Ferreira Bispo, do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais (LaSMMED),

1 em sua estrutura molecular é derivado do ácido cinâmico, cujos constituintes são de
2 anel de benzeno, a presença de dupla ligação. Até o momento, não há estudos
3 publicados sobre essa molécula ou com o composto LPS208 em ensaios *in vitro* ou *in*
4 *vivo* com foco em atividade antineoplásica, porém, sabe-se que derivados de tioureia
5 atuam como agentes anticâncer, interferindo na montagem dos microtúbulos, o que
6 pode levar à parada mitótica e morte celular; além disso, podem inibir a proliferação
7 da linhagem celular de melanoma B16F10 ao bloquear a via de sinalização RAS-MEK-
8 ERK. As estruturas químicas de tioureia estão presentes em medicamentos para
9 câncer de próstata aprovados pela agência norte americana Food and Drug
10 Administration (FDA), como enzalutamida e apalutamida, que fortalecem as
11 propriedades antagonistas do receptor de andrógeno (Kirishnamaline et al., 2021).

12 Derivados com presença da estrutura química de benzodioxol
13 presente em tioureia, também demonstraram atividade antineoplásica significativa,
14 superando à eficácia dos medicamentos quimioterápicos padrões, como a
15 doxorrubicina. Seus efeitos citotóxicos foram avaliados em várias linhagens tumorais,
16 incluindo carcinoma de cólon (HCT116), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e
17 câncer de mama (MCF-7). Sua atividade ocorreu de forma seletiva ao não apresentar
18 citotoxicidade em linhagens celulares normais WI-38. Esses derivados da tioureia
19 agem através da inibição do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que
20 está envolvido no desenvolvimento de muitos tumores sólidos, tornando sua inibição
21 uma estratégia chave na terapia anticâncer. Além disso, induziu apoptose intrínseca
22 em células HepG2, com o aumento dos níveis de Bax e redução de Bcl2. Também
23 afetou o ciclo celular, levando à parada das células cancerosas na fase Pré-G1 e
24 induziram a apoptose na fase G2/M. Com os estudos de docking molecular em
25 tioureias derivadas do benzodioxol, confirmaram que se ligam ao sítio de ligação de

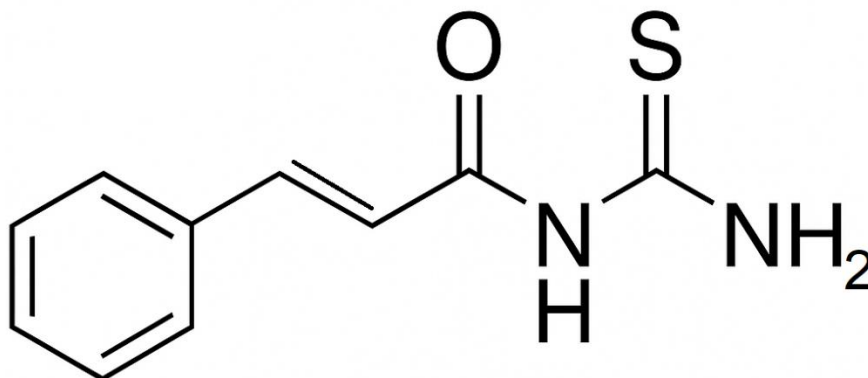
- 1 ATP do EGFR, semelhantes ao conhecido inibidor de EGFR erlotinib, além de
- 2 formarem ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com resíduos-chave no
- 3 sítio ativo do EGFR, sugerindo um modo de ligação semelhante ao erlotinibe (Aabbas;
- 4 Al-Harbi; Sh El-Sharief, 2020).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMPOSTO UTILIZADO

O composto LPS208, MM=206,05 g.mol⁻¹, foi produzido e cedido pela Prof.^a Dr.^a Marcelle de Lima Ferreira Bispo do Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais. Fez-se uma diluição a uma solução estoque do LPS208 dissolvendo-o em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100 nM e armazenada a -20°C. Para solubilização a meio aquoso foi utilizado a uma concentração final de 0,1% de DMSO.

