



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

GABRIELA MATTEVI ALMEIDA

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE
NOVOS DERIVADOS DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS
SELENILADAS**

Florianópolis
2018

GABRIELA MATTEVI ALMEIDA

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE NOVOS
DERIVADOS DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS SELENILADAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica, sob a orientação da **Professora Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa** e coorientação da **Dr.^a Fabiana Ourique da Silva**.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Almeida, Gabriela Mattevi

Estudo in vitro do potencial antitumoral de novos derivados de imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas / Gabriela Mattevi Almeida ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa, coorientadora, Fabiana Ourique da Silva, 2018.

92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

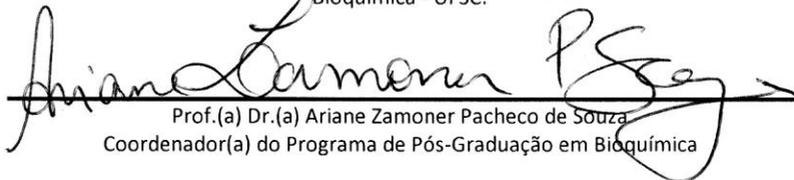
1. Bioquímica. 2. Câncer. 3. Imidazo[1,2-a]piridina. 4. Selênio. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. da Silva, Fabiana Ourique. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

“Estudo in vitro do potencial antitumoral de novos derivados de Imidazo[1,2-a]Piridinas Seleniladas”

Por

Gabriela Mattevi Almeida

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (005/2018/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.


Prof.(a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr.(a) Rozangela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora


Dr.(a) Sumbal Saba (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Maicon Kwiecinski (Universidade do Sul de Santa Catarina)


Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 22 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi realizado com muito trabalho e dedicação tanto da minha parte quanto do grupo de pesquisa que me aceitou tão prontamente: o LABIOEX. A pós-graduação foi uma experiência muito mais difícil do que eu havia imaginado, mas também muito recompensadora, e a sua conclusão só foi possível pelo apoio e pela colaboração de inúmeras pessoas. Assim, devo vários agradecimentos:

- Primeiramente, agradeço a Prof^ª. Rozangela Curi Pedrosa a confiança deposita em mim, a orientação e a contribuição para minha formação científica. Muito obrigada por seus ensinamentos!
- Agradeço a todos os integrantes do LABIOEX, principalmente a Fabiana, Valdelúcia, Nádia, Jean, Daniela, Karina, Luiza, Cynthia, Rodrigo, Raquel e Guilherme a ajuda nos momentos difíceis e a companhia nos momentos felizes. Vou sentir saudade das comilanças e das conversas!
- Agradeço especialmente a Tâmila Siminski, que passou por este mestrado junto comigo e me ajudou em tudo, tornando-se uma ótima colega de trabalho e uma amiga muito querida. Foi ótimo te conhecer e ter sua companhia nesses dois anos! Vou sentir saudade, aguarde-me em MT!
- Agradeço aos meus pais e a minha irmã, Fernando, Jaqueline e Fernanda, a paciência, o apoio incondicional e o encorajamento para seguir com os meus planos e não desistir dos meus sonhos.
- Agradeço aos meus avós, Norberto e Marilene, o amor e o carinho dedicados a mim e o acolhimento em sua casa todo esse tempo.
- Agradeço ao Josiel Lorant Silva, a companhia e as conversas, a paciência para me aguentar quando o humor não estava dos melhores e o incentivo constante para prosseguir.
- Agradeço aos meus amigos Thuane, Thamiris, Olívia, Flavia, Tomás, Mariana, Gabriel, Bárbara, Thaís e Fabíola os

momentos de descontração, as risadas e os desabafos. Tudo fica mais leve com vocês.

- Agradeço a banca examinadora, Prof^a. Sumbal Saba, Prof^o. Maicon R. Kwiecinski, Prof^a Ariane Z. P. de Souza, Prof^a Fátima R. M. B. Silva o tempo e a disposição para avaliar este trabalho.
- Agradeço ao grupo de pesquisa do CEBIME (UFSC), coordenado pelo Prof^o Hernan Terenzi, e aos técnicos do LAMEB (CCB) o auxílio para a utilização dos equipamentos empregados neste trabalho.
- Agradeço a todos os professores e técnicos-administrativos envolvidos no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.
- Agradeço a UFSC, a CAPES e ao CNPq a bolsa de estudos e o apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.
- E por fim, agradeço a Deus as alegrias e os desafios colocados em minha vida.

Mais uma conquista, que venham outras!

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Tanto as imidazo[1,2-*a*]piridinas quanto os compostos organosselênicos demonstram alto potencial antitumoral contra diversas linhagens tumorais em estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo propícia sua fusão em uma única molécula. Desta forma, onze novos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas, sendo dez deles selenilados, foram testadas quanto ao seu potencial citotóxico, por meio do teste do MTT, contra duas linhagens tumorais (MCF-7 e HeLa) e uma linhagem de fibroblasto murinho (McCoy), definindo-se a CI_{50} para os onze compostos (0-1000 μ M), selecionando-se os compostos com CI_{50} menores. Ensaio molecular com espectrofotometria UV visível e com fluorescência (iodeto de propídio) foram realizados para avaliar a interação e a intercalação dos compostos selecionados (50-250 μ M) com CT-DNA (150 μ M). O teste do cometa para avaliar a fragmentação do DNA, o ensaio clonogênico e análise do ciclo celular para avaliar a atividade antiproliferativa, a análise de morte celular (iodeto de propídio/laranja de acridina) para avaliar o tipo de morte induzido pelos compostos selecionados em células MCF-7 foram realizados após 72h de tratamento em concentrações subtóxicas, a CI_{30} . A imuno eletroforese para avaliar a expressão de proteínas relacionadas ao dano de DNA, ciclo celular e apoptose foi realizada após o tratamento de 48h. Os compostos IP-Se-05 ($CI_{50} = 26 \mu$ M/ MCF-7) e IP-Se-06 ($CI_{50} = 12,5 \mu$ M/ MCF-7) obtiveram as menores CI_{50} . Os testes de interação e intercalação com CT-DNA demonstraram a capacidade desses dois compostos de interagirem e intercalarem com o CT-DNA. O ensaio cometa detectou a fragmentação do DNA e a imuno eletroforese demonstrou o aumento da expressão de γ H2AX após o tratamento das células MCF-7 com IP-Se-05 e IP-Se-06. O ensaio clonogênico e a análise do ciclo celular comprovaram a atividade antiproliferativa desses dois compostos, ocorrendo diminuição estatisticamente significativa no número de colônias e a parada do ciclo celular na fase G2/M de células MCF-7, 66,22% para IP-Se-05 e 57,97% para IP-Se-06. Ainda, ambos compostos causaram diminuição da expressão da ciclina A e da pAkt. O ensaio de morte celular comprovou a morte apoptótica e necrótica das células tratadas com IP-Se-05 e morte apoptótica das células tratadas com IP-Se-06, aumentando a expressão de p53. De maneira geral, IP-Se-06 demonstrou maior atividade citotóxica e antiproliferativa em menor concentração, além de desencadear a indução da morte celular somente por apoptose, maior expressão de p53 e menor expressão da ciclina A, talvez pela presença do grupamento 2-metoxifenil. Por fim, supõe-se que IP-Se-05

e IP-Se-06 intercalem com o DNA, causando sua fragmentação na fase S e aumentando a expressão de γ H2AX. Isto ativa a parada do ciclo celular na fase G2/M, diminuindo a expressão da ciclina A e da pAkt, enquanto aumenta a expressão da p53, o que encaminha as células MCF-7 para morte celular apoptótica. Conclue-se que IP-Se-06 é o mais promissor dentre os onze compostos testados neste trabalho. Ele causou maior efeito citotóxico e antiproliferativo *in vitro*, provavelmente, pela presença do grupamento 2-metoxifenil em sua estrutura química, o que confere polaridade e eletrofilicidade a este composto, destacando-se dos demais.

Palavras-chave: Câncer; imidazo[1,2-*a*]piridinas; selênio.

ABSTRACT

Imidazo[1,2-*a*]pyridines and organoselenic compounds display a high antitumor potential against several tumor lines in *in vitro* and *in vivo* studies. In this way, their merge into a single molecule might bring promising results. In this study, eleven novel imidazo[1,2-*a*]pyridines were tested initially for their cytotoxic and antiproliferative potential *in vitro*. To verify cytotoxic and selective activity of these compounds, the MTT test was performed on a panel of tumor cells lines (MCF-7 e HeLa) and a fibroblast cell line (McCoy). The IC₅₀ was determined for the eleven compounds (0-1000 μM) and used to select the compounds with the lowest concentrations. Molecular assays with visible UV spectrophotometry and fluorescence (propidium iodide) was performed to evaluate the compounds interaction and intercalation (50-250 μM) with CT-DNA (150 μM). Comet test was performed to evaluate DNA fragmentation in MCF-7 cells after a 72h treatment at subtoxic concentration, the IC₃₀. Clonogenic assay and cell cycle analysis was performed to evaluate antiproliferative activity. Cell death (propidium iodide/acridine orange) analysis induced by the compounds were performed in MCF-7 cells after a 72h treatment with the IC₃₀. Immunoelectrophoresis to evaluate the expression of proteins related to DNA damage, cell cycle and apoptosis was performed after a 48h treatment. Compounds IP-Se-05 (IC₅₀ = 26 μM /MCF-7) and IP-Se-06 (IC₅₀ = 12.5 μM /MCF-7) exhibited the lowest IC₅₀. Interaction and CT-DNA intercalation tests demonstrated the ability of these compounds to interact and intercalate with DNA. The comet assay detected DNA fragmentation and immunoelectrophoresis demonstrated increased γH2AX expression in MCF-7 cells after IP-Se-05 and IP-Se-06 treatments. The clonogenic assay and the analysis of the cell cycle evidenced the antiproliferative activity of these two compounds, as statistically significant decrease in the number of colonies and cell cycle gap in the G2/M phase of MCF-7 cells (66.22% for IP-Se-05 and 57.97% for IP-Se-06) were observed. In addition, decreased expression of cyclin A and pAkt was detected. The cell death analysis demonstrated the apoptotic and necrotic death of cells treated with IP-Se-05 and apoptotic death of cells treated with IP-Se-06, increasing p53 expression. In general, IP-Se-06 demonstrated higher cytotoxic and antiproliferative activity in a lower concentration, in addition to induction of cell death mostly by apoptosis, higher expression of p53 and lower expression of cyclin A, perhaps linked to the presence of a 2-phenylmethoxy group. Finally, it is assumed that IP-Se-05 and IP-Se-06

intercalate with the DNA, causing its fragmentation and increasing the expression of γ H2AX. This activates cell cycle arrest in the G2/M phase, decreasing expression of cyclin A and pAkt, while increasing the expression of p53, which routes MCF-7 cells to apoptotic cell death. It is concluded that IP-Se-06 is the most promising among the eleven compounds evaluated in this work. It displayed greater cytotoxic and antiproliferative effect *in vitro*, probably, due to the presence of a 2-methoxyphenyl group in its chemical structure, which confers more polarity and electrophilicity to the compound, when comparing it to the others.

Key words: Cancer; imidazo[1,2-*a*]pyridines; selenium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reparo de quebra de fita-dupla do DNA por NHEJ e HR....	25
Figura 2 - Fosforilação da H2AX após dano ao DNA.....	27
Figura 3 - Intercalação de compostos com o DNA.....	28
Figura 4 - Sinalização da via PI3K/Akt/mTOR em células tumorais...	30
Figura 5 - Pontos inibitórios do ciclo celular.....	32
Figura 6 - Diferenças entre morte celular necrótica e apoptótica.....	34
Figura 7 - Fatores estressantes e respostas da p53.....	37
Figura 8 – Estrutura química dos núcleos imidazol, piridina e imidazopiridina.....	39
Figura 9 - Estruturas químicas de imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas com ação antitumoral.....	40
Figura 10 - Estruturas químicas de compostos organosselênicos com ação antitumoral.....	43
Figura 11 - Síntese de derivados inéditos de imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas seleniladas por Rafique e colaboradores.....	44
Figura 12- Interação dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 com o CT-DNA.....	55
Figura 13 - Efeito intercalante dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 com o CT-DNA em comparação com a doxorubicina.....	55
Figura 14 - Índice de dano ao DNA e expressão de γ H2AX em células MCF-7 após tratamento com IP-Se-05 e IP-Se-06.....	56
Figura 15 - Atividade antiproliferativa e expressão de pAkt após o tratamento de células MCF-7 com os compostos IP-Se-05 e IP-Se-06.....	57

Figura 16 - Efeito dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 na progressão do ciclo de células MCF-7 e expressão de ciclina A.....	59
Figura 17 - Células viáveis, apoptóticas e necróticas após coloração com iodeto de propídio e laranja de acridina.....	60
Figura 18 - Tipo de morte celular induzido em células MCF-7 após o tratamento com os compostos IP-Se-05 e IP-Se-06.....	61
Figura 19 – Estrutura química dos derivados de imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas selenilados IP-Se-03 e IP-Se-06.....	71
Figura 20 - Hipótese para o mecanismo de ação <i>in vitro</i> da imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas seleniladas IP-Se-05 e IP-Se-06 em células MCF-7.....	72

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A549	Células de carcinoma de pulmão
ACS	Sociedade Química Americana
ADMET	Parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AgNO₃	Nitrato de prata
APAF-1	Fator ativador de proteases pr-apoptóticas
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
BRCA1/2	Gene da proteína do câncer de mama 1/2
BSA	Albumina de soro bovino
CAD/DFF40	DNase ativada por caspase
C/APC	Ciclossomo/Complexo promotor da anáfase
CDK	Ciclina dependente de cinase
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
CI₅₀	Concentração inibitória de 50% das células
CI₃₀	Concentração inibitória de 30% das células
CT-DNA	DNA de timo de vitelo
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte celular
DMEM	Meio de cultura modificado de Eagle
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA-PK_{cs}	Proteína cinase dependente de DNA
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial
ER	Receptor de estrognio
EROs	Espécies reativas de oxignio
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
FADD	Proteína adaptadora com domínio de morte associado à FAS
FBS	Soro fetal bovino
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona dissulfeto
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
HCl	cido clorídrico
HCT116	Células de carcinoma colorretal

HeLa	Células de adenocarcinoma de cérvix
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfônico
HepG2	Células de carcinoma hepático
HIF-1α	Fator indutor de hipóxia-1 α
HO[·]	Radical hidroxila
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HR	Reparo do DNA por Recombinação homóloga
Huh-7	Células de carcinoma hepático
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de seletividade
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LNCaP C-81	Células de carcinoma de próstata
M	Mitose
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCC	Complexo de checagem mitótica
MEK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCF-7	Células de adenocarcinoma mamário
McCoy	Células de fibroblastos murino
MDA-MB-231	Células de adenocarcinoma mamário metastático
MDA-MB-468	Células de adenocarcinoma mamário metastático
MDA-MB-435	Células de adenocarcinoma mamário metastático
MDM2	<i>Murine Double minute-2</i>
MDR	Multirrestência a drogas
MRN	Complexo proteico de reparo Mre11, Rad50 e Nbs1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazolium bromide
NaOH	Hidróxido de sódio
Na₂SeO₃	Selenito de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NHEJ	Reparo do DNA por Junção de Extremidades Não Homólogas
NMR	Ressonância magnética nuclear
NP40	Nonidet-P40 ou octil fenoxilpolietoxiletanol
1O₂	Oxigênio singlete
O₂^{·-}	Ânion superóxido

P.A.	Para análise
PARP	Poli(ADP-ribose)polimerase
pb	pares de base
PBS	Salina tamponada de fosfato
PDK-1	Fosfatidilinositol-3-dependente de cinase-1
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinase
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5 bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato
PR	Receptor de progesterona
RDD	Resposta de dano ao DNA
rpm	Rotações por minuto
S	Síntese
SeO₃⁻²	Selenito
SeO₄⁻²	Selenato
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TrxR	Tioredoxina redutase
TNFα	Fator de necrose tumoral-α
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TP53	Gene da proteína tumoral 53 (p53)
U87MG	Células de glioblastoma
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VHC	Vírus da hepatite C
STAT	Fator transdutor de sinal e ativador de transcrição
ZnSO₄	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1.	Epidemiologia do câncer	21
1.2.	Câncer: conceito e carcinogênese.....	22
1.3.	Terapias farmacológicas.....	23
1.2.	Alvos moleculares no tratamento do câncer.....	24
1.2.1.	Dano ao DNA.....	25
1.2.2.	Vias de sinalização da proliferação celular	28
1.2.3.	Ciclo celular	30
1.2.4.	Morte celular: apoptose e necrose.....	33
1.3.	Química medicinal	38
1.3.1.	Imidazopiridinas.....	38
1.3.2.	O selênio como antitumoral	41
1.3.3.	Novos derivados de imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas selenilados..	43
2.	OBJETIVOS	45
2.1.	Objetivo geral	45
2.2.	Objetivos específicos.....	45
3.	METODOLOGIA	46
3.1.	Imidazopiridinas	46
3.2.	Reagentes químicos e anticorpos.....	46
3.3.	Ensaio moleculares e ensaios <i>in vitro</i>	47
3.3.1.	Cultura celular.....	47
3.3.2.	Ensaio do MTT	47
3.3.3.	Ensaio de interação com o DNA	47
3.3.4.	Ensaio de intercalação com o DNA	48

3.3.5.	Ensaio do Cometa	49
3.3.6.	Ensaio clonogênico	49
3.3.7.	Ensaio do ciclo celular	50
3.3.8.	Ensaio do tipo de morte celular.....	50
3.3.9.	Imunoeletoforese	51
3.4	Análise estatística	52
4.	RESULTADOS	53
4.1.	Citotoxicidade dos compostos para as linhagens celulares ..	53
4.2.	Interação e intercalação com o CT-DNA	54
4.3.	Fragmentação do DNA de células MCF-7	56
4.4.	Atividade antiproliferativa em células MCF-7.....	57
4.5.	Parada do ciclo celular em células MCF-7.....	58
4.6.	Tipo de morte celular induzida em células MCF-7	60
5.	DISCUSSÃO	63
6.	CONCLUSÃO	73
7.	PERSPECTIVAS	74
8.	REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do câncer

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. De acordo com uma pesquisa realizada pelo projeto GLOBOCAN 2012 da IARC (Agência Internacional para Pesquisa do Câncer), houve aproximadamente 14 milhões de novos casos de câncer em 2012 e a perspectiva é que haja um aumento de 22 milhões de novos casos por ano nas próximas duas décadas. Neste mesmo período, estima-se que o número de mortes por câncer aumente de 8,4 milhões para 13 milhões por ano. A pesquisa informa também que os tipos de câncer mais comumente diagnosticados no mundo foram o câncer de pulmão (1,8 milhões de casos), mama (1,7 milhões de casos) e intestino grosso (1,4 milhões de casos), sendo os cânceres com maior taxa de mortalidade o câncer de pulmão (1,6 milhões de mortes), fígado (800 mil mortes) e estômago (700 mil mortes). Destes casos, a estimativa é que 70% das mortes ocorreram em países subdesenvolvidos pela falta de diagnóstico precoce e acesso a tratamentos (IARC, 2014).

No Brasil, 600 mil novos casos de câncer foram estimados para o biênio 2016-2017. Dentre eles, os cânceres de próstata (61 mil novos casos) e de mama (58 mil novos casos) como os mais recorrentes, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (180 mil novos casos). Além disso, o levantamento mostra que os cânceres de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6%) e cavidade oral (5,2%) foram os tipos mais comuns para homens, sendo os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo de útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) os mais comuns entre as mulheres (INCA, 2015).

Para o ano de 2011, o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Brasil contabilizou 184.384 óbitos por câncer, sendo está a segunda maior causa de morte no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Ainda, o SIM registrou 12.705 óbitos causados pelo câncer de mama e 4.986 óbitos causados pelo câncer de cólo de útero, somando 21% do total de mortes ocasionados por câncer no Brasil em 2010 (GIRIANELLI; GAMARRA; AZEVEDO E SILVA, 2014).

Sabe-se que o aumento da incidência de câncer no mundo se deve ao crescimento e ao envelhecimento populacional, além de alguns comportamentos e estilos de vida prejudiciais a saúde (consumo de bebidas alcóolicas, tabagismo, sedentarismo, obesidade, entre outros). A variedade de fatores que causam o câncer, fazendo com que cada tipo

possua suas particularidades genéticas e fisiológicas, dificulta o desenvolvimento de novos antitumorais. Desta forma, investimentos governamentais e privados em políticas públicas voltadas para prevenção e diagnóstico, assim como a pesquisa contínua de novos antitumorais, fazem-se necessários para controlar as taxas de incidência e mortalidade desta doença (TORRE et al., 2015).

1.2. Câncer: conceito e carcinogênese

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 200 doenças heterogêneas de causa multifatorial, estando relacionado a fatores endógenos (alterações genéticas herdadas, aumento de espécies reativas, etc.) e exógenos (alterações genéticas causadas por agentes químicos, físicos ou biológicos). O câncer se desenvolve a partir da proliferação anormal de células que se transformam em tumorais com o passar do tempo, devido a alterações cumulativas no DNA chamadas de mutações (INCA, 2014). As células tumorais sofrem alterações morfológicas e funcionais progressivamente, ocorrendo perda do controle da proliferação e da diferenciação celular, escape da morte celular por apoptose e ganho de potencial invasivo (metástase) (MAITRA, 2013).

Essas características essenciais das células tumorais se devem à: autossuficiência a fatores de crescimento; insensibilidade a inibidores de proliferação; insensibilidade à sinalização de parada do ciclo celular e de morte celular; promoção exacerbada da angiogênese pela secreção de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF); perda de aderência entre células e aquisição da capacidade de se disseminar para tecidos adjacentes através de vasos sanguíneos e linfáticos ou por difusão mecânica (ALBERTS et al., 2010).

A transformação de células normais em tumorais é chamada de carcinogênese, comumente descrita em três etapas. Na primeira etapa (iniciação), uma célula normal sofre várias mutações. Essas alterações genéticas podem ser espontâneas, herdadas ou induzidas por agentes mutagênicos. As mutações geralmente promovem a superexpressão de proto-oncogenes, transformando-se em oncogenes, resultando em descontrole da proliferação e clones celulares (INCA, 2011). Na segunda etapa (promoção), esses clones acumulam mutações geração após geração. Essas mutações silenciam genes supressores de tumor e de reparo do DNA, causando perda da atividade de proteínas-chave, responsáveis pelos sinais de diferenciação, parada do ciclo celular, reparo de danos ao DNA e apoptose. Na última etapa (progressão), as

mutações sucessivas promovem modificações biológicas, surgindo novas populações de clones. O câncer se torna heterogêneo e os novos clones adquirem a capacidade de invadir outros tecidos e de resistir ao tratamento quimioterápico, resultando em falência dos órgãos e óbito (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2011).

Existem vários genes que codificam proteínas importantes para os mecanismos regulatórios das células. Proteínas originadas por proto-oncogenes geralmente estão relacionadas com a diferenciação e promoção da proliferação celular. Já as proteínas originadas por genes supressores de tumor promovem a inibição da proliferação através da parada do ciclo celular e da indução da apoptose. As proteínas de reparo do DNA também são importantes, pois evitam o acúmulo de mutações (LODISH et al., 2014).

Quando esses genes-chave sofrem algum tipo de mutação, as proteínas defeituosas codificadas podem ganhar ou perder funções, tendo sua expressão e atividade aumentada ou diminuída (WARD, 2002). A proteína p53, por exemplo, é uma importante sinalizadora da perda da integridade celular e sua função está prejudicada em 50% de todos os cânceres, devido a mutações no gene supressor de tumor *TP53* (NELSON; COX, 2011).

No câncer de mama, por exemplo, os genes *TP53* e *BRCA1/2* se encontram mutados na maioria dos casos, gerando proteínas defeituosas ou com expressão reduzida, o que contribui para a hereditariedade e agressividade deste câncer. Outras alterações também são recorrentes, sendo utilizadas para a classificação dos subtipos de câncer de mama e determinação do tipo de tratamento farmacológico, como a superexpressão ou ausência de receptores de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e/ou do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), entre outros (SANA; MALIK, 2015).

1.3. Terapias farmacológicas

Atualmente, o tratamento do câncer é realizado principalmente por quatro métodos terapêuticos: remoção cirúrgica do tumor, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, normalmente, utilizados em associação (BRANDÃO et al., 2010). O tratamento quimioterápico é sistêmico e utiliza compostos químicos capazes de eliminar células tumorais. Este tratamento é o mais utilizado e o mais acessível na clínica médica, tendo como objetivo principal eliminar as células tumorais sem lesar células normais (seletividade com baixa toxicidade). Geralmente,

os quimioterápicos são utilizados em associação para melhorar a eficácia do tratamento de cânceres heterogêneos, combatendo a multirresistência a drogas (MRD), um efeito comum e indesejável neste tipo de tratamento (SHAH; SCHWARTZ, 2001).

Os diversos quimioterápicos utilizados na clínica possuem mecanismos de ação variados, sendo direcionados para determinados tipos de câncer. Aqueles denominados ciclo celular específicos, como a vincristina, o taxol, o metotrexato, o 5-fluoracil e as podofilotoxinas, atuam em células tumorais que se encontram em divisão celular. Alguns inibem os fusos mitóticos (vincristina e vimblastina) ou estabilizam os microtúbulos (taxol), outros inibem a topoisomerase II (podofilotoxinas) e alguns inibem a biossíntese de componentes importantes para síntese do DNA (metotrexato e 5-fluoracil). Já os quimioterápicos ciclo celular não específicos exercem sua atividade independentemente da fase do ciclo celular. Esses quimioterápicos normalmente são agentes intercalantes do DNA (doxorrubicina, cisplatina, ciclofosfamida, nitrossurêias), que o danificam diretamente (DARWICHE; EL-BANNA; GALI-MUHTASIB, 2007; ALMEIDA et al., 2005).

Entretanto, a maior parte destes fármacos possui alta toxicidade por serem pouco seletivos, acarretando em diversos efeitos colaterais (náusea, diarreia ou constipação, fadiga, imunodeficiência, infecções oportunistas, infertilidade, anemia, dor, depressão, perda de cabelo e pelos, etc.), além de induzirem a MRD (FERREIRA; FRANCO, 2017). Portanto, a busca por fármacos antitumorais que sejam mais seletivos e menos tóxicos se faz necessária para a eficiência do tratamento e, conseqüentemente, para o aumento da sobrevida da população atingida pelo câncer (O'CONNOR, 2015).

1.2. Alvos moleculares no tratamento do câncer

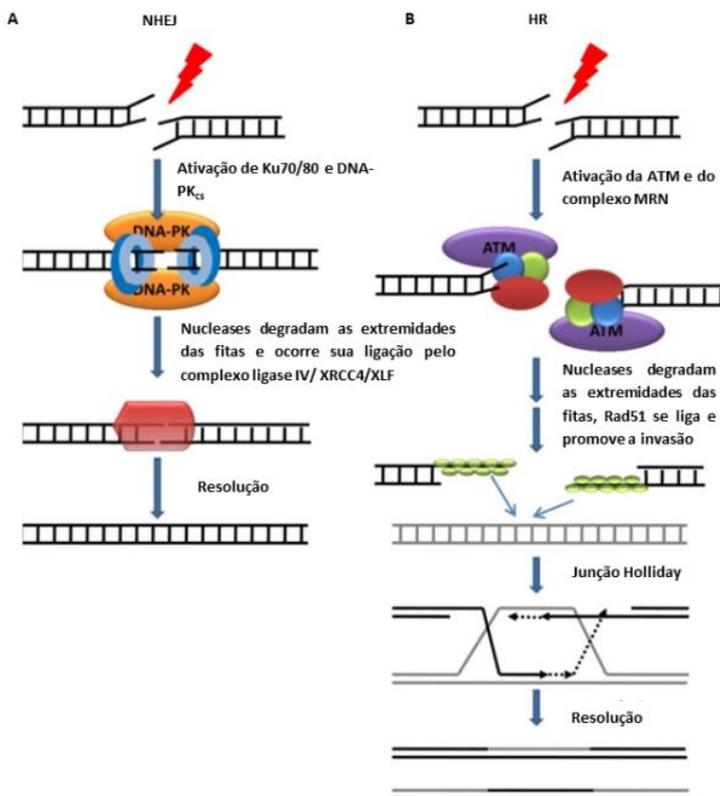
A pesquisa de alvos moleculares para o tratamento do câncer tem como objetivo aumentar a efetividade do tratamento, diminuindo os efeitos colaterais. Nesta estratégia terapêutica, os compostos testados normalmente bloqueiam vias de sinalização da proliferação e crescimento das células tumorais, além da angiogênese, por meio da interação com biomoléculas específicas (enzimas, receptores, lipídeos, DNA, etc.). Ao danificar ou inibir algumas dessas biomoléculas, esses compostos podem ativar a parada do ciclo celular e, posteriormente, a morte das células tumorais.

1.2.1. Dano ao DNA

Células normais sofrem danos no DNA diariamente, sendo a maioria corrigida imediatamente pela maquinaria de reparo do DNA. Os danos podem ser espontâneos ou ocorrerem após o ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs), incidência de radiações, agentes intercalantes, erros de replicação, entre outros (ALBERTS et al., 2010).

O tipo de dano de DNA mais perigoso para as células é a quebra de fita-dupla, que provoca a fragmentação dos cromossomos e a perda de genes na divisão celular (KINNER et al., 2008). A quebra de fita-dupla pode ser reparada, por exemplo, por NHEJ (junção de extremidades não homólogas) ou HR (recombinação homóloga) (Figura 1), ativados em qualquer fase do ciclo celular (MAO et al., 2008).

Figura 1 - Reparo de quebra de fita-dupla do DNA por NHEJ e HR.



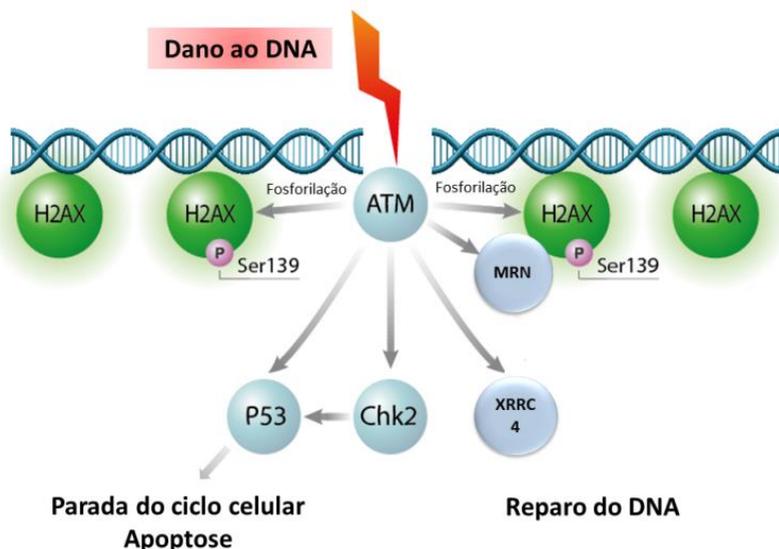
Legenda. Reparo de quebra de fitas duplas. (A) NHEJ – Ku70/80 identifica a quebra e recruta DNA-PK_{cs}. Esta recruta nucleases e o complexo de reparo ligase IV/XRCC4/XLF, que degradam alguns nucleotídeos, deixando as fitas justapostas para posterior ligação das extremidades. (B) HR – O complexo MRN identifica a quebra e recruta ATM. Ela ativa diversas proteínas, incluindo nucleases e a proteína Rad51, que degradam alguns nucleotídeos, promovendo a invasão da fita quebrada na cromátide-irmã intacta, formando a Junção Holliday (formação em X). A sequência de DNA faltante é sintetizada e as extremidades das fitas religadas. Fonte: Adaptado de LOPEZ-CONTRERAS; FERNANDEZ-CAPETILLO, 2012.

A ativação do reparo do DNA se dá pelo recrutamento de diversas proteínas sinalizadoras para as porções danificadas como a DNA-PK_{cs} (proteína cinase dependente de DNA), (FELL e SCHILD-POULTER, 2015), a PARP (poli(ADP-ribose)polimerase), o complexo MRN (Mre11, Rad50 e Nbs1), a ATM (*ataxia telangiectasia mutated*)/ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*), entre outras, que além de promoverem o reparo, elas também são responsáveis por iniciar a sinalização da parada do ciclo e morte celular (CICCIA; ELLEDGE, 2010; PLESCHKE et al., 2000).

O reconhecimento e início da sinalização de dano estão relacionados à forma com que a estrutura do DNA está organizada no núcleo. O DNA de eucariotos superiores está compactado na forma de cromatina através de nucleossomos, nos quais cada 147 pares de bases (pb) estão enrolados em um octâmero de histonas. Este octâmero possui quatro tipos de histonas altamente conservadas: H2A, H2B, H3 e H4, um dímero de cada (ALBERTS et al., 2010).

Inúmeras modificações covalentes nas histonas regulam a acessibilidade de proteínas ao DNA, iniciando funções biológicas de forma coordenada. Uma das sinalizações de dano ao DNA mais importantes é a fosforilação do resíduo serinal39 da histona H2AX (variante de H2A), chamada de gamma-H2AX (γ H2AX) (KINNER et al., 2008). A ATM, a ATR e a DNA-PK_{cs} fosforilam a H2AX, aumentando a acessibilidade de proteínas à cromatina, o que possibilita interações específicas proteína-proteína de resposta ao dano de DNA (RDD) (Figura 2). Nos casos em que o dano ao DNA não é reparado, a ATM e a ATR também promovem a ativação da p53, que induz a parada do ciclo celular e da apoptose (MARÉCHAL; ZOU, 2013). Desta forma, a RDD é vital para manter a viabilidade e a integridade genômica das células. Defeitos na sinalização de reparo ao DNA, parada do ciclo e indução da apoptose propiciam a instabilidade genética e o surgimento do câncer (SHALTIEL et al., 2015).

Figura 2 - Fosforilação da H2AX após dano ao DNA.



Legenda. A proteína ATM fosforila a histona H2AX (γ H2AX) e a Chk2 após a quebra de fita-dupla do DNA, iniciando a sinalização e o recrutamento da maquinaria de reparo do DNA (complexo MRN e complexo XRRC4/XLF/ligase IV) e a ativação de p53. Fonte: Adaptado de <https://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/phospho-h2ax-ser139-cellular-assay-kit>. Acessado em: 05/02/2018.

Vários quimioterápicos convencionais possuem o DNA como alvo terapêutico, pois células tumorais tendem a ser mais suscetíveis a danos adicionais ao DNA por suas deficiências no mecanismo de reparo (CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013). Agentes antitumorais eletrofílicos (carga positiva) capazes de interagir com macromoléculas nucleofílicas (carga negativa), como o DNA, são chamados de intercalantes (Figura 3). Agentes intercalantes normalmente danificam o DNA através da sua inserção entre os pares de bases ou da alquilação por meio de ligações covalentes entre o composto e as fitas do DNA, geralmente, nos pares de base guanina-citosina. Estas ligações covalentes podem ser de três tipos: intrafilamentar, interfilamentar e interhélices, sendo a ligação interfilamentar a mais citotóxica (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

Figura 3 - Intercalação de compostos com o DNA.



Legenda. Diferentes tipos de intercalação de moléculas com o DNA. (A) Três tipos de ligação covalente: intrafilamentar, interfilamentar e interhélices. (B) Agente intercalante inserido entre os pares de bases. Fonte: ALMEIDA et al., 2005; RESCIFINA et al., 2014.

Estes tipos de interações com o DNA normalmente modificam a sua estrutura, impedindo a replicação, podendo causar quebras em suas fitas (NETO; LAPIS, 2009). Quimioterápicos como a doxorubicina e a daunorrubicina são exemplos de agentes intercalantes. Entretanto, estes fármacos convencionais demonstram alta toxicidade, além de induzirem resistência em células tumorais (ALMEIDA et al., 2005).

1.2.2. Vias de sinalização da proliferação celular

A proliferação celular é um processo importante para a homeostase do organismo, sendo necessária para construção, regeneração e funcionamento de tecidos e órgãos. Ela ocorre quando uma célula-mãe se divide em duas células-filhas geneticamente iguais após o término do ciclo celular. A desregulação deste processo está diretamente relacionada ao surgimento do câncer, sendo a atividade antiproliferativa um dos efeitos desejados para fármacos antitumorais.

A proliferação celular é estimulada através da ligação de mitógenos (fatores de crescimento, citocinas, hormônios, etc.) aos seus receptores tirosina cinase. Estes receptores podem ativar duas principais vias de sinalização de proliferação, crescimento e sobrevivência celular: Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt/mTOR. A via Ras/Raf/MAPK é responsável por ativar proteínas que regulam o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular (MOLINA; ADJEI, 2006).

A proteína Ras é ativada a partir da sinalização de receptores tirosina cinase, ativando a Raf e as MAPK em sequência, cinases MEK1/2 e ERK1/2. O fator de transcrição ERK1/2 é translocado até o

núcleo, sendo responsável pela transcrição de outros fatores (cMyc, STAT1/3, c-Jun, etc.), capazes de ativar genes promotores da proliferação e do ciclo celular (ZHANG et al., 2004).

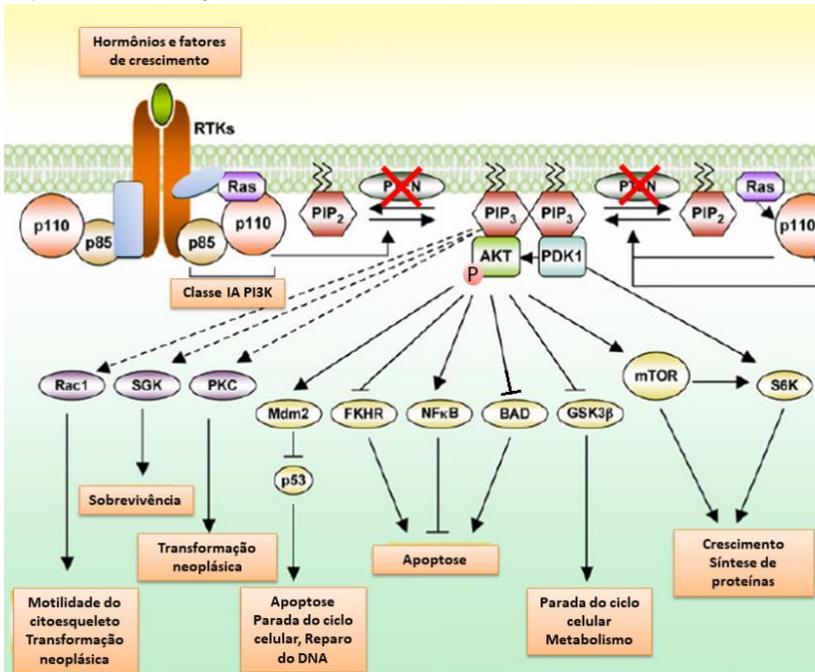
A via PI3K/Akt/mTOR sinaliza para o metabolismo, crescimento, proliferação e sobrevivência celular, além da angiogênese, estando diretamente envolvida na progressão do ciclo celular e na inibição da apoptose. A fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), que pertence à família de cinases de membrana, está envolvida na transdução de sinal de muitas funções celulares essenciais, incluindo a ativação de proto-oncogenes (LIU et al., 2009).

A PI3K é responsável por gerar o segundo mensageiro lipídico fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) que, por sua vez, transloca a Akt (uma serina treonina cinase) para a membrana, onde é fosforilada e ativada pela proteína dependente de cinase-1 (PDK-1). A pAkt é capaz de inibir proteínas pró-apoptóticas, além de fosforilar e ativar o fator de transcrição mTOR, responsável pela transcrição da ciclina D (importante iniciadora do ciclo celular), entre outras proteínas promotoras da proliferação celular (NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

Em células normais, a fosforilação e ativação da Akt são impedidas pela fosfatase PTEN, que transforma PIP₃ novamente em PIP₂, o que pode conduzir a célula para morte apoptótica (CHEAIB et al., 2015). Já em células tumorais, a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR está constantemente ativada devido à perda de expressão de *PTEN*, mantendo a Akt fosforilada, o que resulta na proliferação descontrolada e imortalidade das células tumorais (Figura 4) (LIANG; SLINGERLAND, 2003).