Figura 1 – Estrutura química do LPS208



Fonte: O próprio autor

3.2 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

A linhagem celular de carcinoma de células escamosas, SiHa, livre de micoplasma, foi adquirida pela ATCC (American Type Culture Collection). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm², no qual foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose (Lifetechnologies, 14 Carlsbad, CA, EUA), suplementados com 10% de soro bovino fetal (Gibco), penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EUA) e incubadas em estufa, mantidas em uma atmosfera controlada a 37°C em CO₂ a 5%.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA POR ENSAIO DE RESAZURINA

As células foram semeadas (1×10^4) em placas de 96 poços e incubadas a 37°C , 5% CO_2 por 24 horas para estabilização da cultura. No dia seguinte, as células foram tratadas com LSP208 (10, 25, 50, 75, 100 e 150 μM) por 48 horas. O controle veículo foi preparado a uma solução de DMSO e meio de cultura celular. Após o tratamento, as placas foram lavadas com solução de PBS com 100 μL por poço, e posteriormente, o metabolismo celular foi avaliado através do sal de resazurina por 2 horas. A quantificação do metabolismo de resazurina foi realizada através do fluorímetro de leitor de microplacas multimodal de absorvância, GloMax® Explorer em EX: 520 nm e EM: 580-640 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata, com três experimentos independentes. Em seguida, foi calculada a concentração inibitória de 50% (IC_{50}).

3.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Para a realização dos mecanismos de ação, as células SiHa foram semeadas em 5×10^5 em placas de 6 poços. Para isso, as amostras após tratadas por 48h com LPS208 e marcadas com os respectivos reagentes. Posteriormente, foram lavadas três vezes com a solução de PBS e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4%. As análises foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) a 10.000 eventos.

3.4.1 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Para a quantificação de ERO, foi utilizado como controle positivo o peróxido (H_2O_2) diluído ao DMEM de alta glicose, livre de soro fetal, com concentração final de 100 μM . Após o tratamento com LPS208, as células foram coletadas e marcadas com a solução de 50 μM da sonda de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

1 (H₂DCFDA) (EX: 488 nm, EM: 530 nm) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

2 **3.4.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)**

3 A análise do $\Delta\Psi_m$, foi utilizado como controle positivo o Cianeto de
4 carbonila *m*-clorofenil hidrazona (CCCP) e após o tratamento do LPS208, as células
5 foram coletadas e marcadas com tetrametilrodamina-etil éster (TMRE) (EX: 488 nm,
6 EM: 580 nm) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 25 nM e incubadas por 30 min.

7 **3.4.3 ENSAIO DE VERMELHO DO NILO**

8 Para quantificação de gotículas lipídicas no citoplasma, as células
9 foram coletadas e marcadas com vermelho do Nilo (1 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma Aldrich, St. Louis,
10 MO, EUA) por 30 min de incubação na ausência de luz. Para o controle positivo foi
11 utilizado o H₂O₂.

12 **3.4.4 ENSAIO POR APOPTOSE**

13 Para análise de morte celular, após o tratamento, as células foram
14 coletadas e a suspensão celular foi centrifugada a 5000 rpm por 2 minutos e o pellet
15 celular ressuspenso em 100 μL de tampão de ligação contendo Anexina V e Iodeto de
16 propídeo (PI) (Millipore, Billerica, MA, EUA) por 20 min no escuro.

17 **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

18 Os dados numéricos foram analisados ao teste Shapiro-Wilk, a fim de
19 verificar a normalidade. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de
20 variância (one-way ANOVA), seguidos pelo teste Tukey para comparações múltiplas.
21 Além disso, foi realizada a análise de variância (two-way ANOVA). Foi utilizado o
22 GraphPadPrism 8 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).
23 Os dados foram expressos como média \pm EPM e serão consideradas diferenças
24 significativas quando o valor de $p < 0,05$. Os valores também serão categorizados por:

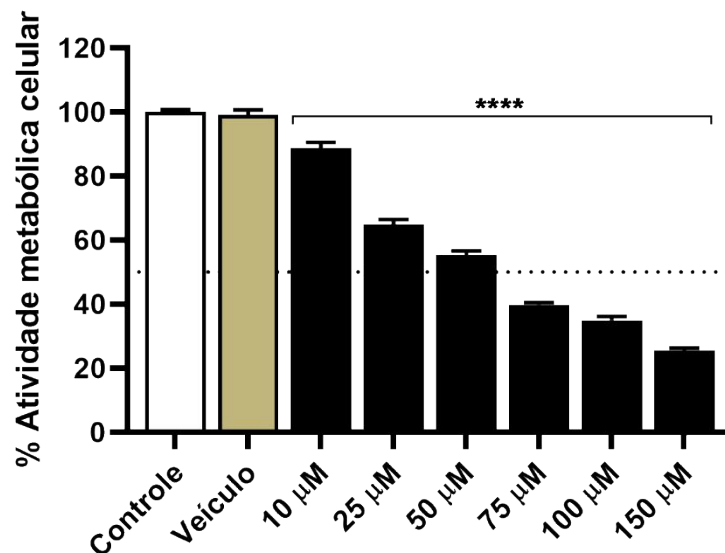
1 * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 LPS208 PROMOVEU A REDUÇÃO NA ATIVIDADE METABÓLICA