A pAkt impede a parada do ciclo celular liberando os complexos de ciclina/CDK e outras proteínas importantes para progressão do ciclo celular (SEARS; NEVINS, 2002). Ela também impede a indução da apoptose ao estimular a expressão excessiva da E3-ubiquitina-ligase MDM2 (*murine double minute 2*), responsável por se ligar e encaminhar a p53 para a degradação proteossômica (MOLL; PETRENKO, 2003). Em células normais, a p53 é fosforilada e ativada após a sinalização de estresse ou dano, desligando-se da MDM2. Então, a p53 se encaminha para o núcleo, ativando a transcrição de diversas proteínas inibitórias do ciclo celular, como as Cip/Kip, e pró-apoptóticas (LATIF; HARVEY; O'CONNELL, 2001). Além disso, a p53 é conhecida por auxiliar na inibição da fosforilação da Akt, aumentando a expressão de PTEN (STAMBOLIC et al., 2001).

Figura 4 - Sinalização da via PI3K/Akt/mTOR em células tumorais.



Legenda. Quando a pAkt está constantemente ativada pela falta da proteína inibitória PTEN, ocorre a proliferação descontrolada, inibição da apoptose e transformação neoplásica das células. Fonte: Adaptado de LIU et al., 2009.

Sabe-se que existe um *crossstalk* entre as vias Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt/mTOR, regulando tanto a progressão do ciclo celular quanto a inibição da apoptose. Em alguns casos, a Ras pode ativar a PI3K e a Raf pode fosforilar a Akt, mesmo na ausência de citocinas endógenas, sendo este processo bastante comum em células tumorais (CHANG et al., 2003). Dada a importância da pAkt no processo de carcinogênese, inibidores de proteínas envolvidas nesta via são pesquisados como potenciais tratamentos antitumorais como a rapamicina, importante inibidora da mTOR (KHAN et al., 2013).

1.2.3. Ciclo celular

O ciclo celular é o processo que prepara a célula-mãe para divisão, sendo o mecanismo pelo qual a célula se prolifera. Ele possui quatro fases bem definidas em células eucariotas: G1 (*gap 1*) – ocorre

crescimento celular, síntese de RNA e de vários complexos proteicos para a replicação do DNA; S (síntese) – síntese de DNA (duplicação do material genético) e de proteínas; G2 (*gap 2*) – síntese de RNA, proteínas e duplicação das organelas; M (mitose) – condensação do DNA, segregação equivalente dos cromossomos e organelas replicadas para a divisão celular (citocinese). Entretanto, não havendo estímulos apropriados para a divisão, as células permanecem na fase G0 (quiescência). Esta fase pode durar horas, dias ou todo período de vida da célula (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013).

A ocorrência do ciclo celular depende de uma variedade de sinais extra e intracelulares (fatores de crescimento, citocinas, nutrientes, estresse, etc.), que controlam a síntese e a atividade de várias proteínas regulatórias das vias de sinalização. As principais proteínas regulatórias da passagem das fases do ciclo celular são as ciclinas dependentes de cinase (CDKs), subunidade catalítica, e as ciclinas, subunidade reguladora (GRAÑA; REDDY, 1995). Diferentes tipos de complexos ciclina/CDK são sintetizados e ativados de acordo com a fase do ciclo celular. A fosforilação e desfosforilação das CDKs, assim como a síntese e a degradação controlada das ciclinas, são mecanismos que regulam sua atividade e, conseqüentemente, a progressão do ciclo celular (ALBERTS et al., 2010).

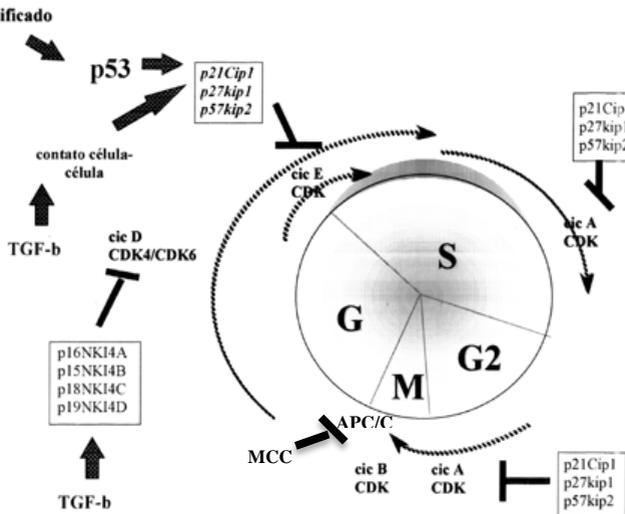
Inicialmente, as CDKs de determinada fase do ciclo se encontram inativas no citossol. Porém, dado o sinal para a progressão do ciclo celular, as ciclinas são sintetizadas, acumulando-se. O complexo ciclina/CDK é ativado via fosforilação/desfosforilação de sítios específicos, desencadeando a ativação de diferentes vias de sinalização, fatores de transcrição e proteínas que possibilitem a passagem das fases do ciclo celular. A cada fase, a atividade aumentada de um grande número de determinada CDKs ativa a degradação proteossômica das ciclinas correspondentes. Com isso, as CDKs são desfosforiladas e inativadas até que ocorra a recepção de novos sinais internos e a síntese de um novo grupo de ciclinas para continuidade do ciclo celular. Defeitos associados à regulação do ciclo celular, como alterações na expressão dessas cinases, podem provocar instabilidade genômica e proliferação celular descontrolada (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A parada do ciclo celular acontece por danos celulares ou falta de fatores de crescimento, hormônios e nutrientes essenciais. A detecção de danos e seu reparo são controlados por três pontos de checagem (G1, G2 e mitose) (Figura 5), tendo o auxílio de duas famílias de inibidores dos

complexos de ciclina/CDK: os inibidores INK4 (p16, p15, p19, p18) e os inibidores Cip/Kip (p21, p27 e p57) (PIETENPOL; STEWART, 2002). A parada em G1 normalmente ocorre quando a célula não atinge o tamanho ideal, faltam nutrientes ou fatores de crescimento, ou ainda quando ocorrem danos ao DNA e hipóxia. Já a parada do ciclo celular em G2 geralmente ocorre por danos ao DNA, erros de replicação, enquanto que na fase M a parada ocorre por erros na segregação das cromátides-irmãs (ALBERTS et al., 2010).

Havendo dano ao DNA na fase G1, o TGF- β (fator de transformação do crescimento- β) ativa a síntese das INK4 e a p53 sintetiza as proteínas Cip/Kip. As INK4 se ligam às CDKs 4/6 da ciclina D, enquanto as Cip/Kip se ligam ao complexo ciclina E/CDK2, inativando-os. Ambos os complexos deixam de fosforilar a proteína do retinoblastoma (pRb), que não se desliga e, conseqüentemente, não ativa o fator de transcrição E2F. Desta forma, não ocorre a síntese da ciclina A, parando o ciclo celular na transição G1/S. Esta parada pode encaminhar as células para quiescência, senescência (envelhecimento celular) ou apoptose (DURONIO; XIONG, 2013). Na fase G2, as Cip/Kip inibem os complexos ciclina A/CDK2 e B/CDK1, parando o ciclo antes de entrar na mitose. Com isso, os mecanismos de reparo do DNA são ativados e, caso o dano não seja reparado, a célula dará início a apoptose (BOER et al., 2008).

Figura 5 - Pontos inibitórios do ciclo celular.



Legenda. Os complexos ciclina/CDK inibidas pelas Cip/Kip e INKs4 após a ativação da p53 e a sinalização do TGF- β nos três pontos de verificação do ciclo celular. Fonte: Adaptado de WARD, 2002.

O último ponto de checagem ocorre na mitose, especificamente na anáfase, durante a segregação das cromátides-irmãs pelos fusos mitóticos. Quando algum erro de ligação dos fusos às cromátides-irmãs é detectado, o complexo de checagem mitótico (MCC) é ativado, inibindo o ciclossomo/complexo promotor da anáfase (C/APC) (VERMEULEN et al., 2003). Assim, enquanto as Cip/Kip inibem o complexo ciclina B/CDK1, o MCC dissolve a coesão entre as cromátides-irmãs, parando o ciclo celular e possibilitando o rearranjo dos fusos para continuidade da divisão. Não sendo possível o reparo do erro, as vias de sinalização da apoptose são ativadas. Desta forma, falhas nesses pontos de checagem e nos mecanismos de reparo do DNA geram aneuploidia e instabilidade genômica, propiciando transformações tumorais nas células (LONDON; BIGGINS, 2014) ou ainda morte por catástrofe mitótica (BARNUM; O'CONNELL, 2014).

Em vários tipos de câncer, a superexpressão de ciclinas e CDKs ou a baixa expressão ou pouca atividade de inibidores do ciclo, como p53, p21 e p16, faz com que haja acúmulo de mutações e proliferação celular exacerbada pelo escape dos pontos de checagem, independentemente dos danos sofridos e/ou sinais intra e extracelulares recebidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Por esta razão, vários fármacos antitumorais são pesquisados com base na inibição da transcrição de genes e da atividade de proteínas reguladoras da progressão do ciclo celular (KANG; REYNOLDS, 2009; ZHANG; YANG; GRAY, 2009; ROBERTS; DER, 2007; SHAPIRO; HARPER, 1999).

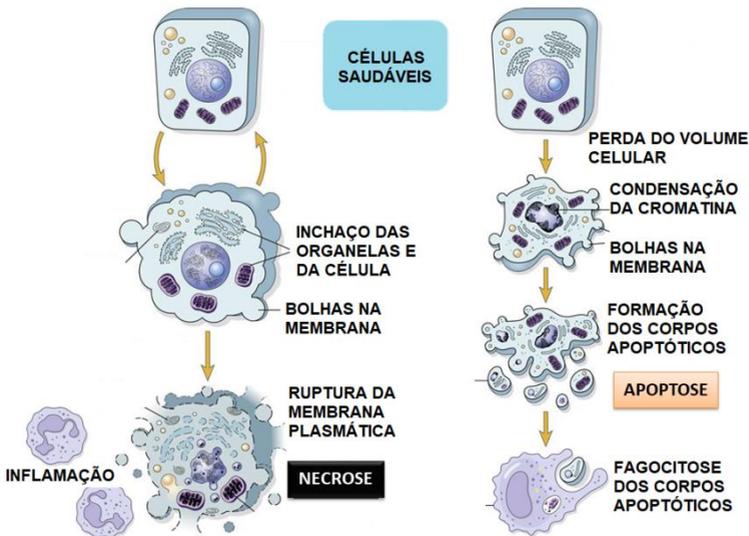
1.2.4. Morte celular: apoptose e necrose

Assim como a proliferação, a morte celular é um processo importante para a homeostase do organismo, existindo vários tipos: apoptose, necrose, autofagia, catástrofe mitótica, entre outros (OUYANG et al., 2012; CASTEDO et al., 2004). A apoptose é um processo de “suicídio celular” responsável por eliminar células velhas, desnecessárias ou danificadas do organismo. Já na morte por necrose as células sofrem lise após alguma injúria aguda. Células que possuem sinalização defeituosa para apoptose são capazes de sobreviver a

diversos estímulos ofensivos, o que auxilia no desenvolvimento de doenças autoimunes e do câncer. Fármacos capazes de induzir a apoptose em células tumorais são considerados particularmente promissores.

As células apoptóticas possuem modificações morfológicas características, tais como: encolhimento da membrana nuclear e da célula em si, citoplasma denso, relocação e compactação das organelas, condensação e fragmentação específica da cromatina (200 pb), formação de bolhas na membrana plasmática e produção de corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são brotos celulares formados a partir das bolhas da membrana, nos quais o material intracelular fica contido. Eles são rapidamente fagocitados e digeridos por macrófagos ou células vizinhas, prevenindo a necrose secundária e a inflamação (Figura 6) (ELMORE, 2007; ORRENIUS, 1995).

Figura 6 - Diferenças entre morte celular necrótica e apoptótica.



Legenda. As células necróticas sofrem ruptura da membrana plasmática, o que recruta células de defesa, desencadeando a inflamação. As células apoptóticas formam corpos apoptóticos que, posteriormente, serão fagocitados por macrófagos. Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2009.

Já as células necróticas são caracterizadas pela perda da integridade da membrana plasmática (aumento da permeabilidade), aumento do volume celular e inchaço de organelas (oncoses), além de

ruptura da membrana nuclear (cariólise), fragmentação inespecífica da cromatina e colapso celular ou lise (MAJNO; JORIS, 1995). O extravasamento do conteúdo intracelular libera citocinas e outros fatores, que ativam a resposta imunológica inata e iniciam uma forte resposta inflamatória. A inflamação exacerbada pode lesionar e prejudicar o funcionamento do tecido, pois promove estresse às células vizinhas e aumento da taxa de necrose no local (BELIZÁRIO; VIEIRA-CORDEIRO; ENNS, 2015).

A decisão entre necrose e apoptose depende do tipo de estímulo recebido pela célula. A morte celular por apoptose ou necrose pode ser ativada por ligantes de receptores pertencentes à família TNFR (receptor do fator de necrose tumoral) ou danos e estresses intracelulares (dano ao DNA, estresse oxidativo ou osmótico, etc.) e extracelulares (calor, acidificação, hipóxia, radiação, citotoxicidade de drogas, etc.). Porém, a necrose parece ser ativada quando esses estímulos ocorrem com maior intensidade (ELMORE, 2007).

A sinalização para apoptose pode começar por vias extrínsecas ou intrínsecas, sendo as caspases suas principais promotoras. As caspases são proteases cisteína-aspartato específicas, que clivam uma variedade de proteínas-alvo logo após os resíduos de aspartato, ativando-as ou inativando-as. As próprias caspases são ativadas via clivagem numa cascata hierárquica (ALBERTS et al., 2010).

Existem 14 tipos de caspases em células humanas, que podem ser divididas em três grupos. O grupo I (caspases-1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14) é formado pelas caspases envolvidas na maturação de citocinas e na resposta inflamatória, e não fazem parte do mecanismo de apoptose. O grupo II (caspases-2, 8, 9 e 10) é formado pelas caspases iniciadoras da apoptose, responsáveis por ativar as caspases executoras da apoptose. Estas, por sua vez, pertencem ao grupo III (caspases-3, 6, 7), sendo responsáveis pela clivagem de várias proteínas dando início a apoptose (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2008).

A via extrínseca normalmente ocorre pela falta de fatores de sobrevivência ou quando receptores TNF (Fas/CD95, TNF α , TRAIL/2) da célula são estimulados por seus ligantes como o receptor Fas e seu ligante (FasL). Este receptor ativa a proteína adaptadora FADD (domínio de morte associado à Fas), que se ligam a procaspases-8, 10 e/ou 2, formando o complexo DISC (complexo de sinalização indutor de morte) (THORBURN, 2004).

As caspases iniciadoras ativadas por esses complexos, em seguida, clivam e ativam as procaspases-3, 6 e 7. Estas, por sua vez, clivam várias proteínas-alvo, dando prosseguimento a fragmentação da

cromatina e do núcleo para o início da apoptose (FAN et al., 2005). A via extrínseca é capaz de ativar a via intrínseca da apoptose, uma vez que as caspases-8 e 10 podem ativar a proteína pró-apoptótica Bid, clivando-a em tBid (Bid truncada). Ela se transloca até a mitocôndria e ativa as proteínas pró-apoptóticas existentes em sua membrana (MILHAS et al., 2005).

A via intrínseca ou mitocondrial normalmente é ativada por estímulos estressantes internos (dano ao DNA, hipóxia, falta de nutrientes, etc.). Esses estímulos ativam a p53, que inicia a transcrição de diversas proteínas, dentre elas as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, que atuam na manutenção da permeabilidade da membrana mitocondrial. Este grupo é formado por proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A-1) e pró-apoptóticas efetoras com domínio conservado BH1-4 (Bax, Bak, Bok) ou BH3 (Bim, Bid, PUMA, Noxa, Bad, etc.) (BURLACU, 2003).

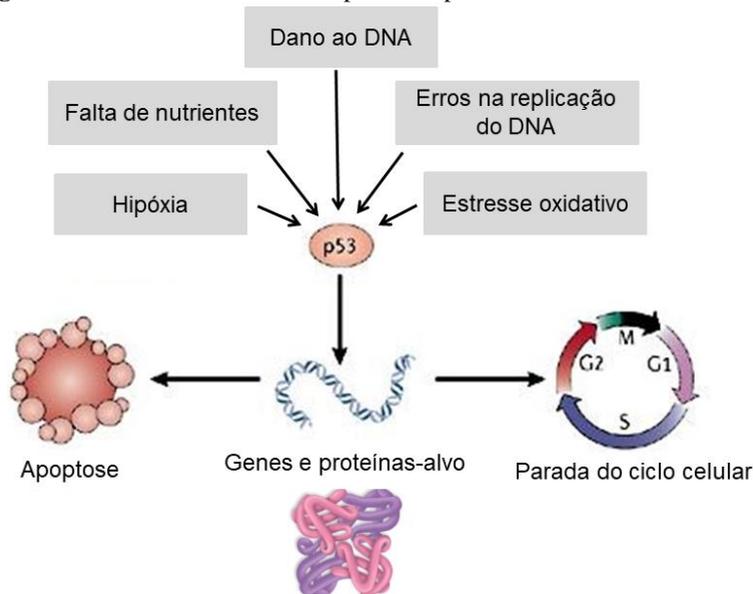
Geralmente, as proteínas antiapoptóticas estão ligadas às BH1-4, inibindo-as. Após a sinalização para apoptose, algumas BH3 passam a inibir as proteínas antiapoptóticas ou ativar diretamente as BH1-4 (DELBRIDGE; STRASSER, 2015; SHAMAS-DIN et al., 2013). Quando ocorre dano ao DNA, a p53 transcreve e ativa proteínas pró-apoptóticas como a PUMA, Noxa, Bid e Bax, promovendo a inibição da Bcl-2 e da Bcl-XL (SHANKAR; SRIVASTAVA, 2007).

Ao silenciar ou inibir a Bcl-2 e a Bcl-XL, a Bax é liberada (LIU, et al., 2015; TAKAHASHI et al., 2013), transloucando-se até as mitocôndrias, onde se liga a Bak formando poros na membrana. Com isso, o citocromo c e outros fatores indutores da apoptose são liberados. O citocromo c ativa proteínas Apaf-1 (fator apoptótico ativador de protease-1), que se ligam e ativam procaspases-9, formando o apoptossomo (WESTPHAL et al., 2011). Inicia-se a condensação e fragmentação da cromatina, enquanto a caspase-9 cliva e ativa as procaspases-3 e 7, que em seguida ativam as procaspases-2 e 6 (ELMORE, 2007).

As caspases efetoras inativam proteínas da maquinaria de reparo de dano ao DNA, como a DNA-PK_{cs}, e ativam outras proteínas responsáveis pela fragmentação controlada do DNA e do núcleo, como a CAD/DFF40 (DNAse ativada por caspase) (NICHOLSON, 1999; SLEE et al., 1999). As caspases efetoras ainda podem ativar lipases e proteases que clivam lipídios e proteínas estruturais, comprometendo a ligação célula-célula, a integridade da membrana plasmática e da própria célula (WALSH et al., 2008; SLEE; ADRAIN; MARTIN, 2001).

Desta forma, a p53 é ativada por vários estímulos estressantes, modulando a expressão e a atividade de diversas proteínas. Assim, ela exerce papel central na manutenção da integridade e homeostase celular ao induzir a parada do ciclo celular e a apoptose para que mutações, principalmente, de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, não sejam transmitidas às células-filhas, impedindo o processo de carcinogênese (Figura 7). Por este motivo, a p53 é conhecida como a guardiã do genoma (FRIDMAN; LOWE, 2003).

Figura 7 - Fatores estressantes e respostas da p53.



Legenda. A p53 está envolvida na modulação da expressão de genes e atividade de proteínas. Ela possibilita tanto a parada do ciclo quanto a morte celular por apoptose nos casos de danos que não são reparados. Fonte: Adaptado de Sherr, 2006.

As mutações inerentes a carcinogênese podem suprimir a expressão da p53 e de outras proteínas pró-apoptóticas, enquanto superexpressam proteínas envolvidas na proliferação e sobrevivência celular (HASSAN et al., 2014). No caso de alguns tipos de câncer, a Bcl-2 e Bcl-XL estão superexpressas, enquanto os genes de Bax, Bim e PUMA não são expressos (DELBRIDGE; STRASSER, 2015). Assim, moléculas capazes de modular a ativação da p53 e de proteínas pró-

apoptóticas, ou ainda aquelas capazes de inativar proteínas antiapoptóticas, são consideradas promissoras para o tratamento do câncer (PLATI; BUCUR; KHOSRAVIFAR, 2011).

1.3. Química medicinal

A pesquisa em química medicinal no Brasil vem crescendo desde o ano 2000, sendo desenvolvida em sua maioria nas instituições de ensino superior (LIMA, 2007). Segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), a química medicinal envolve aspectos científicos biológicos, medicinais e farmacológicos, e está interessada na descoberta, identificação, síntese, desenvolvimento e otimização de compostos biologicamente ativos, estudando seu metabolismo e seu modo de ação em nível molecular pela relação estrutura-atividade (WERMUTH et al., 1998). Ela busca, entre outros aspectos, analisar os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos compostos, visando maior potência, seletividade e menor toxicidade (BARREIRO; MANSSOUR, 2001).

A química medicinal estuda tanto compostos isolados de produtos naturais quanto compostos sintéticos com atividades biológicas e farmacológicas diversas. Vários fármacos são desenvolvidos e otimizados por meio desta área de pesquisa, analisando-se o seu potencial de ação biológica com base em sua estrutura química. A maioria dos fármacos são micromoléculas bioativas que exercem seu efeito terapêutico por meio de interações específicas com biomacromoléculas ou receptores (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BARREIRO et al., 2002).

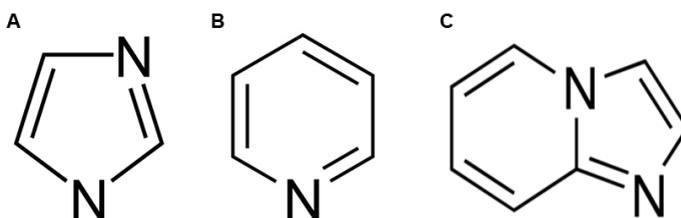
1.3.1. Imidazopiridinas

O imidazol é um anel heterocíclico bastante comum na natureza, constituindo vários produtos naturais como purinas, histaminas, histidinas e ácidos nucleicos. Por conter em seu anel aromático dois átomos de nitrogênio, ele é polar e ionizável, possuindo parâmetros farmacocinéticos importantes (Figura 8 A). O imidazol melhora a biodisponibilidade e a solubilidade dos fármacos pela presença deste átomo e, por essa razão, está presente em uma variedade de agentes medicinais com diversas atividades farmacológicas (antimicrobiano, antiviral, antiparasitário, anti-inflamatório, analgésico, antituberculose, antidepressivo e antitumoral) (SHALINI; SHARMA; KUMAR, 2010).

O núcleo piridina também é um anel aromático nitrogenado amplamente distribuído na natureza, especialmente entre as plantas (Figura 8 B). A piridina pode ser encontrada em várias enzimas, vitaminas e alcaloides. Este núcleo está presente em mais 7000 fármacos com diferentes atividades biológicas (antiviral, bactericida, antidoto, antidiabético, antitumoral, etc.) (CHAUBEY; PANDEYA, 2011).

A imidazopiridina ($C_7H_6N_2$) contém um anel 5-6 heterocíclico formado pela fusão do imidazol com a piridina, sendo um composto largamente explorado na química medicinal (Figura 8 C). Dentre os seus derivados, as imidazo[1,2-*a*]piridinas possuem maior importância na área farmacêutica e de produtos naturais (BAGDI et al., 2015).

Figura 8 – Estrutura química dos núcleos imidazol, piridina e imidazopiridina.



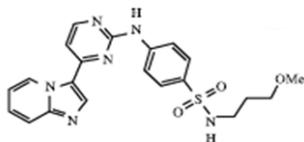
Legenda. Estrutura química do imidazol (A), da piridina (B) e da imidazopiridina (C).

Seu núcleo pode ser encontrado em vários fármacos já utilizados na clínica como, por exemplo, o zolpidem (hipnótico sedativo) e o alpidem (ansiolítico), que interagem com o receptor $GABA_A$ (LANGER et al., 1992); a olprinona (vasodilatador utilizado em tratamento de insuficiência cardíaca), uma inibidora da fosfodiesterase III (OHASHI; DOHI; ITOH, 2000); o GSK812397, inibidor de cepas tropicais X4 do HIV-1 (JENKINSON et al., 2010); e o antibiótico Rifaximim, utilizado em doenças gastrointestinais (KOO; DUPONT, 2010).

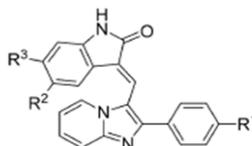
Pesquisas recentes têm descoberto outras ações farmacológicas deste núcleo como, por exemplo, ação bactericida para *Staphylococcus aureus* (KHAN et al., 2013; SHUKLA et al., 2012), antituberculose (LI et al., 2016; MORASKIA et al., 2014), anti-HCV (vírus da hepatite C) (POULIOT et al., 2015), antileishmanial (CASTERA-DUCROS et al., 2013), anti-inflamatório (LACERDA et al., 2014) e antitumoral. Dentre as imidazopiridinas descritas como citotóxicas, antiproliferativas e/ou antitumorais, as estruturas químicas (Figura 9), alvos terapêuticos e

tipos celulares tumorais estudados tanto *in vitro* quanto *in vivo* são diversos.

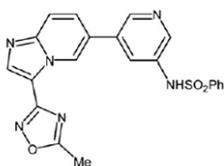
Figura 9 – Estruturas químicas de imidazo[1,2-*a*]piridinas com ação antitumoral.



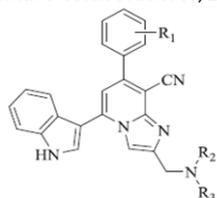
Byth e colaboradores, 2006



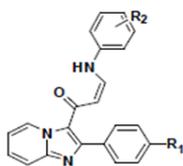
Kamal e colaboradores, 2013



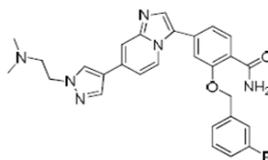
Jung e colaboradores, 2013



Liu e colaboradores, 2017



Sayed e colaboradores, 2017



Xi e colaboradores, 2017

Byth e colaboradores (2006) demonstraram a citotoxicidade e atividade antiproliferativa de um derivado de imidazo[1,2-*a*]piridina na concentração nanomolar para um painel de linhagens tumorais, ocorrendo inibição seletiva das CDKs 1/2, indução da parada do ciclo celular e da apoptose. Em outro estudo, El-Awady e colaboradores (2016) constataram ação sinérgica entre a doxorrubicina e um derivado de imidazo[1,2-*a*]piridina, inibindo o reparo do DNA danificado pela doxorrubicina, induzindo a apoptose em linhagens tumorais.

Kamal e colaboradores, (2013) também testaram derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas contra um painel de linhagens tumorais, demonstrando alta citotoxicidade, principalmente contra linhagens de carcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), atividade antiproliferativa e antimitótica. Os derivados inibiram a polimerização das tubulinas e a pAkt, parando o ciclo celular em G2/M e induzindo morte celular.

Ainda, Jung e colaboradores, (2013) estudaram o efeito antiproliferativo de um derivado de imidazo[1,2-*a*]piridina em células Huh-7 (hepatocarcinoma). Através de ensaios *in silico*, o composto demonstrou se ligar a PI3K, inibindo a via PI3K/Akt/mTOR. Ensaios *in vitro* demonstraram a parada do ciclo celular na fase G2/M e indução da apoptose, aumentando a expressão da caspase-3 e diminuindo a expressão da Bcl-2, enquanto que os ensaios *in vivo* demonstraram inibição do crescimento do tumor xenográfico, além da atividade antiangiogênica pela diminuição da expressão de VEGF e do fator indutor de hipóxia – 1α (HIF- 1α).

Estes e outros estudos reforçam a importância da pesquisa de derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas para o desenvolvimento de novos tratamentos para várias doenças, principalmente para o câncer. Desta forma, diversas pesquisas *in silico*, *in vitro* e *in vivo* demonstram que o núcleo imidazo[1,2-*a*]piridina pode agir em alvos terapêuticos importantes, possuindo potencial antitumoral (LIU et al., 2017; SAYEED et al., 2017; XI et al., 2017; YANG et al., 2017; XIE et al., 2015; KIM et al., 2014; LEE et al., 2013).

1.3.2. O selênio como antitumoral

O selênio pode ser encontrado no ambiente nas formas inorgânicas e orgânicas. As duas principais formas inorgânicas presentes no solo são o selenito (SeO_3^{-2}) e o selenato (SeO_4^{-2}). Estes são precursores das duas principais formas orgânicas, a selenometionina, que é a principal fonte de selênio em produtos vegetais, e a selenocisteína, forma mais abundante em produtos de origem animal. As selenocisteínas são importantes integrantes de várias enzimas. No organismo, as selenoenzimas possuem como atividades principais a ação antioxidante, como a glutatona peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR), além da conversão do hormônio T_4 em T_3 pelas deiodinases tipo I e II (COMINETTI; COZZOLINO, 2009).

No entanto, vários estudos mostram a dualidade da ação do selênio, tanto pelo seu papel antioxidante quanto pró-oxidante. O selênio é reconhecido como um micronutriente antioxidante, que pode funcionar como agente antimutagênico, prevenindo a transformação tumoral das células. A falta ou o mau funcionamento de certas selenoenzimas pode aumentar a produção de EROs, que danificam o DNA e outros componentes celulares (ALMONDES et al., 2010). Por outro lado, sabe-se que o selênio pode ser citotóxico em concentrações elevadas, uma

vez que forma ligações com diferentes metais presentes no sítio ativo de algumas enzimas antioxidantes, ocasionando estresse oxidativo. Compostos organosselênicos, estudados como possíveis agentes antitumorais, podem reagir com grupos tióis presentes em enzimas e peptídeos, como a glutathiona reduzida (GSH), oxidando-as e inativando-as, o que favorece a geração de ânions superóxidos (O_2^-) e outras EROs (H_2O_2 , OH^- , $1O_2$) no meio intracelular (DRAKE, 2006; SPALLHOLZ, 1994).

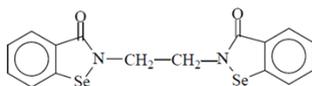
O selênio ainda pode se ligar e inibir a TrxR, outra importante enzima reguladora do balanço-redox, que normalmente está superexpressa em células tumorais, sendo um importante alvo terapêutico (SANMARTÍN et al., 2012; CHENG et al., 2010). A geração de estresse oxidativo é um dos mecanismos de ação de alguns fármacos já consagrados na clínica médica. As EROs em excesso ocasionam o ataque oxidativo a biomoléculas (DNA, lipídeos, proteínas, etc.), danificando-as, levando a morte celular (LEE; JEONG, 2012).

Assim, compostos contendo selênio são estratégias promissoras para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (EL-BAYOUMY; SINHA, 2004). Zhong e Oberley (2001), por exemplo, demonstraram a desregulação do balanço-redox e o efeito citotóxico do selenito de sódio (Na_2SeO_3) em células tumorais de próstata (LNCaP C-81). Nos tratamentos realizados, os níveis de GSH (glutathiona reduzida) diminuíram, enquanto os níveis de GSSG (glutathiona dissulfeto) aumentaram. Houve aumento da geração de EROs, parada do ciclo celular em G2/M, expressão de p21 e caspase-3, indicando dano ao DNA e apoptose.

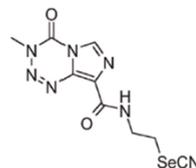
Outros estudos mostram que a adição do selênio em compostos orgânicos melhora a resposta antitumoral diminuindo as CI_{50} , havendo geração de EROs e indução da apoptose (JARDIM et al., 2018; CRUZ et al., 2016; PLANO et al., 2016; MARTINS et al., 2015; CHENG et al., 2012; SHI et al., 2003). Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, o selênio demonstra sensibilizar as células tumorais, melhorando a resposta antitumoral de quimioterápicos convencionais, e aumentar a sobrevida dos animais por reduzir sua toxicidade (CAO; DURRANI; RUSTUM, 2004; VADGAMA et al., 2000).

Desta forma, os compostos organosselênicos são considerados potenciais antitumorais devido à sua atividade pró-oxidantes, pró-apoptótica e seletiva, como demonstrado em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, tendo sua ação citotóxica modulada pelas propriedades químicas do próprio núcleo orgânico (Figura 10) (LEE; JEONG, 2012; VALDIGLESIAS et al., 2010).

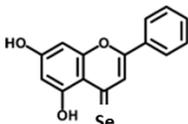
Figura 10 – Estruturas químicas de compostos organosselênicos com ação antitumoral.



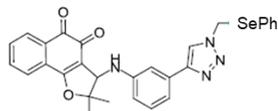
Shi e colaboradores, 2003



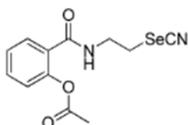
Cheng e colaboradores, 2012



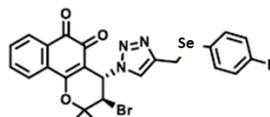
Martins e colaboradores, 2015



Cruz e colaboradores, 2016



Plano e colaboradores, 2016



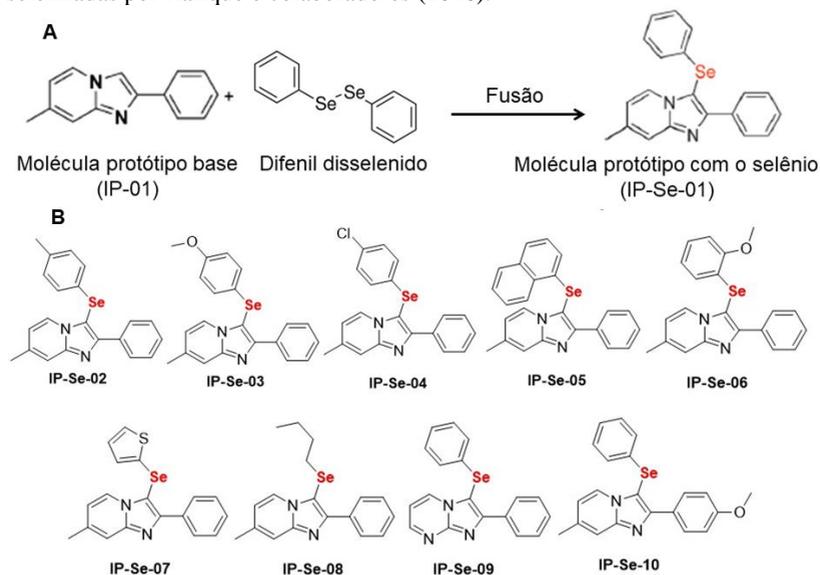
Jardim e colaboradores, 2018

1.3.3. Novos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas selenilados

Em diversos estudos, o núcleo imidazo[1,2-*a*]piridina é constantemente fusionado a diversos outros núcleos com ações farmacológicas conhecidas. Entretanto, a fusão de imidazo[1,2-*a*]piridinas com o selênio é inédita, sendo publicada por Rafique e colaboradores (2016). Sabendo das diversas ações farmacológicas que estes dois núcleos possuem, os autores sintetizaram dez novos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas contendo um átomo de selênio que, posteriormente, teve sua ação antitumoral investigada no presente trabalho. Para a síntese dos derivados, Rafique e colaboradores fusionaram o núcleo 7-metil-2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (molécula protótipo sem o selênio) com o difenil disselenido, formando o núcleo 7-metil-2-fenil-3-(fenilselenil)-imidazo[1,2-*a*]piridina (molécula protótipo com o selênio) (Figura 11 A). A partir da molécula protótipo selenilada, sintetizou-se os demais derivados selenilados, adicionando-se diferentes grupamentos (Figura 11 B).

A investigação do efeito antitumoral destes derivados é de extrema importância uma vez que os mesmos são inéditos e não foram encontradas publicações referentes ao potencial antitumoral de outros derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas.

Figura 11 – Síntese de derivados inéditos de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas por Rafique e colaboradores (2016).



Legenda. Síntese da molécula protótipo de imidazo[1,2-*a*]piridina selenida (**IP-Se-01**) (A). Derivados inéditos sintetizados por Rafique e colaboradores (2016), a partir de **IP-Se-01**, possuindo diferentes grupamentos: **IP-Se-02** (4-metilfenil); **IP-Se-03** (4-metoxifenil); **IP-Se-04** (4-clorofenil); **IP-Se-05** (naftaleno); **IP-Se-06** (2-metoxifenil); **IP-Se-07** (tiofenil); **IP-Se-08** (butil); **IP-Se-09** (imidazo[1,2-*a*]pirimidina com fenil); **IP-Se-10** (4-metoxifenil) (B).

Sabendo do problema que o câncer representa para a saúde pública mundial e a toxicidade dos tratamentos quimioterápicos convencionais, a pesquisa por novos fármacos antitumorais se torna crucial. Compostos antitumorais devem ser capazes de atingir alvos terapêuticos importantes, como o DNA, parando o ciclo celular e induzindo a apoptose das células tumorais. Neste contexto, a junção do núcleo imidazo[1,2-*a*]piridina com o selênio é inédita e promissora, devido as suas atividades citotóxicas, antiproliferativas e antitumorais descritas em diversos estudos. Desta forma, o presente estudo, em parceria com o Laboratório de Síntese de Derivados de Selênio e Telúrio (LabSelen - UFSC), procurou investigar estes novos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas selenilados quanto ao seu potencial antitumoral utilizando ensaios moleculares e *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial citotóxico e antiproliferativo de onze novos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas, sendo dez deles selenilados, investigando seus possíveis mecanismos de ação.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o potencial das imidazo[1,2-*a*]piridinas, quanto:

- À citotoxicidade em linhagens celulares MCF-7, HeLa e McCoy;
- À interação e à intercalação com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA);
- À fragmentação do DNA de células MCF-7;
- À atividade antiproliferativa pela formação de colônias e indução da parada do ciclo celular em células MCF-7;
- Ao tipo de morte celular (apoptose ou necrose) induzida em células MCF-7;
- À expressão de proteínas envolvidas no dano ao DNA, na parada do ciclo e na morte celular (γ H2AX, ciclina A, pAkt, p53) em células MCF-7.

3. METODOLOGIA

3.1. Imidazopiridinas

Os onze novos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas (dez deles selenilados) estudados (Figura 11) foram sintetizados por Rafique e colaboradores (2016) e fornecidos pelo grupo LabSelen, coordenado pelo Prof.º Dr.º Antonio Luiz Braga, vinculado ao Departamento de Química (UFSC).

Estes compostos foram avaliados por meio de ensaios biológicos moleculares e *in vitro*, conforme o delineamento experimental abaixo.

3.2. Reagentes químicos e anticorpos

O meio de cultura Eagle modificado da Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos utilizados na cultura de células foram adquiridos pela Gibco (EUA). Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich: DNA de timo de vitelo (CT-DNA, Cat. D4522), agarose (Cat. A6013), dimetil-sulfóxido (DMSO, Cat. D8418), albumina de soro bovino (BSA, Cat. A2153), iodeto de propídio (Cat. P4170), laranja de acridina (Cat. A6014), nocodazol (Cat. M1404), doxorubicina (Cat. D2975000), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Cat. M5655) e o coquetel de inibidores de protease. O coquetel inibidor de fosfatases foi adquirido da Calbiochem (Merk Biosciences). O *kit* quimioluminescente para detecção das bandas de proteínas Westar Nova[®] 2.0 (XLS071, 0250) foi adquirido da Cyanagen (Bologna, Itália). Todos os outros reagentes químicos foram utilizados com grau de pureza atendendo as normas da Sociedade Química Americana (ACS). Os anticorpos primários policlonais de coelho anti- β -actina (sc-7210), anti- γ H2AX (Ser 139) (sc-101696), anti-ciclina A (sc-596), anti-pAkt (Ser 473) (sc-7985-R), anti-p53 (sc-6243) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology. Os anticorpos secundários policlonais de cabra anti-coelho-IgG (AP 132P) e anti-camundongo-IgG (AP 181P) conjugados com peroxidase, foram adquiridos da Merk Millipore.

3.3. Ensaios moleculares e ensaios *in vitro*

3.3.1. Cultura celular

As linhagens tumorais MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) e HeLa (carcinoma de cérvix humano) foram fornecidas pelo banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, enquanto a linhagem normal McCoy B (fibroblastos de *Mus musculus*) foi fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz. As três linhagens foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e incubadas em estufa de CO₂ (5%) com 95% de umidade a 37°C (ZHONG et al., 2006).