Para elucidar os efeitos do LPS208 em linhagens de câncer cervical, a linhagem SiHa foi tratada com LPS208 por 48 h. As células tratadas apresentaram redução da atividade metabólica em todas as concentrações testadas (Figura 1). Foi observado redução da atividade metabólica para 88,62% ($\pm 1,60$), 64,91% ($\pm 1,52$), 55,21% ($\pm 1,44$), 39,77% ($\pm 0,71$), 34,91% ($\pm 1,28$) e 25,40% ($\pm 0,89$) ($p < 0,0001$) nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 150 μM , respectivamente. Em seguida, foi calculado o valor de IC_{50} , onde obteve-se o valor de 54,56 μM .

Figura 1 – Análise da atividade metabólica em células SiHa após 48 horas de tratamento com LPS208. Gráfico percentual de atividade metabólica da linhagem SiHa após 48 h de tratamento com LPS208. Os dados foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) e foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). ****($p < 0,0001$).



15

16

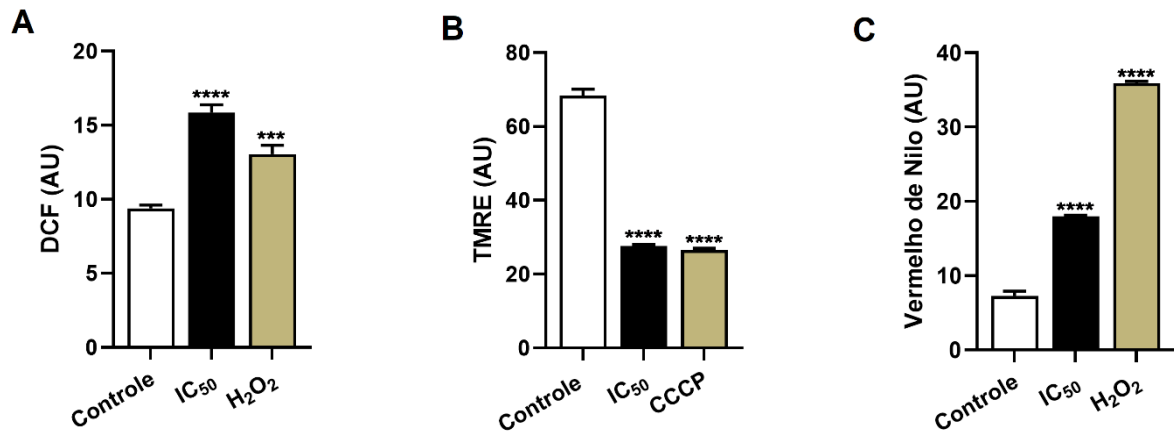
4.2 LPS208 PROMOVEU A PRODUÇÃO DE ERO, A DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E GOTÍCULAS LIPÍDICAS

Para compreender os mecanismos pelos quais o tratamento com LPS208 exerce seu efeito citotóxico nas células de carcinoma de células escamosas (SiHa), foi avaliado a produção de ERO, o potencial da membrana mitocondrial e a formação de corpúsculos lipídicos (Figura 2). A medição da produção total de ERO induzida por LPS208 foi avaliada pela sonda H₂DCFDA. Os níveis de ERO aumentaram de 9,389 (\pm 0,220) para 15,86 (\pm 0,520) em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) em células SiHa ($p < 0,0001$) após o tratamento com o LPS208 (IC₅₀).

Em seguida, foi avaliado os efeitos do LPS208 no potencial da membrana mitocondrial a partir da coloração com TMRE. Observou-se uma despolarização significativa da membrana mitocondrial na linhagem SiHa, com uma diminuição acentuada na fluorescência do TMRE: de 68,38 (\pm 1,73) para 27,65 (\pm 0,397) AUF ($p < 0,001$).

Considerando o aumento de níveis totais de ERO intracelular e as alterações mitocondriais induzidas pelo tratamento com LPS208, foi avaliado as gotículas lipídicas por meio de procedimento de coloração de vermelho do Nilo. Um aumento na fluorescência nas células SiHa foi detectado nos grupos tratados com LPS208 de 7,27 (\pm 0,645) para 17,99 (\pm 0,179) AUF ($p < 0,0001$).