3.3.2. Ensaio do MTT

A citotoxicidade dos compostos contra as linhagens celulares MCF-7, HeLa e McCoy foi avaliada pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Neste ensaio, a viabilidade celular é estimada de acordo com a absorbância referente a concentração de cristais de formazan produzidos pelas células viáveis, a partir da redução do MTT (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas (1x10⁴/poço) em placa 96 poços, incubadas na estufa de CO₂ (5%) por 24 horas e tratadas com concentrações crescentes (0,1- 1000 µM) dos compostos durante 72 horas. Após o tratamento, o meio foi retirado, as células foram lavadas 2x com PBS (salina tamponada de fosfato) e incubadas com uma solução de MTT e meio de cultura (0,5 mg/mL) durante 2 horas. Os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µl de DMSO P.A. e, em seguida, realizou-se a leitura das amostras a 550 nm na multileitora SpectraMax PARADIGMA®. A concentração inibitória de 50% das células (CI₅₀) de cada composto foi determinada pelo software GraphPad Prisma 5.0 (San Diego, EUA).

3.3.3. Ensaio de interação com o DNA

A interação entre os compostos e o CT-DNA (DNA de timo de vitelo) foi mensurada por espectrofotometria de varredura UV-Vis (230 nm a 800 nm). Utilizou-se a concentração fixa de 150 µM do CT-DNA, enquanto os compostos foram analisados em concentrações crescentes (50, 150 e 250 µM) em conjunto e separadamente ao CT-DNA. A solução estoque do CT-DNA foi feita com tampão TRIS-HCl 10 mM e

EDTA 1 mM (pH 7,5). Depois, o CT-DNA foi diluído em 10% de tampão HEPES 10 mM (pH 7) e 74% de água ultrapura em uma cubeta de quartzo, procedendo-se a varredura para obtenção da curva padrão do CT-DNA (150 μ M). Após, realizou-se a varredura do CT-DNA, diluído em 10% de tampão HEPES, água ultrapura e os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em concentrações crescentes. Por fim, a varredura da solução contendo os compostos em concentrações crescentes diluídos em 10% de tampão HEPES, 16% de PBS e água ultrapura foi realizada. Para a análise da interação ou da não interação dos compostos com o CT-DNA, os espectros das amostras contendo apenas os compostos foram subtraídos dos espectros do CT-DNA associado ao composto e comparados com os espectros obtidos do CT-DNA separadamente. Desta forma, determinaram-se as mudanças na absorbância das amostras, bem como o deslocamento do comprimento de onda de absorbância máxima (ZHANG et al., 2004; BALDINI et al., 2003; NAVARRO et al., 2003). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro HITACHI U-2910[®].

3.3.4. Ensaio de intercalação com o DNA

A intercalação dos compostos com o CT-DNA foi mensurada pela substituição da fluorescência do iodeto de propídio (agente intercalante) associado ao CT-DNA. A solução estoque do CT-DNA foi feita com tampão TRIS-HCl 10 mM e EDTA 1 mM (pH 7,5). O iodeto de propídio foi diluído em tampão fosfato 50 mM, contendo 0,1 M de NaCl (pH = 7,4), e seu ponto de saturação nos sítios do CT-DNA determinado através de uma curva com concentrações crescentes do agente. Após a determinação, o CT-DNA (150 μ M) e o iodeto de propídio (300 μ M) e os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em concentrações crescentes (0, 50, 150 e 250 μ M) foram incubados em placa de 96 poços, na proporção 1:3, por 10 minutos em temperatura ambiente. Tampão fosfato 50 mM, contendo 0,1 M NaCl (pH 7,4), foi utilizado nas amostras sem a adição dos compostos. A fluorescência das amostras foi mensurada pela multileitora SpectraMax PARADIGMA[®], sendo utilizado o comprimento de onda de excitação de 492 nm e a fluorescência emitida de 620 nm (SILVEIRA et al., 2008). Os resultados da emissão de fluorescência das amostras com os compostos e o CT-DNA foram comparados com a emissão de fluorescência da amostra contendo somente o CT-DNA.

3.3.5. Ensaio do Cometa

A fragmentação do DNA de células MCF-7 foi avaliada pelo Ensaio do Cometa (SINGH et al., 1988). As células foram semeadas ($2,5 \times 10^4$ /poço) em placa de 24 poços, incubadas na estufa de CO₂ (5%) por 24 horas e tratadas em concentrações subtóxicas, a CI₃₀ (concentração inibitória de 30% das células), dos compostos **IP-Se-05** (15,6 µM) e **IP-Se-06** (7,5 µM) durante 72 horas. Após o tratamento, as amostras foram lavadas com 500 µL de PBS, tripsinizadas por 6 minutos, centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos) e ressuspendidas em 50 µL de PBS. Aliquotas foram diluídas e homogeneizadas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%) a 37°C, sendo transferidas para uma lâmina de microscopia pré-coberta com agarose (1%) e rapidamente cobertas com lamínula. As lamínulas foram retiradas após 10 minutos e as lâminas foram incubadas em solução de lise (2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO, 10 mM TRIS, pH 10) a 4 °C durante 7 dias. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese horizontal com tampão de corrida alcalino (NaOH 300 mM; EDTA 1 mM, pH 13, 8°C) a 25 V e 300 mA por 20 minutos, lavadas com tampão de neutralização (TRIS-HCl 0,4 M; pH 7,4) por 5 minutos, fixadas (15% TCA, 5% ZnSO₄.7H₂O, 5% glicerol) por 10 minutos e secas em temperatura ambiente. Depois, as lâminas foram reidratadas com água deionizada por 5 minutos, coradas com solução de prata (0,001 g/mL AgNO₃) em agitação orbital por 35 minutos. As lâminas foram imersas em solução de parada (0,01% ácido acético) por 5 minutos e depois lavadas 3x com água deionizada (NADIN; VARGAS-ROIG; CIOCCA, 2001). As lâminas foram analisadas no microscópio Olympus BX41[®] e o dano ao DNA expresso como Índice de Dano (escore 0-4) (ROSS et al., 1995). Este índice de dano foi calculado de acordo com o número de núcleos contados X escore de dano (0 a 4) (BURLINSON et al., 2007).

3.3.6. Ensaio clonogênico

A atividade antiproliferativa dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** foi determinada pela formação de colônias por células MCF-7 (FRANKEN et al., 2006). As células foram semeadas (500 células/poço) em placa de 6 poços, incubadas na estufa de CO₂ (5%) por 24 horas e tratadas com a CI₃₀ dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** durante 72 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e

incubadas com meio de cultura novo durante 20 dias. Havendo formação de colônias, procedeu-se a fixação com metanol P.A. por 10 minutos e, em seguida, tingidas com uma solução de cristal violeta (0,2%) por 10 minutos, sendo lavadas com água deionizada 3x. Após o período de secagem, as colônias foram quantificadas e analisadas (KVICINSKI et al., 2012) com auxílio do software ImageJ[®] 1.47.

3.3.7. Ensaio do ciclo celular

Para a análise dos efeitos dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** na progressão do ciclo de células MCF-7, utilizou-se a solução de Iodeto de Propídio/RNase do *kit* Immunostep[®] (Salamanca, Espanha), seguindo-se as instruções do fabricante. As células foram semeadas (2×10^5 /poço) em placas 6 poços e incubadas na estufa de CO₂ (5%) por 24 horas. Transcorrido esse período, os ciclos celulares foram sincronizados com nocodazol (30 ng/mL) por 16 horas e, posteriormente, as células foram tratadas com a CI₃₀ dos compostos durante 72 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas por 6 minutos, centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos), lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% resfriado, sendo mantidas a -20°C *overnight*. Posteriormente, as células foram lavadas com BSA (albumina de soro bovino) 2% e incubadas protegidas da luz por 15 minutos com a solução de IP/RNase em temperatura ambiente. A fluorescência (quantidade de DNA por núcleo) e o percentual de células em cada fase do ciclo celular foram mensurados no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences) e o resultado entre a quantidade de DNA por núcleo/área dos picos gerados calculado pelo *Flowing Software 2.5* (NEIRA, 2003).

3.3.8. Ensaio do tipo de morte celular

O tipo de morte celular (necrose ou apoptose) induzido pelos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em células MCF-7 foi verificado por meio da coloração com iodeto de propídio e laranja de acridina (agentes intercalantes do DNA), possibilitando a diferenciação entre as células viáveis (coloração verde), necróticas (vermelho intenso) ou apoptóticas (laranja). As células foram semeadas (2×10^5 /poço) em placas de 6 poços, incubadas na estufa de CO₂ (5%) por 24 horas e tratadas com a CI₃₀ dos compostos durante 72 horas. Ao término do tratamento, as células foram tripsinizadas por 6 minutos, centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos) e ressuspensas em PBS. Alíquotas das amostras foram

incubadas com iodeto de propídio (100 µg/mL) e laranja de acridina (100 µg/mL) e, em seguida, depositadas em uma lâmina de microscopia cobertas com lamínula para a leitura no microscópio de fluorescência Olympus BX4[®]. Para cada amostra, 300 células foram contabilizadas e fotografadas para registro visual na objetiva de 10x. Os resultados foram analisados pela porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas (OURIQUE et al., 2016; MCGAHON et al., 1995).

3.3.9. Imunoelektroforese

As proteínas envolvidas na sinalização celular de dano ao DNA, parada do ciclo celular e apoptose (γ H2AX, ciclina A, pAkt e p53) foram verificadas por meio de imunoelektroforese, utilizando-se como controle de quantidade de proteína a β -actina. Células MCF-7 foram semeadas (4×10^5 /poço) em placas de 6 poços, incubadas em estufa de CO₂ (5%) por 24 horas e tratadas com a CI₃₀ dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** por 48 horas. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato-salina), adicionando-se tampão de lise RIPA (TRIS-HCl 25mM, NaCl 150 mM, 1% Igepal NP40, 0,1% dodecil sulfato de sódio, 0,25% ácido desoxicólico, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1mM, pH 7,4), suplementado com um coquetel contendo inibidores de proteases (1%) e fosfatases (3%), durante 5-10 minutos. Em seguida, as amostras foram colhidas com auxílio de rastel e centrifugadas (10000 rpm, 15 minutos) para a dosagem de proteínas. Alíquotas do sobrenadante das amostras (diluição 1:30) foram pipetadas em placa de 96 poços e incubadas com *kit* Bradford (Bio-Rad) por 10 minutos. A leitura das amostras foi realizada a 595 nm utilizando a multileitora SpectraMax PARADIGMA[®]. Após a determinação da quantidade de proteínas, alíquotas das amostras foram desnaturadas em 20% de tampão Laemmli (TRIS-HCl 60 mM, 15% glicerol, 1% dodecil sulfato de sódio, 0,9% ditiotreitol, 0,001% azul de bromofenol, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos. As amostras contendo quantidades iguais de proteínas (25µg) foram pipetadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e embebidas em tampão de eletroforese (TRIS 12 mM, 36% glicerol, 2,5% dodecil sulfato de sódio, pH 8,3), realizando-se a corrida eletroforética a 100 V durante 1 hora. Em seguida, o gel foi sobreposto a uma membrana de nitrocelulose, realizando-se a eletrotransferência a 100 V por aproximadamente 2 horas, utilizando-se o tampão de transferência gelado (TRIS 54 mM, 45% glicina, 20% Metanol P.A., pH 8,3). Após a corrida, a membrana foi imersa em uma solução de

bloqueio contendo leite em pó (50 mg/mL) e tampão TTBS (TRIS 198 mM, NaCl 137 mM e 0,01% Tween 20, pH 7,6) por 1 hora sob agitação orbital. A membrana de nitrocelulose foi lavada com TTBS por 10 minutos e incubada com anticorpo primário *overnight* a 4°C, de acordo com a diluição indicada no *datasheet*. Posteriormente, a membrana foi lavada com TTBS e, em seguida, incubada com anticorpo secundário em agitação orbital por 1-2 horas de acordo com a diluição indicada no *datasheet*. Por fim, as membranas foram novamente lavadas e depois incubadas com a solução reveladora do *kit* quimioluminescente Westar Nova[®] 2.0 (Bologna, Itália) e reveladas no fotodocumentador ChemiDoc[™] MP Imaging System (Bio-Rad).

3.4 Análise estatística

Em sua maioria, os resultados foram expressos em Média \pm Desvio Padrão. Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata técnica e biológica. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) *one-way*, e complementado pelo teste *post-hoc* Tukey-Kramer, utilizando o *software* Graphpad Prisma 5.0 (San Diego, EUA). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

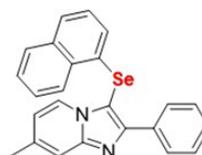
4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade dos compostos para as linhagens celulares

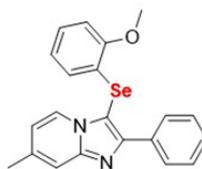
A seleção dos compostos mais citotóxicos foi realizada por meio do ensaio do MTT (MOSMANN, 1983), calculando-se a CI_{50} para as três linhagens celulares: MCF-7, HeLa e McCoy. Os derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas (Figura 11 B) demonstraram respostas citotóxicas diversas, variando a CI_{50} de 7,4 μ M até >100 μ M. Não houve grandes diferenças entre as CI_{50} de cada composto para cada linhagem celular. O composto **IP-01** (molécula protótipo sem o selênio) e o **IP-Se-01** (molécula protótipo com o selênio) obtiveram CI_{50} > 100, enquanto que a maioria dos derivados obtiveram CI_{50} relativamente menores, indicando a importância dos grupamentos diferentes em suas estruturas químicas para a atividade citotóxica (Tabela 1).

Tabela 1 - Citotoxicidade das imidazo[1,2-*a*]piridinas contra um painel de linhagens celulares após o tratamento de 72 horas.

Compostos	CI_{50} (μ M)		
	MCF-7	HeLa	McCoy
IP-01	>100	>100	>100
IP-Se-01	>100	>100	>100
IP-Se-02	65,7	91,7	74,2
IP-Se-03	45,9	36	28
IP-Se-04	>100	>100	>100
IP-Se-05	26	29,9	26,8
IP-Se-06	12,5	7,4	12
IP-Se-07	46,5	70,9	34,9
IP-Se-08	43,2	26,2	83,9
IP-Se-09	77,9	>100	35,7
IP-Se-10	40	87,3	46,5



IP-Se-05



IP-Se-06

Legenda. Os compostos foram testados contra as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa e a linhagem normal McCoy com concentrações de 0,1 a 1000 μ M durante 72 horas. Os resultados foram expressos como a Média de três experimentos independentes (n=3) e a CI_{50} calculada com auxílio do *software* Graphpad Prisma 5.0. Fonte: Dados da autora.

Observando a Tabela 1, torna-se evidente que **IP-Se-05** e **IP-Se-06** causaram maior efeito citotóxico, possuindo as menores CI_{50} para as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa, se comparadas com as CI_{50} dos demais derivados selenilados. Ainda, nota-se que **IP-Se-06** é mais citotóxico que **IP-Se-05**, obtendo $CI_{50} = 12,5 \mu\text{M}$ para MCF-7 e $7,4 \mu\text{M}$ para HeLa. Entretanto, os compostos não apresentaram seletividade para as linhagens tumorais quando comparadas com a linhagem de fibroblastos McCoy (linhagem normal), possuindo valores de CI_{50} bem próximos.

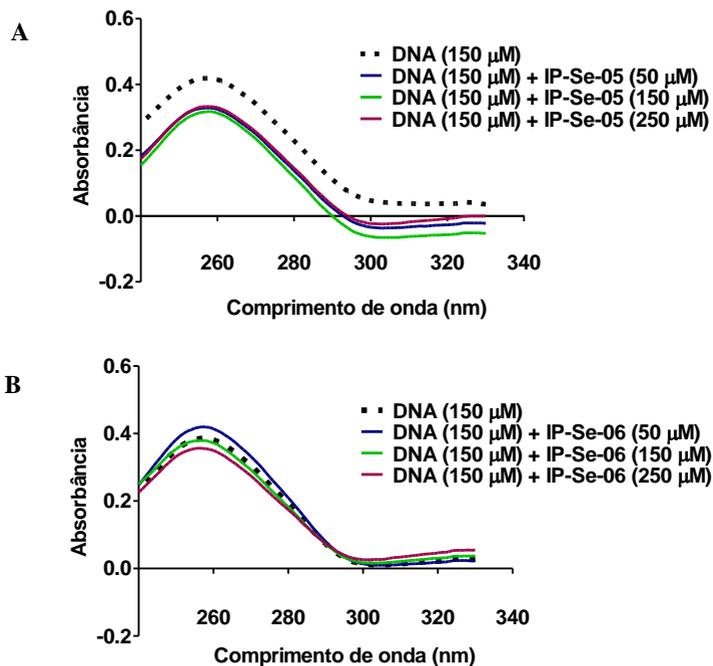
Desta forma, **IP-Se-05** e **IP-Se-06** foram selecionados para a continuidade deste trabalho, escolhendo-se as células MCF-7 pela experiência do LABIOEX com esta linhagem tumoral.

4.2. Interação e intercalação com o CT-DNA

Comparando-se o espectro do CT-DNA sozinho ($150 \mu\text{M}$) com o espectro do CT-DNA ($150 \mu\text{M}$) + compostos em diferentes concentrações ($50\text{-}250 \mu\text{M}$) foi possível visualizar alterações. As alterações na absorbância das amostras de acordo com a concentração dos compostos sugerem interação e modificação na conformação das moléculas de DNA. O composto **IP-Se-05** promoveu um comportamento hipocrômico do espectro (Figura 12 A), enquanto o **IP-Se-06** promoveu o comportamento hipocrômico e hiperocrômico, dependendo da concentração testada (Figura 12 B). Ao aumentar a concentração de **IP-Se-05**, as amostras continuaram com o comportamento hipocrômico, porém, as amostras de **IP-Se-06** demonstraram a passagem do comportamento hiperocrômico para o hipocrômico de acordo com o aumento da concentração.

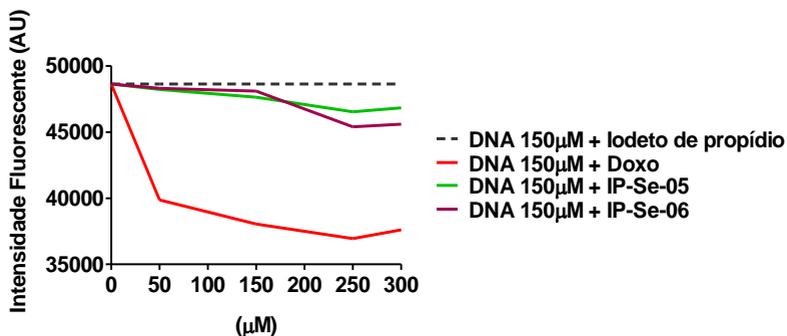
Constatao da interação dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** com o CT-DNA, investigou-se o efeito intercalante dos compostos sobre o CT-DNA através da medição da alteração da fluorescência do iodeto de propídio (IP). A emissão de sua fluorescência estará elevada quando ele estiver intercalado com o CT-DNA. Desta forma, a diminuição da fluorescência das amostras com IP ($300 \mu\text{M}$) + CT-DNA ($150 \mu\text{M}$) após a incubação com compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em diferentes concentrações ($0\text{-}250 \mu\text{M}$) (Figura 13), sugere a substituição do IP pelos compostos. Entretanto, nota-se um maior efeito intercalante da doxorrubicina em comparação ao efeito obtido para os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, mesmo nas maiores concentrações.

Figura 12 - Interação dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 com o CT-DNA.



Legenda. As imidazo[1,2-*a*]piridinas IP-Se-05 (A) e IP-Se-06 (B) foram testadas nas concentrações de 0-250 μM e o CT-DNA em uma concentração fixa de 150 μM . Fonte: Dados da autora.

Figura 13 - Efeito intercalante dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 com o CT-DNA em comparação com a doxorrubicina.

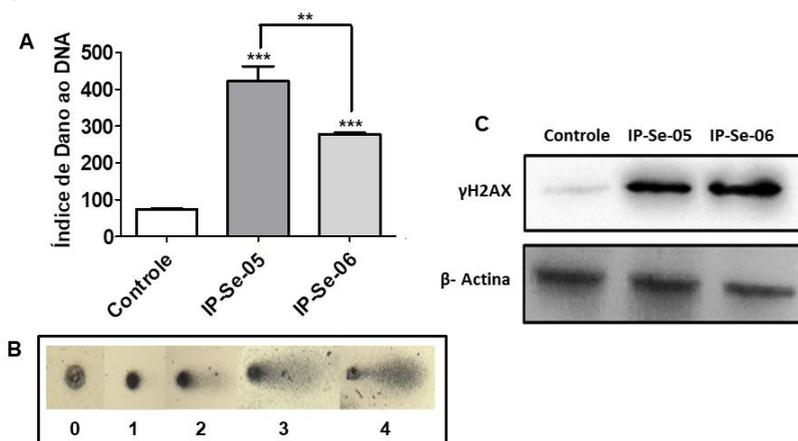


Legenda. A doxorubicina (vermelho) e as imidazo[1,2-*a*]piridinas IP-Se-05 (verde) e IP-Se-06 (rosa) foram testadas nas concentrações de 0-250 μM e o CT-DNA em uma concentração fixa de 150 μM . O iodeto de propídio foi utilizado na concentração de saturação 300 μM . Fonte: Dados da autora.

4.3. Fragmentação do DNA de células MCF-7

Uma vez que os ensaios indicaram interação e intercalação com o CT-DNA, investigou-se a possibilidade destas reações levarem a fragmentação do DNA. Assim, a sua fragmentação foi avaliada em células MCF-7 após o tratamento com **IP-Se-05** e **IP-Se-06** através do ensaio cometa (SINGH et al., 1988). Neste ensaio, avalia-se a quantidade de núcleos com ou sem fragmentação do DNA após a corrida eletroforética das amostras, classificando-se o dano de cada núcleo de acordo com o escore de 0 a 4, sendo 0 os danos basais e 4 o maior dano (Figura 14 B). Com base na quantidade de núcleos para cada escore nas amostras, calculou-se o Índice de Dano ao DNA (Figura 14 A) (BURLINSON et al., 2007; ROSS et al., 1995).

Figura 14 - Índice de Dano ao DNA e expressão de γH2AX em células MCF-7 após o tratamento com IP-Se-05 e IP-Se-06.



Legenda. As células MCF-7 foram tratadas com a CI_{30} de IP-Se-05 (15,6 μM) e IP-Se-06 (7,5 μM) durante 72 horas. (A) Índice de Dano ao DNA de células MCF-7 no controle e nos tratados IP-Se-05 e IP-Se-06. Os resultados foram expressos pela Média \pm Desvio Padrão, $n=3$, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. Os (***) e (**) representam diferença estatística significativa de $p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle e entre os tratados. (B) Escore de dano ao DNA de 0 a 4. (C) Aumento da

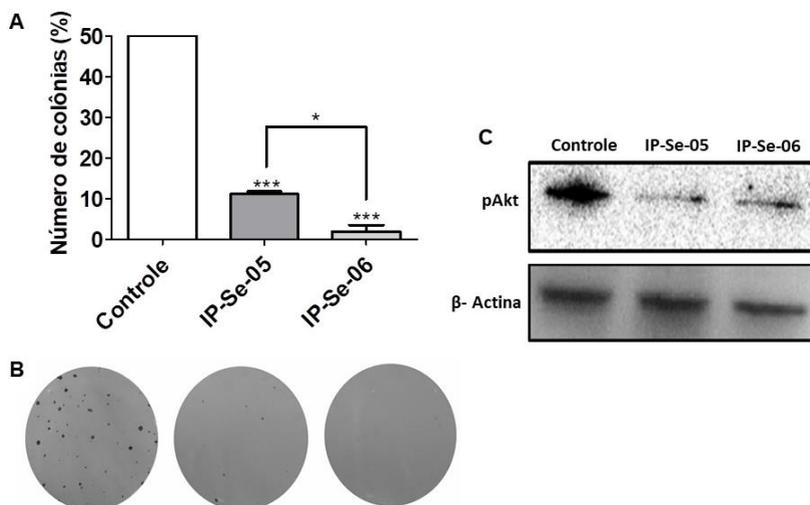
expressão de γ H2AX em células MCF-7 após o tratamento de 48 horas com IP-Se-05 e IP-Se-06. Fonte: Dados e imagens da autora.

Ao comparar o controle com os tratados, constatou-se diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) tanto para o composto **IP-Se-05** quanto para o composto **IP-Se-06**, sendo que **IP-Se-05** obteve o maior Índice de Dano ao DNA com diferença estatística significativa de IP-Se-06 ($p < 0,001$) (Figura 14 A). A fragmentação do DNA de células MCF-7 corrobora com os resultados moleculares obtidos nos ensaios de interação e intercalação com CT-DNA, uma vez que **IP-Se-05** demonstrou maior poder de intercalação e maior fragmentação do DNA se comparado com **IP-Se-06**. Confirmando este resultado, houve aumento da fosforilação de H2AX (γ H2AX) após o tratamento das células, o que geralmente ocorre em situação de dano ao DNA (Figura 14 C).

4.4. Atividade antiproliferativa em células MCF-7

Sabendo que **IP-Se-05** e **IP-Se-06** causam a fragmentação do DNA de células MCF-7, a atividade antiproliferativa e citotóxica de IP-Se-05 e IP-Se-06 foi investigada por meio do ensaio de colônia ou clonogênico (FRANKEN et al., 2006).

Figura 15 - Atividade antiproliferativa e expressão de pAkt após o tratamento de células MCF-7 com IP-Se-05 e IP-Se-06.



Legenda. As células MCF-7 foram tratadas com a CI_{30} de IP-Se-05 (15,6 μ M) e IP-Se-06 (7,5 μ M) durante 72 horas. (A) Porcentagem do número de colônias no controle e nos tratados IP-Se-05 e IP-Se-06. Os resultados foram expressos pela Média \pm Desvio Padrão, $n=3$, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. Os (***) e (*) representam diferença estatística significativa de $p < 0,0001$ e $p < 0,05$, respectivamente, em relação ao controle e entre os tratados. (B) Imagem das amostras do controle, IP-Se-05 e IP-Se-06, respectivamente. (C) Diminuição da expressão da pAkt nos tratados IP-Se-05 e IP-Se-06 em relação ao controle. Fonte: Dados e imagens da autora.

Ao analisar as amostras tratadas com **IP-Se-05** e **IP-Se-06** (Figura 15 B), é possível perceber forte atividade antiproliferativa para as células MCF-7. Ambos compostos reduziram o número de colônias (Figura 15 A) em concentrações subtóxicas (CI_{30}), diferindo significativamente das amostras do controle ($p < 0,0001$). Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo que **IP-Se-06** obteve o menor número de colônias. Confirmando estes dados, os compostos reduziram drasticamente a expressão da pAkt em relação ao controle (Figura 15 C), efeito considerado importante para atividade antiproliferativa desses compostos, uma vez que a Akt é essencial na via de proliferação e sobrevivência celular. Desta forma, **IP-Se-05** e **IP-Se-06** são compostos que podem ser considerados citotóxicos e antiproliferativos.

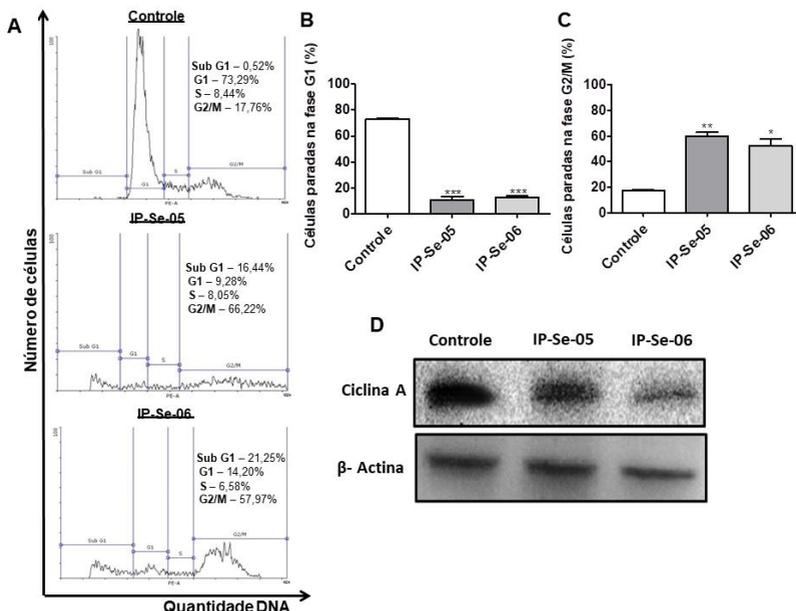
4.5. Parada do ciclo celular em células MCF-7

Pelo fato de **IP-Se-05** e **IP-Se-06** apresentarem importante atividade antiproliferativa, foi investigado também seu efeito sobre o ciclo celular. A progressão do ciclo celular em células MCF-7 após o tratamento com a CI_{30} de **IP-Se-05** e **IP-Se-06** foi avaliada por meio de citometria de fluxo utilizando o *kit* Immunostep[®]. A solução de iodeto de propídio + RNase marca o DNA das células fixadas e o citômetro identifica pela quantidade de DNA e tamanho celular em que etapa do ciclo ocorreu a parada (Figura 16 A).

Nota-se o aumento significativo do número de células na fase sub-G1, indicando morte celular. Além disso, houve a parada do ciclo celular na fase G2/M após o tratamento das células MCF-7 com **IP-Se-05** (66,22%, $p < 0,01$) e **IP-Se-06** (57,97%, $p < 0,05$), havendo diferença estatística significativa em relação ao controle (Figura 16 C). Pode-se observar também a diminuição significativa da quantidade de células paradas na fase G1 (Figura 16 B) tanto para as amostras tratadas com

IP-Se-05 (9,28%, $p < 0,0001$) quanto para as amostras tratadas com **IP-Se-06** (14,20%, $p < 0,0001$).

Figura 16 - Efeito dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 na progressão do ciclo de células MCF-7 e expressão da ciclina A.



Legenda. As células MCF-7 foram tratadas com a CI_{30} de IP-Se-05 (15,6 μ M) e IP-Se-06 (7,5 μ M) por 72 horas. (A) Os gráficos e porcentagens da quantidade de DNA em cada fase do ciclo celular foram obtidos e calculados pelo *Flowing Software 2.5*. (B) Porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular no controle e nos tratados IP-Se-05 e IP-Se-06. (C) Porcentagem de células na fase G2/M do ciclo celular no controle e nos tratados IP-Se-05 e IP-Se-06. Os resultados foram expressos pela Média \pm Desvio Padrão, $n=3$, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. Os (***) (***) e (*) representam diferença estatística significativa de $p < 0,0001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente, em relação ao controle. (D) Diminuição da expressão de ciclina A após tratamento de 48 horas com IP-Se-05 e IP-Se-06. Fonte: Dados e imagens da autora.

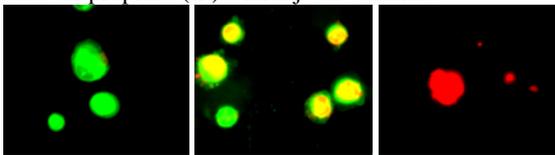
Corroborando com a redução da expressão de pAkt e com a parada do ciclo em G2/M, o tratamento das células diminuiu a expressão da ciclina A, uma importante proteína promotora da passagem da fase G2 do ciclo celular para mitose. Além disso, o efeito de **IP-Se-06** na expressão de ciclina A foi mais pronunciado do que **IP-Se-05** (Figura 16

D). Estes dados corroboram com os resultados obtidos no ensaio clonogênico para ambos compostos, demonstrando mais uma vez sua capacidade antiproliferativa.

4.6. Tipo de morte celular induzida em células MCF-7

Constatando-se a intercalação e fragmentação do DNA e a atividade antiproliferativa exercida pelos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, verificou-se o tipo de morte celular induzido em células MCF-7 por meio da coloração das amostras com iodeto de propídio (100 µg/mL) e laranja de acridina (100 µg/mL) (MCGAHON et al., 1995). Neste ensaio, as células viáveis adquirem a coloração fluorescente verde, as células apoptóticas a coloração amarelo/alaranjada e as células necróticas a coloração vermelha (Figura 17), contabilizando-se a porcentagem de cada tipo de célula nas amostras.

Figura 17 - Células viáveis, apoptóticas e necróticas, respectivamente, após coloração com iodeto de propídio (IP) e laranja de acridina.



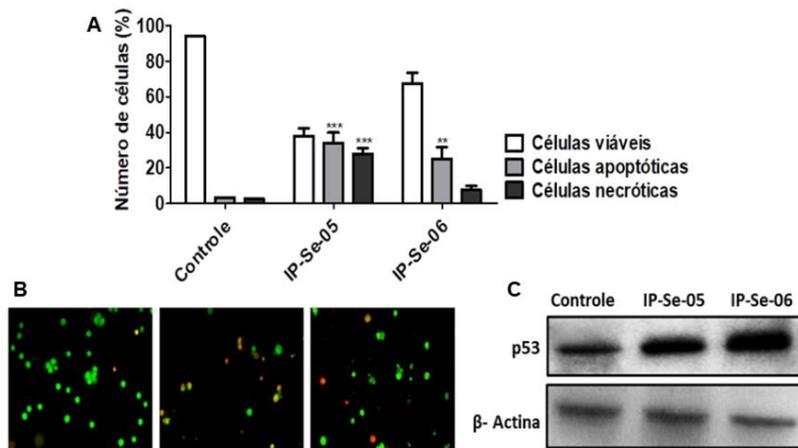
Legenda. Células viáveis (verde), células apoptóticas (amarelo/alaranjado) e células necróticas (vermelho intenso), respectivamente. Fonte: Imagens da autora.

Ao analisar as amostras (Figura 18 B), houve diferença estatística significativa entre o controle e os tratamentos, de acordo com o tipo de morte induzido. As amostras tratadas com **IP-Se-05** demonstraram maior quantidade de células apoptóticas e necróticas, enquanto as amostras de **IP-Se-06** demonstraram maior quantidade de células apoptóticas (Figura 18 A). Além disso, as amostras tratadas com **IP-Se-05** e **IP-Se-06** obtiveram uma maior expressão de p53 em relação ao controle, o que corrobora com a indução de morte por apoptose dessas células, pois é esta proteína-chave que inicia a transcrição e ativação das proteínas pró-apoptóticas.

Como **IP-Se-06** induziu de forma mais pronunciada a apoptose nas células MCF-7, houve maior expressão de p53 para este composto do que para **IP-Se-05** (Figura 18 C). Os dados corroboram com os resultados obtidos no ensaio cometa, em que **IP-Se-05** obteve um Índice

de Dano ao DNA significativamente maior do que **IP-Se-06**, justificando a porcentagem maior de células necróticas.

Figura 18 - Tipo de morte celular induzido e expressão de p53 em células MCF-7 após o tratamento com compostos IP-Se-05 e IP-Se-06.



Legenda. As células MCF-7 foram tratadas com a CI_{30} de IP-Se-05 (15,6 μ M) e IP-Se-06 (7,5 μ M) por 72 horas. As amostras foram incubadas com IP (100 μ g/mL) e laranja de acridina (100 μ g/mL) e 300 células/amostra contadas em microscópio de fluorescência. (A) Porcentagem do número de células viáveis, apoptóticas e necróticas no controle e tratados IP-Se-05 e IP-Se-06. Os resultados foram expressos pela Média \pm Desvio Padrão, $n=3$, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. Os (***) e (**) representam diferença estatística significativa de $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao controle. (B) Imagem das amostras do controle, IP-Se-05 e IP-Se-06, respectivamente. (C) Aumento da expressão de p53 após o tratamento com IP-Se-05 e IP-Se-06 em relação ao controle. Fonte: Dados e imagem da autora.

Desta forma, os ensaios biológicos *in vitro* e moleculares sugerem maior atividade citotóxica e antiproliferativa de **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em relação ao controle por: interagirem/intercalarem com o DNA, gerando sua fragmentação e aumento da expressão de γ H2AX; causarem a redução da formação de colônias e a parada do ciclo celular em G2/M, com a redução da expressão da ciclina A e da pAkt; além de induzirem a morte celular por apoptose das células tumorais MCF-7 pelo aumento da expressão de p53.

A diferença no tipo de morte celular induzido por **IP-Se-05** e **IP-Se-06** sugere possíveis diferenças entre seus mecanismos de ação,

provavelmente, devido aos diferentes grupamentos funcionais em suas estruturas químicas. **IP-Se-06** foi considerado o composto mais promissor, obtendo maior atividade citotóxica e antiproliferativa em menor concentração, além de morte celular majoritariamente por apoptose, maior expressão de p53 e menor expressão de ciclina A.

5. DISCUSSÃO

Os primeiros registros de câncer em seres humanos estão descritos em papiros e foram observados em múmias da época do Egito Antigo (DAVID; ZIMMERMAN, 2010). Atualmente, sabe-se que o câncer é originado por um conjunto de fatores mutagênicos exógenos e endógenos, desenvolvendo-se em vários tecidos, podendo levar ao óbito (INCA, 2016). Apesar de ser uma doença antiga, o câncer ainda causa grande impacto na qualidade de vida de milhões de pessoas e nas taxas de mortalidade no mundo (IARC, 2014).

Além de alguns tipos de cânceres serem extremamente agressivos (invasivos), a falta de diagnóstico precoce e a toxicidade das terapias farmacológicas utilizadas na clínica médica atual são os maiores problemas para o tratamento efetivo e o aumento da sobrevivência da população atingida por esta doença (TORRE, 2015). Ainda, a procura de novos fármacos antitumorais que melhorem o tratamento de pessoas acometidas pelo câncer de mama é essencial na medida em que este é o tipo de câncer mais recorrente e está entre os que mais causam óbitos no Brasil entre as mulheres.

Como parte dessa busca por novos fármacos antitumorais, o presente trabalho investigou dez derivados inéditos de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas (Figura 11 B). De acordo com o ensaio de citotoxicidade, os compostos que apresentaram maior atividade citotóxica foram os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**. **IP-Se-05** obteve $CI_{50} = 26 \mu\text{M}$ para MCF-7 e $29,9 \mu\text{M}$ para HeLa, enquanto que **IP-Se-06** obteve $CI_{50} = 12,5 \mu\text{M}$ para MCF-7 e $7,4 \mu\text{M}$ para HeLa, sendo este último a menor CI_{50} obtida dentre todos os derivados (Tabela 1).

A atividade citotóxica de derivados de imidazopiridinas contra linhagens tumorais como câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-435), câncer hepático (HepG2, Huh-7), câncer de pulmão (A549), glioblastoma (U87MG), câncer de cérvix (HeLa) e câncer de próstata (LNCaP C-81) é investigada em diversos estudos. Os ensaios de MTT nesses trabalhos demonstram CI_{50} semelhante aos resultados obtidos para as imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas deste estudo (PEČIUKAITYTĖ-ALKSNĖ et al., 2017; BELLET et al., 2017; RASSOKHINA et al., 2016; INGERSOLL et al., 2015; BAO et al., 2009; BYTH et al., 2006). Entretanto, poucos trabalhos avaliaram o efeito antiproliferativo dos compostos, diferentemente deste trabalho, que evidenciou a importante atividade antiproliferativa exercida pelos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**.

Os compostos orgânicos contendo átomos calcogênicos (O, S, Te, Se) também têm sido apontados como citotóxicos para diversas linhagens tumorais. De acordo com Cruz e colaboradores (2016), a adição de grupamentos redox em um fármaco, como o selênio, promove a otimização do seu efeito antitumoral. Martins e colaboradores (2015), por exemplo, demonstraram que os flavonoides quercitina e crisina causaram um aumento significativo da sua atividade citotóxica (de 4 a 18x) após a adição do selênio na estrutura química, contribuindo-se também para a seletividade contra a linhagem tumoral MCF-7.

Resultados semelhantes foram relatados por Plano e colaboradores (2016), ao adicionar o selênio ao núcleo do ácido acetilsalicílico, adquirindo significativa citotoxicidade contra linhagens tumorais, enquanto as linhagens de fibroblastos (MEF e nHDF) não foram afetadas. Porém, para os compostos **IP-01** (composto base sem o selênio) e **IP-Se-01** (composto base com selênio) (Tabela 1), não houve grandes diferenças entre as CI_{50} , ocorrendo maior diferença quando diferentes grupamentos funcionais foram adicionados aos seus derivados.