1 **Figura 2 – LPS208 induziu a produção de ERO, despolarização mitocondrial em células SiHa e**
 2 **acúmulo de corpúsculos lipídicos. (A)** O aumento da fluorescência indica elevação na produção
 3 intracelular de ERO induzido pelo composto LPS208. **(B)** A redução da fluorescência de TMRE
 4 demonstra despolarização mitocondrial decorrente do tratamento com LPS208. **(C)** O aumento da
 5 fluorescência de Vermelho de Nilo demonstra o acúmulo de gotículas lipídicas.



6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

É sabido que as ERO são moléculas altamente reativas e de meia

vida curta, as quais interagem com constituintes celulares, como lipídios, proteínas e

ácidos nucleicos. As mitocôndrias são sensíveis ao aumento de ERO, uma vez que a

geração destas espécies desencadeia danos oxidativos nesta organela, levando a

perda do $\Delta\Psi_m$ e causando sua disfunção, o que, por sua vez, as células podem alterar

suas vias metabólicas, podendo, por exemplo, aumentar potencialmente a produção

de lipídios para suprimir a alta demanda de energia essas respostas celulares

adaptativas ou não adaptativas. (Arfin et al., 2021; Zorov; Juhaszova; SollottT, 2014).

Devido à alta demanda energética presente em células tumorais, a

produção e o acúmulo de gotículas lipídicas são resultado de sua flexibilidade

metabólica, que está envolvido com o processo adaptativo de sobrevivência tumoral

a condições hostis (Safi; Menédez; Pol, 2024). Os processos envolvidos presentes

são: manutenção de membranas celulares, prevenção da peroxidação lipídica e da

lipotoxicidade (Kowalczyk et al., 2021). Isso envolve um esforço coordenado de

1 aumento da síntese e absorção de lipídios, redução da degradação lipídica e
2 respostas específicas a condições de estresse.

3 Devido a essas circunstâncias descritas, isso pode induzir a ativação
4 de vias de morte celular, como apoptose clássica por meio de caspases e liberação
5 de sinais apoptóticos, como citocromo c, necrose secundária e formas oxidativas de
6 morte, como ferroptose (An et al., 2024).

7 Para testar essa hipótese, foi realizado o ensaio de caracterização de
8 morte celular.

9 **4.3 O TRATAMENTO COM LPS208 INDUZ MORTE CELULAR**

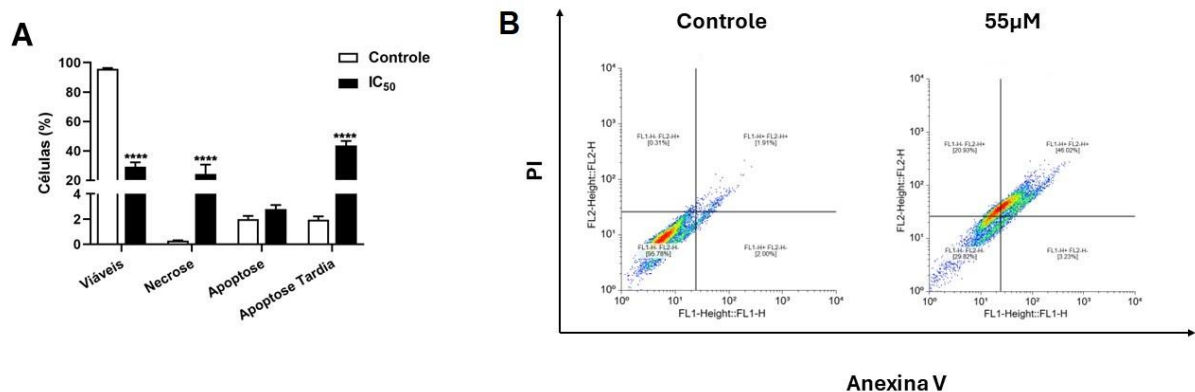
10 Para identificar o padrão de morte celular foi investigado através da
11 marcação de eventos apoptóticos e necróticos.