Compostos citotóxicos contendo selênio normalmente demonstram pouco efeito em células normais. Clement, Thompson e Ganther (2000) demonstraram em um estudo *in vivo* que células normais não são sensíveis à ação citotóxica e antiproliferativa do selênio, enquanto que células tumorais apresentam certos defeitos em suas vias de sinalização, auxiliando a ação do selênio na inibição do crescimento tumoral. No caso dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, não houve seletividade para as células MCF-7 e HeLa quando comparadas com a linhagem McCoy, ou seja, a CI_{50} teve valores muito próximos entre as linhagens.

Segundo Badisa e colaboradores (2009), a seletividade de um composto pode ser mensurada pelo índice de seletividade ($IS = CI_{50}$ da linhagem normal/ CI_{50} da linhagem tumoral), sendo um composto considerado seletivo se $IS > 2$. **IP-Se-05** e **IP-Se-06** obtiveram $IS < 1$ para as linhagens MCF-7 e HeLa. Apesar do composto **IP-Se-08** obter um $IS = 3,20$ para HeLa, sua CI_{50} para esta linhagem foi praticamente o dobro daquela observada para **IP-Se-05** e **IP-Se-06**.

Estes dados sugerem a necessidade de se fazer modificações nas estruturas químicas destas duas imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas, de forma a manter a citotoxicidade para as linhagens tumorais sem, entretanto, atingir as linhagens normais. Outra estratégia interessante seria avaliar a citotoxicidade destes compostos em outras linhagens tumorais, uma vez que tipos celulares diferentes apresentam respostas

biológicas diversas. Desta forma, **IP-Se-05** e **IP-Se-06** foram escolhidos para continuidade do estudo por demonstrarem os melhores CI_{50} frente às células MCF-7, linhagem extensivamente estudada no LABIOEX. Modificações estruturais desses compostos e ensaios com outras linhagens celulares continuam em estudo pelo nosso grupo de pesquisa.

Como parte da investigação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** foi avaliado o tipo de interação que ambos compostos poderiam exercer com o DNA por meio de ensaios moleculares. A interação com o CT-DNA pode ser investigada por alterações na absorção do espectro de luz do DNA após a adição de um composto. O hipercromismo (aumento da absorbância) é o comportamento do espectro que sugere ligações não covalentes (forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, interações de van der Waals, etc.) entre os compostos e o DNA. Já o hipocromismo (diminuição da absorbância) é o comportamento do espectro que sugere a intercalação do composto com o DNA, geralmente, ocasionada por ligações covalentes nos pares de bases (KASHANIAN et al., 2012).

Dos ensaios realizados com o CT-DNA, os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** provocaram alterações em seu espectro. **IP-Se-05** obteve um espectro com comportamento hipocrômico para todas as concentrações testadas (Figura 12 A), já o comportamento do espectro de **IP-Se-06** variou entre hipocrômico e hiperocrômico de maneira dose-dependente, quanto mais alta a concentração, mais hipocrômico (Figura 12 B), sugerindo que **IP-Se-05** e **IP-Se-06** possuem a capacidade de interagir com o DNA. Compostos capazes de interagir com o DNA podem se inserir nos sulcos menores e maiores ou ainda intercalar com esta biomolécula, por meio da alquilação dos pares de bases ou da sua inserção entre eles. Essas interações normalmente modificam a estrutura do DNA, muitas vezes impedindo a replicação da material genético, causando a quebra de suas fitas (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

Um tipo de interação capaz de causar danos ao DNA é a intercalação. Sabendo disso, ambos os compostos foram analisados quanto à capacidade de intercalar com o CT-DNA pela retirada do iodeto de propídio previamente intercalado com esta biomolécula após a adição de **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas amostras, diminuindo-se a intensidade da fluorescência emitida por elas. Entretanto, o potencial de intercalação desses compostos foi menos expressivo que o potencial de intercalação da doxorubicina, sendo que **IP-Se-05** intercalou em menores concentrações do que **IP-Se-06** (Figura 13).

Um estudo realizado por Marsch e colaboradores (1994) sugere a ligação não covalente de derivado de imidazo[4,5-*b*]piridina nos sulcos do DNA através da análise por ressonância magnética nuclear (NMR), sugerindo que imidazopiridinas talvez possam interagir com o DNA através dos sulcos menores e maiores. Entretanto, não foram encontrados trabalhos que avaliassem o potencial intercalante de derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas, sendo um diferencial deste trabalho e do mecanismo de ação relacionado aos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, podendo-se futuramente investigar mais profundamente como essa intercalação ocorre e quais as interações moleculares envolvidas.

A interação/intercalação com o DNA normalmente está associada ao dano de DNA. O dano ao DNA é documentado em vários estudos como a causa da citotoxicidade de imidazopiridinas. Aminas aromáticas heterocíclicas, como as imidazopiridinas, são conhecidas por sua capacidade de induzir quebras nas fitas do DNA (PFAU et al., 1999). Para analisar o desfecho dessa capacidade de intercalação que **IP-Se-05** e **IP-Se-06** apresentaram, foi avaliada a capacidade de ambos compostos causarem a fragmentação do DNA de células MCF-7, calculando-se o Índice de Dano ao DNA por meio do ensaio do cometa. Constatou-se que houve um aumento significativo do índice em comparação ao controle (Figura 14 A) e o aumento da fosforilação de H2AX (γ H2AX) para ambos tratamentos (Figura 14 C), reforçando a evidência de dano ao DNA, pois esta proteína participa da sinalização inicial para mobilização da maquinaria de reparo e para a ativação da p53, resultando em parada do ciclo celular e início do processo de apoptose.

Estudos mostram que o dano ao DNA causado por derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas estão fortemente relacionados ao efeito citotóxico em células Jurkat (leucemia linfóide aguda do tipo T) e HeLa, enquanto aumentaram a fosforilação de H2AX (YU et al., 2008). Neste sentido, El-Awady e colaboradores (2016) demonstraram que enquanto a doxorubicina promoveu a fragmentação do DNA de células MCF-7, aumentando a fosforilação de H2AX, um derivado de imidazo[1,2-*a*]piridina inibiu a reparação deste dano, diminuindo a expressão da ATR (proteína importante para o recrutamento da maquinaria de reparo do DNA), e induzindo a apoptose.

A causa do efeito citotóxico dos compostos organosselênicos em células de linhagens tumorais também tem sido relacionada ao dano de DNA, porém, provocado pelo acúmulo de EROs intracelular. A ligação do selênio com grupamentos tiol (-SH) e/ou selenocisteínas (Cys-Se) acarreta na inibição de algumas enzimas antioxidantes importantes para

o balanço-redox das células, aumentando os níveis de EROs. Elas danificam tanto o DNA quanto proteínas, organelas e membranas, ativando o processo de apoptose (LEE e JEONG, 2012).

Um trabalho realizado com células MCF-7 demonstrou que compostos organosselênicos podem inibir a GSH e TrxR, aumentando os níveis de EROs e ocasionando a redução do potencial da membrana mitocondrial (MARTINS et al., 2015). Plano e colaboradores (2016) também obtiveram resultados semelhantes ao adicionar o selênio na molécula do ácido acetilsalicílico. Eles verificaram que células HCT116 (linhagem de câncer colorretal) tratadas com este composto tiveram os níveis de EROs elevados em 66%. Ainda, Shi e colaboradores (2003) constataram a inibição da TrxR em duas linhagens tumorais de próstata e a consequente fragmentação do DNA.

Neste mesmo contexto, Cheng e colaboradores (2012) mostraram que a adição do selênio ao fármaco temozolomida desencadeou a fosforilação da H2AX em duas linhagens de glioma, enquanto que o fármaco original não obteve esta resposta. Cao, Durrani e Rustum (2004) demonstraram a fosforilação da Chk2 (ativada pela ATM), indicando dano ao DNA após o tratamento com compostos contendo selênio. Da mesma maneira, Zhou e colaboradores (2003) constataram a fragmentação do DNA de células HL-60 (leucemia mielóide aguda) por meio do ensaio cometa, confirmado pelo aumento da fosforilação de H2AX e da expressão de ATM.

Normalmente, a parada do ciclo celular ocorre após a detecção de algum dano, como danos ao DNA (BARNUM; O'CONNELL, 2014). Sabendo que compostos capazes de causar danos ao DNA podem obter um efeito antiproliferativo, foi realizado o ensaio clonogênico e a análise do ciclo das células MCF-7. Ambos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** exerceram forte atividade antiproliferativa, reduzindo significativamente o número de colônias das células MCF-7 (Figura 15 A) e parando o ciclo celular em G2/M (Figura 16 C).

O tratamento das células também causou a redução da expressão da pAkt (Figura 15 C) e da ciclina A (Figura 16 D), corroborando com os demais resultados, pois ambas as proteínas são essenciais para proliferação das células. Entretanto, **IP-Se-06** demonstrou maior efeito citotóxico e antiproliferativo no ensaio clonogênico se comparado ao **IP-Se-05**, tendo também diminuído mais fortemente a expressão de ciclina A.

Derivados de imidazopiridinas são reconhecidos como potentes compostos antiproliferativos. Estudos realizados com células MCF-7 e

LNCaP C-81 mostraram redução significativa no número de colônias de ambas células tumorais (INGERSOLL et al., 2015; MARTINS et al., 2015; BYTH et al., 2006). Ainda, na grande maioria dos trabalhos pesquisados, as imidazo[1,2-*a*]piridinas provocaram a parada do ciclo celular na fase G2/M, devido ao dano de DNA ou a inibição de enzimas importantes para progressão e sinalização da proliferação, como a pAkt (SAYEED et al., 2017; EL-AWADY et al., 2016; JUNG et al., 2013; KAMAL et al., 2013; LEE, et al., 2013).

Os compostos organoselênicos também são descritos por possuir atividade antiproliferativa contra células tumorais. Eles podem reduzir o número de colônias de linhagens celulares de gliomas humanos (CHENG, et al., 2012) e induzir a parada do ciclo celular em outras linhagens em diferentes fases, como a fase G1 (PLANO et al., 2016; YANG, et al., 2005), fase S (SHI et al., 2003) e também fase G2/M dependente da ativação de p53 (GOEL et al., 2006).

A redução da expressão de ciclina A observada neste trabalho corrobora com a parada do ciclo celular na fase G2/M, uma vez que ela regula a passagem da fase S para fase G2, e em conjunto com a ciclina B, proporciona a entrada da célula na fase mitótica (BOER et al., 2008). A diminuição da expressão de pAkt também é importante para a parada do ciclo celular, uma vez que a ativação da via PI3K/Akt/mTOR é essencial para a sobrevivência e para a proliferação celular. Ela ativa proteínas antiapoptóticas e diversas proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular e da angiogênese, incluindo as ciclinas, sendo a inibição desta via necessária para ativação da apoptose (CHEAIB; AUGUSTE; LEARY, 2015).

Ao fragmentar o DNA e induzir a parada do ciclo celular, os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** provocaram um efeito citotóxico e antiproliferativo em células MCF-7. Assim, como forma de investigar o tipo de morte celular induzido por esses compostos, foi analisada a coloração com iodeto de propídio e laranja de acridina das células MCF-7, contabilizando-se as células viáveis, apoptóticas e necróticas (Figura 17). O tratamento das células com **IP-Se-05** induziu de forma significativa a morte celular tanto por apoptose quanto por necrose, enquanto que o composto **IP-Se-06** provocou a morte celular majoritariamente por apoptose (Figura 18 A).

Sugere-se que **IP-Se-05** tenha um maior número de células necróticas do que **IP-Se-06** por seu maior potencial de intercalação (Figura 13) e por causar o maior Índice de Dano ao DNA (Figura 14), já que normalmente a intensidade do dano influencia no tipo de morte

celular. Além disso, a morte celular por apoptose é a mais desejável para a eliminação de células tumorais, uma vez que este tipo de morte geralmente não acarreta em processo inflamatório (ELMORE, 2007).

Neste sentido, vale ressaltar que ambos os tratamentos aumentaram a expressão da proteína p53 em células MCF-7. No entanto, este aumento foi mais proeminente após o tratamento das células com **IP-Se-06** do que para **IP-Se-05** (Figura 18 C), o que faz sentido ao perceber que este composto provocou o aumento significativo predominantemente da apoptose. A indução da apoptose está relacionada à ativação da p53, pois esta proteína desencadeia a transcrição e a ativação de proteínas pró-apoptóticas, promovendo a inibição de proteínas antiapoptóticas e causando a perda do potencial de membrana mitocondrial (HASSAN et al., 2014).

As imidazo[1,2-*a*]piridinas são conhecidas por induzirem apoptose em diversas linhagens tumorais (MCF-7, Huh-7, HCT116, A549, etc.), sendo detectada por meio de ensaios variados como a marcação da anexina V, a fragmentação e condensação da cromatina, a perda do potencial da membrana mitocondrial, a ativação das caspase-3 e 7, aumento da expressão de p53 e Bax/Bak, diminuição de Bcl-2 e Bcl-xL, clivagem da PARP, diminuição de pAkt/p-mTOR, entre outros (XI et al., 2017; EL-AWADY et al., 2016; JUNG et al., 2013; KAMAL et al., 2013; LEE, et al., 2013).

Da mesma forma, os compostos organoselênicos são conhecidos por inibir a tumorigênese e induzir a apoptose, alterando a expressão e/ou a atividade de proteínas reguladoras do ciclo celular (ciclina e CDKs) e de proteínas relacionadas à manutenção da integridade mitocondrial (p53, Bax, Bcl-2), além de proteínas importantes para as vias de sinalização da proliferação, do crescimento e da sobrevivência celular (pAkt, mTOR, PI3K) (PLANO et al., 2016; CRUZ et al., 2016; SOUZA et al., 2015; MARTINS et al., 2015; CHENG, et al., 2012; GOEL et al., 2006; YANG, et al., 2005; SINHA e EL-BAYOUMY, 2004; SHI et al., 2003). Entretanto, destaca-se que entre os trabalhos encontrados tanto para imidazo[1,2-*a*]piridinas quanto para compostos organoselênicos, não houve a investigação de outros tipos de morte celular além da apoptose e da autofagia, não permitindo uma análise mais profunda da morte celular por necrose provocada significativamente pelo **IP-Se-05**.

As diferenças de resultados para citototoxicidade entre os derivados e entre os mecanismos de ação para os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** demonstram a forte influência que os diferentes

grupamentos funcionais exercem na atividade biológica destes compostos. O composto **IP-Se-05** possui o grupamento naftaleno, enquanto **IP-Se-06** possui o grupamento 2-metoxifenil. Por ser aromático, o naftaleno torna **IP-Se-05** mais lipofílico, proporcionando uma capacidade maior para interagir com biomoléculas hidrofóbicas. Já o grupamento 2-metoxifenil torna **IP-Se-06** mais polar, eletrofílico (pobre em elétrons) e hidrofílico, aumentando sua solubilidade e a capacidade de fazer ligações covalentes ou interações com biomoléculas nucleofílicas (rica em elétrons), como o DNA.

Yuan e colaboradores (2014) observaram que compostos contendo anéis pirazol, tiazol e naftaleno possuem atividade citotóxica contra células HeLa. Os compostos contendo o grupamento naftaleno, por exemplo, obtiveram as melhores CI_{50} . Ainda, através de análises computacionais, os autores também demonstraram a importância do grupamento naftaleno na interação entre estes compostos e o EGFR (receptor do fator de crescimento endotelial), promovendo sua inibição através de interações hidrofóbicas entre o naftaleno e uma lisina do sítio ativo do receptor.

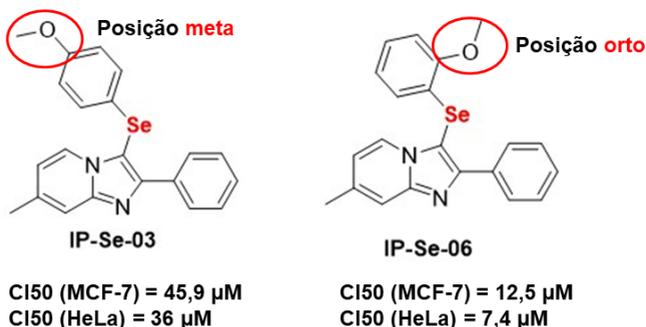
Em outro trabalho, Hille e Gust (2010) estudaram a contribuição do grupamento metoxi para a atividade citotóxica e antiproliferativa de derivados do núcleo [FeIII(salofeno)Cl]. A adição do grupamento metoxi a esta molécula causou um aumento do efeito citotóxico em células MCF-7, MDA-MB-231, HT-29 de maneira tempo-dependente, variando de acordo com a posição deste grupamento na estrutura química da molécula. Ainda, a adição do grupamento metoxi diminuiu a taxa de recuperação das células tumorais após a retirada do tratamento.

Este fato também foi observado no presente trabalho, quando se compara a citotoxicidade causada pelos derivados **IP-Se-06** e **IP-Se-03** contra as linhagens tumorais. Ambos possuem o grupamento metoxifenil ligado covalentemente ao selênio, porém, o metoxi está em posições diferentes no anel aromático (fenil), obtendo CI_{50} diferentes para MCF-7 e HeLa. No grupamento 2-metoxifenil de **IP-Se-06**, o metoxi se encontra na posição orto (paralelo) em relação ao selênio, sendo o único dentre os dez derivados com este tipo de posição, enquanto que no grupamento 4-metoxifenil de **IP-Se-03**, o metoxi está na posição meta (oposto) em relação ao selênio (Figura 19).

De maneira interessante, a proximidade do metoxi com selênio proporcionada pela sua posição orto no anel aromático causa a redução significativa da CI_{50} de **IP-Se-06** (3x menor) quando comparado a CI_{50} de **IP-Se-03**, no qual a posição meta afasta o metoxi do selênio. Sugere-

se que a proximidade do metoxi com o selênio influencie nas possíveis interações de **IP-Se-06** com biomoléculas, aumentando sua citotoxicidade, sendo o composto mais promissor dentro todos os derivados testados.

Figura 19 – Estrutura química dos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas selenilados IP-Se-03 e IP-Se-06.



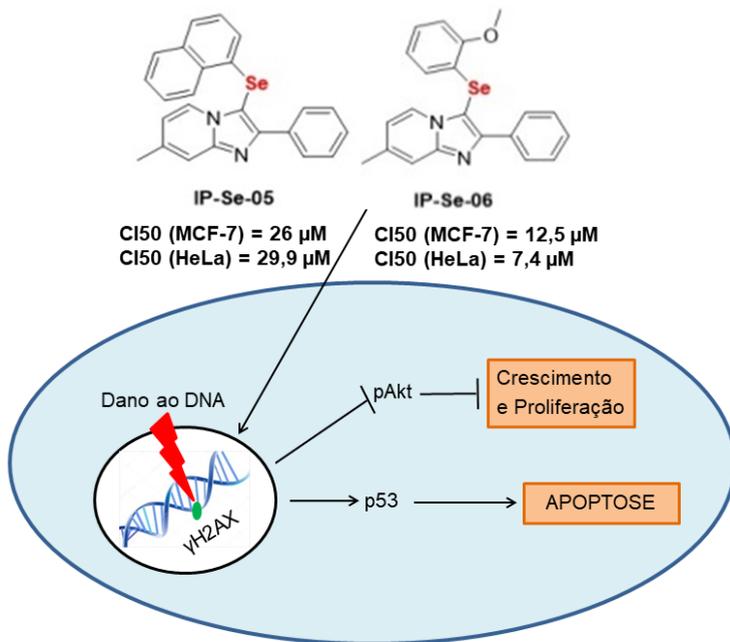
Legenda. Estrutura química de IP-Se-03 com o grupamento 4-metoxi na posição meta em relação ao selênio e IP-Se-06 com o grupamento 2-metoxi na posição orto em relação ao selênio, melhorando o efeito citotóxico deste derivado. Fonte: Adaptado de Rafique e colaboradores, 2016.

Por fim, os dados da literatura científica apresentados resumidamente neste trabalho sustentam os resultados obtidos para os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, considerando-se o composto **IP-Se-06** como o mais promissor pela menor CI_{50} , maior efeito antiproliferativo e pelo tipo de morte celular induzido (apoptose), talvez pela posição orto entre o metoxi e o selênio. Sugere-se como hipótese de mecanismo de ação para ambos compostos a intercalação e a fragmentação do DNA, induzindo a parada do ciclo celular na fase G2/M, a inibição da via PI3K/Akt/mTOR e a morte celular por apoptose via ativação da p53, explicando os efeitos citotóxicos e antiproliferativos dos compostos (Figura 20).