12 Para detecção de morte celular foi realizada por uma solução de
13 marcação combinada com Anexina V e iodeto de propídio (PI) conforme metodologia
14 clássica (Vermees et al., 1995; Koopman et al., 1994) e protocolos otimizados (Rieger
15 et al., 2011; Crowley et al., 2016). A Anexina V sinaliza exposição de fosfatidilserina
16 na face externa da membrana, característico da apoptose, enquanto o PI identifica
17 perda da integridade da membrana celular em células tardias e necrosadas, o que
18 permite que o iodeto de propídio (PI) entre na célula e se ligue ao DNA, possibilitando
19 a discriminação das populações viáveis (Anexina V-/PI-), apoptóticas precoces
20 (Anexina V+/PI-), apoptóticas tardias/necrose secundária (Anexina V+/PI+) e necrose
21 (Anexina V-/PI+).

22 O padrão de morte celular foi investigado através da marcação de
23 eventos apoptóticos e necróticos, apresentou os resultados com uma diminuição de
24 29,21% ($\pm 3,00$) ($p < 0,0001$) de células vivas SiHa após o tratamento com LPS208 e
25 um aumento significativo na porcentagem de apoptose tardia de 43,62% ($\pm 3,10$) ($p <$

1 0,0001) e aumento significativo na porcentagem de necrose de 24,38% ($\pm 6,33$) ($p <$
 2 0,0001) (Figura3C).

3 **Figura 3 - Análise de morte celular por citometria de fluxo de células SiHa após 48 h de**
 4 **tratamento com LPS208. (A)** Quantificação das populações celulares (%), obtida a partir das leituras
 5 de citometria de fluxo, demonstrando redução significativa de células viáveis por meio do tratamento e
 6 aumento expressivo de células em necrose e apoptose tardia em relação ao controle (**** $p < 0,0001$).
 7 **(B)** Gráfico de pontos do grupo controle, evidenciando predominância de células viáveis e gráfico de
 8 pontos após o tratamento com LPS208 evidenciando aumento nas populações marcadas com anexina
 9 V e iodeto de propídeo (PI), indicativas de apoptose tardia e necrose.



10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

O conjunto dos resultados evidenciam que o LPS208 comprometeu a atividade metabólica das células SiHa, desencadeado pelo estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, o que resultou em perda do potencial de membrana e culminou em morte celular, predominantemente por apoptose tardia e necrose, após 48 horas de tratamento. Sendo assim, trata-se de um padrão compatível com outros achados de derivados de tioureia como já testados em câncer de colorretal humano (DLD-1), fígado (HepG2) e leucemia humana (Jurkat), apresentaram citotoxicidade (Koca et al., 2013). Em relação ao câncer cervical, compostos derivados da tioureia, já foram testadas com subtipo de adenocarcinoma (HeLa) no qual apresentaram atividade anticâncer (GHORAB et al., 2016).

1 **5. CONCLUSÕES**

2 O tratamento do LPS208 promoveu a redução da atividade metabólica
3 em todas as concentrações testadas que na linhagem celular tumoral de carcinoma
4 de células escamosas, SiHa. A avaliação dos mecanismos celulares demonstrou
5 aumento de níveis totais de ERO, disfunção mitocondrial, presença de gotículas
6 lipídicas, que conseqüentemente, podem estar associados com a morte celular por
7 apoptose tardia e necrose. Sendo assim, esses achados sugerem que o LPS208
8 apresenta potencial como candidato a fármaco antitumoral, no entanto, investigações
9 adicionais são necessárias para caracterizar os mecanismos do LPS208 e avaliar sua
10 eficácia em diferentes ensaios, modelos experimentais e ampliar seu uso terapêutico
11 contra o câncer cervical.

1

2

REFERÊNCIAS

- 3 AN, X. et al. Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic
4 opportunities. **Cell Death & Disease**, v. 15, n. 8, 1 ago. 2024.
- 5 ARFIN, S. et al. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism. **Antioxidants**, v. 10, n.
6 5, p. 642, 22 abr. 2021.
- 7 AGILI, F. A. Biological Applications of Thiourea Derivatives: Detailed
8 Review. **Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 435–468, 31 maio 2024.
- 9 BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence
10 and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for**
11 **Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 4 abr. 2024.
- 12 BRISSON, M. et al. Impact of HPV Vaccination and Cervical Screening on Cervical
13 Cancer elimination: a Comparative Modelling Analysis in 78 low-income and lower-
14 middle-income Countries. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, 30 jan. 2020.
- 15 EVELIN, B. et al. Trends in net survival from cervical cancer in a Brazilian state with
16 medium Human Development Index. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, 11 jul. 2025.
- 17 FALCARO, M. et al. Effect of the HPV vaccination programme on incidence of
18 cervical cancer and grade 3 cervical intraepithelial neoplasia by socioeconomic
19 deprivation in England: population based observational study. **BMJ**, v. 385, n. 385, p.
20 e077341, 15 maio 2024.
- 21 FU, Y.-C. et al. Intratumoral heterogeneity and drug resistance in cancer. **Cancer**
22 **Cell International**, v. 25, n. 1, 18 mar. 2025.
- 23 GH RASOOL BHAT et al. Cancer cell plasticity: from cellular, molecular, and genetic
24 mechanisms to tumor heterogeneity and drug resistance. **Cancer and Metastasis**
25 **Reviews**, v. 43, 8 fev. 2024.
- 26 GHORAB, M. M. et al. Design, synthesis and anticancer activity of some novel
27 thioureido-benzenesulfonamides incorporated biologically active moieties. **Chemistry**
28 **Central Journal**, v. 10, n. 1, p. 19–19, 7 abr. 2016.
- 29 HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n.
30 1, p. 31–46, 12 jan. 2022.
- 31 HÖHN, A. K. et al. 2020 WHO Classification of Female Genital Tumors. **Geburtshilfe**
32 **und Frauenheilkunde**, v. 81, n. 10, p. 1145–1153, out. 2021.
- 33 KIRISHNAMALINE, G. et al. Theoretical investigation of structure, anticancer activity
34 and molecular docking of thiourea derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v.
35 1225, p. 129118, fev. 2021.

- 1 KOCA, İ. et al. Synthesis and anticancer activity of acyl thioureas bearing pyrazole
2 moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3859–3865, 19 abr.
3 2013.
- 4 KOWALCZYK, P. et al. Mitochondrial Oxidative Stress—A Causative Factor and
5 Therapeutic Target in Many Diseases. **International Journal of Molecular**
6 **Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13384, 13 dez. 2021.
- 7 KIM, J. et al. The real-world efficacy and toxicity of first-line paclitaxel and cisplatin
8 with bevacizumab in platinum-naïve primary stage IVB cervical cancer. **Taiwanese**
9 **Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 64, n. 1, p. 61–67, 8 jan. 2025.
- 10 Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*, v. 543,
11 n. 7645, p. 378–384, mar. 2017.
- 12 LUIZAGA, C. T. DE M. et al. Recent changes in trends of mortality from cervical
13 cancer in Southeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 57, p. 25, 17 abr. 2023.
- 14 MANSO, L. et al. SEOM-GEICO Clinical Guidelines on cervical cancer
15 (2023). **Clinical and Translational Oncology**, v. 26, n. 11, p. 2771–2782, 31 ago.
16 2024.
- 17 MEIRA, K. C. et al. Inequalities in Temporal Effects on Cervical Cancer Mortality in
18 States in Different Geographic Regions of Brazil: An Ecological Study. **International**
19 **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 9, p. 5591, 5
20 maio 2022.
- 21 NATIONAL CANCER INSTITUTE. What Is Cancer? Disponível em:
22 <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>.
- 23 NELSON, C. W.; MIRABELLO, L. Human papillomavirus genomics: Understanding
24 carcinogenicity. **Tumour Virus Research**, v. 15, p. 200258, fev. 2023.
- 25 SAFI, R.; MENÉNDEZ, P.; POL, A. Lipid droplets provide metabolic flexibility for
26 cancer progression. **FEBS letters**, 7 fev. 2024.
- 27 SAMEER ULLAH KHAN et al. Unveiling the mechanisms and challenges of cancer
28 drug resistance. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, 12 fev. 2024.
- 29 SILVA, L. L. DA et al. Malignancy Associated with Low-Risk HPV6 and HPV11: A
30 Systematic Review and Implications for Cancer Prevention. **Cancers**, v. 15, n. 16, p.
31 4068, 11 ago. 2023.
- 32 VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of
33 phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled
34 Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, jul. 1995.
- 35 WANG, M. et al. Global Cervical Cancer Incidence by Histological Subtype and
36 Implications for Screening Methods. **Journal of Epidemiology and Global Health**, 3
37 jan. 2024.

- 1 WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed
2 cell death. **Methods in Cell Biology**, v. 103, p. 55–98, 2011.
- 3 YORDANOV, A. et al. Adenosquamous Carcinoma of the Uterine Cervix – Impact of
4 Histology on Clinical Management. **Cancer management and research**, v. Volume
5 13, p. 4979–4986, 1 jun. 2021.
- 6 ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen
7 Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological Reviews**, v. 94, n.
8 3, p. 909–950, jul. 2014.