Além disso, tanto o núcleo imidazo[1,2-*a*]piridina quanto compostos organosselênicos são descritos como inibidores diretos de proteínas importantes para a divisão, proliferação e sobrevivência celular como as tubulinas (LIU, et al., 2017; SAYEED et al., 2017; KAMAL et al., 2013), o receptor tirosina cinase c-Met (YANG, et al., 2017; LI e colab., 2016), proteína motora dos fusos CENP-E (HIRAYAMA et al., 2015), a pAkt (KIM et al., 2014) e a PI3K (JUNG

et al., 2013; LEE, et al., 2013). Estes podem ser possíveis alvos para os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, sendo a inibição da polimerização das tubulinas um alvo interessante a ser investigado, já que ambos compostos induziram a parada do ciclo celular na fase G2/M.

Figura 20 – Hipótese do mecanismo de ação *in vitro* da imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas IP-Se-05 e IP-Se-06 em células MCF-7.



Legenda. Hipótese do mecanismo de ação envolvido na indução da morte celular por apoptose em células MCF-7 pelos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06
Fonte: Imagem da autora.

Assim, há muito a ser estudado em relação a esses compostos, principalmente o papel do selênio na citotoxicidade e no efeito antiproliferativo de **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, devendo-se investigar a inibição da GSH e da TrxR, além do aumento de EROs intracelular. Também, é importante lembrar que estes compostos não foram seletivos para as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa ($IS < 2$), sendo necessário novos testes com outras linhagens tumorais e a alteração de suas estruturas químicas de forma a aumentar sua seletividade mantendo seu efeito citotóxico.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- Das onze imidazo[1,2-*a*]piridinas testadas, dez delas seleniladas, duas (**IP-Se-05** e **IP-Se-06**) se mostram promissoras quanto a atividade citotóxica, porém ambas não demonstraram seletividade para linhagens tumorais;
- Tanto **IP-Se-05** quanto **IP-Se-06** podem interagir/intercalar com o CT-DNA, ocasionando a fragmentação do DNA e o aumento da fosforilação de γ H2AX em células MCF-7;
- **IP-Se-05** e **IP-Se-06** exerceram potente atividade citotóxica e antiproliferativa em células MCF-7 em concentrações subtóxicas (CI₃₀);
- O efeito antiproliferativo de **IP-Se-05** e **IP-Se-06** foi evidenciado pela redução da formação de colônias de células MCF-7 e pela parada do ciclo celular na fase G2/M, incluindo a redução da expressão da ciclina A e da pAkt, possivelmente devido à fragmentação do DNA;
- A parada do ciclo celular direcionou as células MCF-7, preferencialmente, para a morte celular por apoptose, desencadeada pelo aumento da expressão de p53;
- O composto **IP-Se-06** se mostrou mais promissor do que **IP-Se-05** por exercer potente atividade citotóxica e antiproliferativa, maior inibição da expressão de ciclina A, além de induzir de forma mais proeminente a morte celular por apoptose e maior expressão de p53;

7. PERSPECTIVAS

Em pesquisas futuras, pretende-se realizar:

- Ensaios biológicos *in vitro* com outras linhagens tumorais;
- A otimização das estruturas químicas dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em relação a sua solubilidade, citotoxicidade e seletividade;
- Ensaios que proporcionem um maior entendimento do mecanismo de ação de **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em células MCF-7, como inibição de tubulinas, da GSH e da TrxR e a geração de EROs, incluindo-se maiores estudos sobre a interação com o DNA;
- Ensaios *in silico* por meio de docking molecular entre os compostos e o DNA ou possíveis proteínas-alvo;
- Ensaios *in vivo* para avaliação da inibição do crescimento tumoral, angiogênese, biodisponibilidade e toxicidade dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**;
- Ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* utilizando **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em combinação com quimioterápicos convencionais para análise de efeito sinérgico entre os tratamentos;

8. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B., et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1205-1256 p.

ALMEIDA, V. L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ALMONDES, K. G. S., et al. The role of selenoproteins in cancer. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 4, p. 484–488, 2010.

BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 8, p. 2993–2996, 2009.

BAGDI, A. K., et al. Synthesis of imidazo[1,2-a]pyridines: a decade update. **Chem. Commun.**, v. 51, n. 9, p. 1555–1575, 2015.

BALDINI, M., et al. Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: The case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. **Inorg. Chem.**, v. 42, n. 6, p. 2049–2055, 2003.

BAO, R., et al. CUDC-305, a novel synthetic HSP90 inhibitor with unique pharmacologic properties for cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, n. 12, p. 4046–4057, 2009.

BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods Mol. Biol.**, v. 1170, p. 29–40, 2014.

BARREIRO, E. J., et al. A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e antitrombóticos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 129–148, 2002.

BARREIRO, E. J.; MANSSOUR, C. A. M. Química Medicinal: As

Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 1ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2001. 83-122 p.

BELIZÁRIO, J.; VIEIRA-CORDEIRO, L.; ENNS, S. Necroptotic cell death signaling and execution pathway: Lessons from knockout mice. **Mediators Inflamm.**, v. 2015, p. 1-15, 2015.

BELLET, V., et al. Imidazopyridine-fused [1,3]-diazepinones part 2: Structure-activity relationships and antiproliferative activity against melanoma cells. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 125, p. 1225–1234, 2017.

BOER, L., et al. Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. **Oncogene**, v. 27, n. 31, p. 4261–4268, 2008.

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

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios da Proliferação e da Diferenciação Celular. In: BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. Patologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2012. 219-276 p.

BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 7, n. 3, p. 249–257, 2003.

BURLINSON, B., et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutat. Res.**, v. 627, n. 1, p. 31–35, 2007.

BYTH, K. F. et al. The cellular phenotype of AZ703, a novel selective imidazo[1,2-a]pyridine cyclin-dependent kinase inhibitor. **Mol. Cancer Ther.**, v. 5, n. 3, p. 655–664, 2006.

CAO, S.; DURRANI, F. A.; RUSTUM, Y. M. Selective Modulation of the Therapeutic Efficacy of Anticancer Drugs by Selenium Containing Compounds against Human Tumor Xenografts. Clin. **Cancer Res.**, v. 10, n. 7, p. 2561–2569, 2004.

CASTEDO, M., et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825–2837, 2004.

CASTERA-DUCROS, C., et al. Targeting the human parasite *Leishmania donovani*: Discovery of a new promising anti-infectious pharmacophore in 3-nitroimidazo[1,2-a]pyridine series. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 21, n. 22, p. 7155–7164, 2013.

CHANG, F., et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 590–603, 2003.

CHAUBEY, A.; PANDEYA, S. N. Pyridine: a versatile nucleuse in pharmaceutical field. **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, v. 4, n. 4, p. 5-8, 2011.

CHEAIB, B.; AUGUSTE, A.; LEARY, A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: Therapeutic opportunities and challenges. **Chinese J. Cancer**, v. 34, n. 1, p. 4–16, 2015.

CHENG, Q., et al. The selenium-independent inherent pro-oxidant NADPH oxidase activity of mammalian thioredoxin reductase and its selenium-dependent direct peroxidase activities. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 28, p. 21708–21723, 2010.

CHENG, Y., et al. Rational incorporation of selenium into temozolomide elicits superior antitumor activity associated with both apoptotic and autophagic cell death. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Chem. & Biol.**, v. 20, n. 5, p. 648–659, 2013.

CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G. K. Caspases - An update. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem.* **Mol. Biol.**, v. 151, n.1, p. 10-27, 2008.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Mol. Cell.**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

CLEMENT, I. P.; THOMPSON, H. J.; GANTHER, H. E. Selenium Modulation of Cell Proliferation and Cell Cycle Biomarkers in Normal and Premalignant Cells of the Rat Mammary Gland. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 9, n. 1, p. 49–54, 2000.

COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Selênio. 2a ed. São Paulo: **International Life Sciences Institute** Brasil, 2009. v. 8. 3-20 p.

CRUZ, E. H. G., et al. Synthesis and antitumor activity of selenium-containing quinone-based triazoles possessing two redox centres, and their mechanistic insights. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 122, p. 1–16, 2016.

DARWICHE, N.; EL-BANNA, S.; GALI-MUHTASIB, H. Cell cycle modulatory and apoptotic effects of plant-derived anticancer drugs in clinical use or development. **Expert Opin. Drug Discov.**, v. 2, n. 3, p. 361–379, 2007.

DAVID, A.; ZIMMERMAN, M. Cancer: An old disease, a new disease or something in between? **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, n. 10, p. 728-733, 2010.

DELBRIDGE, A. R. D.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. **Cell Death and Differ.**, v. 22, n. 7, p. 1071–1080, 2015.

DRAKE, E. N. Cancer chemoprevention: Selenium as a prooxidant, not an antioxidant. **Med. Hypotheses**, v. 67, n. 2, p. 318–322, 2006.

DURONIO, R. J.; XIONG, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 5, n. 3, p. a008904, 2013.

EL-AWADY, R. A., et al. Modulation of DNA damage response and induction of apoptosis mediates synergism between doxorubicin and a

new imidazopyridine derivative in breast and lung cancer cells. **DNA Repair**, v. 37, p. 1–11, 2016.

EL-BAYOUMY, K.; SINHA, R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. **Mutat. Res.**, v. 551, p. 181-197, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 4, p 495-516, 2007.

FAN, T. J., et al. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 37, n. 11, p. 719–727, 2005.

FERREIRA, R. G.; FRANCO, L. F. Efeitos colaterais decorrentes do tratamento quimioterápico no câncer de mama: revisão bibliográfica. **Rev. Univ. Vale do Rio Verde**, v. 15, n. 2, p. 633-638, 2017.

FRANKEN, N. A. P., et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. **Oncogene**, v. 25, p.9030-9040, 2003.

GIRIANELLI, V.; GAMARRA, C.; AZEVEDO E SILVA, G. Os grandes contrastes na mortalidade por câncer do colo uterino e de mama no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 48, n. 3, p. 459-467, 2014.

GOEL, A., et al. Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Cancer Biol. Ther.**, v. 5, n. 5, p. 529–535, 2006.

GRAÑA, X.; REDDY, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene**, v. 11, n. 2, p. 211–9, 1995.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next

generation. **Cell**, n. 144, v. 5, p. 646-674, 2011.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends Cell Biol.**, v. 23, n. 7, p. 345-356, 2013.

HASSAN, M., et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, p. 1-23, 2014.

HILLE, A.; GUST, R. Influence of methoxy groups on the antiproliferative effects of [Fe III(salophene-OMe)Cl] complexes. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, n. 11, p. 5486–5492, 2010.

HIRAYAMA, T., et al. Synthetic Studies on Centromere-Associated Protein-E (CENP-E) Inhibitors: 2. Application of Electrostatic Potential Map (EPM) and Structure-Based Modeling to Imidazo[1,2-a]pyridine Derivatives as Anti-Tumor Agents. **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 20, p. 8036–8053, 2015.

IARC, AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. World Cancer Report 2014: Press release n° 224. Lyon/London, 3 February 2014.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 2ª ed. Rio de Janeiro: **INCA**, 2011. 128 p.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 1ª ed. Rio de Janeiro: **INCA**, 2015. 122 p.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 1ª ed. Rio de Janeiro: **INCA**, 2014. 124 p.

INGERSOLL, M. A., et al. Novel imidazopyridine derivatives possess anti-tumor effect on human castration-resistant prostate cancer cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-20, 2015.

JARDIM, G. A. M. et al. Synthesis of selenium-quinone hybrid compounds with potential antitumor activity via Rh-Catalyzed C-H bond activation and click reactions. **Molecules**, v. 23, n. 83, p. 1-16, 2018.

JENKINSON, S., et al. Blockade of X4-tropic HIV-1 cellular entry by GSK812397, a potent noncompetitive CXCR4 receptor antagonist. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 2, p. 817–824, 2010.

JUNG, K. H., et al. Suppression of tumor proliferation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by HS-104, a novel phosphoinositide 3-kinase inhibitor. **Cancer Lett.**, v. 328, n. 1, p. 176–187, 2013.

KAMAL, A., et al. Synthesis and biological evaluation of imidazopyridine-oxindole conjugates as microtubule-targeting agents. **Chem. Med. Chem.**, v. 8, n. 12, p. 2015–2025, 2013.

KANG, M. H.; REYNOLDS, C. P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, n. 4, p. 1126–1132, 2009.

KASHANIAN, S., et al. Multi-spectroscopic DNA interaction studies of sunset yellow food additive. **Mol. Biol. Reports**, v. 39, n. 12, p. 10045–10051, 2012.

KHAN, K. H., et al. Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. **Chinese J. Cancer**. v. 32, n. 5 , p. 253-265, 2013.

KIM, Y. B., et al. Imidazo[1,2-a]pyridine-based peptidomimetics as inhibitors of Akt. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 19, p. 4650–4653, 2014.

KINNER, A., et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, n. 17, p. 5678-5694, 2008.

KOO, H. L.; DUPONT, H. L. Rifaximin: a unique gastrointestinal-selective antibiotic for enteric diseases. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.

26, n. 1, p. 17–25, 2010.

KUMAR, V., et al. Robbins and Cotran's pathologic bases of disease. 8^a ed. Philadelphia PA: **Saunders Elsevier**, 2009, 13 p.

KVIECINSKI, M. R., et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 421, n. 2, p. 268–273, 2012.

LACERDA, R. B., et al. Novel potent imidazo[1,2-a]pyridine-N-glycinyldrazones inhibitors of TNF- α production: In vitro and in vivo studies. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2014.

LANGER, S. Z., et al. The selectivity of zolpidem and alpidem for the γ 1-subunit of the GABA_A receptor. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 2, n. 3, p. 232–234, 1992.

LATIF, C.; HARVEY, S. H; O'CONNELL, M. J. Ensuring the Stability of the Genome: DNA Damage Checkpoints. **ScientificWorldJ.**, v. 1, p. 684–702, 2001.

LEE, H., et al. A novel imidazopyridine PI3K inhibitor with anticancer activity in non-small cell lung cancer cells. **Oncol. Rep.**, v. 30, n. 2, p. 863–869, 2013.

LEE, K. H.; JEONG, D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: The selenium paradox. **Mol. Med. Rep.**, v. 5, n. 2, p. 299-304, 2012.

LI, L., et al. Design, synthesis and antimycobacterial activity of novel imidazo[1,2-a]pyridine amide-cinnamamide hybrids. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2016.

LIANG, J.; SLINGERLAND, J. M. Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression. **Cell Cycle**, v. 2, n. 4, p. 336–342, 2003.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: Desafios e contribuição Brasileira. **Quim. Nova.**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIU, J., et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as potent antitubulin agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 25, n. 15, p. 4088–4099, 2017.

LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 8, n. 8, p. 627–644, 2009.

LIU, Y., et al. CHCHD2 inhibits apoptosis by interacting with Bcl-x L to regulate Bax activation. **Cell Death and Differ.**, v. 22, n. 6, p. 1035–1046, 2015.

LODISH, H. F., et al. *Biologia Molecular e Celular*. 7ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2014. 1127-1131 p.

LONDON, N.; BIGGINS, S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. **Nat. Rev. Mol Cell Biol.**, v. 15, n. 11, p. 736–748, 2014.

LOPEZ-CONTRERAS, A. J.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. Signalling DNA Damage. **Intech**, v. 8, p. 233–262, 2012.

MAITRA, A. Neoplasias. In: KUMAR, V., et al. *Robbins: Patologia básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013. 161-214p.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. **Nat. Ver. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MAO, Z., et al. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. **Cell Cycle**, v. 7, n. 18, p. 2902–2906, 2008.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 5, n. 9, p. 1-17, 2013.

MARSCH, G. A., et al. Non-covalent dna groove-binding by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 24, p. 5408–5415, 1994.

MARTINS, I. L., et al. Selenium-containing chrysin and quercetin derivatives: Attractive scaffolds for cancer therapy. **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 10, p. 4250–4265, 2015.

MCGAHON, A. J., et al. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. **Methods Cell Biol.**, v. 46, n. C, p. 153–185, 1995.

MILHAS, D., et al. Caspase-10 triggers bid cleavage and caspase cascade activation in fasL-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 20, p. 19836–19842, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informações sobre Mortalidade: Consolidação da base de dados de 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde: Coordenação Geral de Informação e Análise Epidemiológicas, 2013.

MOLINA, J. R.; ADJEI, A. A. The Ras/Raf/MAPK pathway. **J. Thorac. Oncol.**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2006

MOLL, U. M.; PETRENKO, O. The MDM2-p53 interaction. **Mol. Cancer Res.**, v. 1, n. 14, p. 1001–1008, 2003.

MORASKIA, G. C., et al. Scaffold-switching: An exploration of 5,6-fused bicyclic heteroaromatics systems to afford antituberculosis activity akin to the imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carboxylates. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 24, n. 15, p. 3493–3498, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NADIN, S. B.; VARGAS–ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A. Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **J. Histochem. & Cytochem.**, v. 49, n. 9, p. 1183–1186, 2001.

NAVARRO, M., et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. **J. Inorg. Biochem.**, v. 97, n. 4, p. 364–369, 2003.

NEIRA, C. M. The effects of yellow passion fruit, *Passiflora edulis* flavicarpa, phytochemicals on cell cycle arrest and apoptosis of leukemia lymphoma MOLT-4 cell line. 2003. 67 f. Thesis (Master of Science) - University of Florida, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2011. 471-475 p.

NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. M. Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1725–1746, 2009.

NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ.**, v. 6, n. 11, p. 1028–1042, 1999.

NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cell. Signal.**, v. 14, n. 5, p. 381-395, 2002.

O'CONNOR, M. J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Mol. Cell.**, v. 60, n. 4, p. 547-560, 2015

OHASHI, M.; DOHI, Y.; ITOH, T. Possible mechanisms underlying the vasodilatation induced by olprinone , a phosphodiesterase III inhibitor,

in rabbit coronary artery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, n. 5, p. 1000–1006, 2000.

ORRENIUS, S. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human disease. **J. Internal Med.**, v. 237, n. 6, p. 529-536, 1995.

OURIQUE, F., et al. In vivo inhibition of tumor progression by 5 hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 477, n. 4, p. 640–646, 2016.

OUYANG, L.. et al. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif.**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

PALCHAUDHURI, R; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2007.

PEČIUKAITYTĖ-ALKSNĖ, M., et al. Flavoenzyme-mediated reduction reactions and antitumor activity of nitrogen-containing tetracyclic ortho-quinone compounds and their. **EXCLI J.**, v. 16, p. 663–678, 2017.

PFAU, W., et al. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 4, p. 545–551, 1999.

PIETENPOL, J. A.; STEWART, Z. A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, v. 181–182, p. 475–481, 2002.

PLANO, D., et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Selenium (Se-NSAID) Molecules as Anticancer Agents **J. Med. Chem.**, v. 59, n. 5, p. 1946–1959, 2016.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling

in cancer progression and therapy. **Integr. Biol.**, v. 3, n. 4, p. 279–96, 2011.

PLESCHKE, J. M., et al. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 52, p. 40974–40980, 2000.

POULIOT, J. J., et al. Preclinical characterization and in vivo efficacy of GSK8853, a small-molecule inhibitor of the hepatitis C virus NS4B protein. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 59, n. 10, p. 6539–6550, 2015.

RAFIQUE, J., et al. Regioselective, Solvent- and Metal-Free Chalcogenation of Imidazo[1,2-*a*]pyridines by Employing I₂/DMSO as the Catalytic Oxidation System. **Chemistry**, v. 22, n. 33, p. 11854–11862, 2016.

RASSOKHINA, I. V., et al. Synthesis and antiproliferative activity evaluation of steroidal imidazo[1,2-*a*]pyridines. **Steroids**, v. 113, p. 29–37, 2016.

RESCIFINA, A., et al. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 73, p. 95–115, 2014.

ROBERTS, P. J.; DER, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291–3310, 2007.

ROSS, G. M., et al. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. **Mutat. Res.**, v. 337, n. 1, p. 57–60, 1995.

SANA, M.; MALIK, H. J. Current and emerging breast cancer biomarkers. **J Can Res Ther**, v. 11, n. 3, p. 508–513, 2015.

SANMARTÍN, C., et al. Selenium compounds, apoptosis and other

types of cell death: An overview for cancer therapy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, n. 8, p. 9649–9672, 2012.

SAYEED, I. B., et al. Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine–propenone conjugates as potent tubulin inhibitors. **Med. Chem. Commun.**, v. 8, n. 5, p. 1000–1006, 2017.

SEARS, R. C.; NEVINS, J. R. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 14, 2002.

SHAH, M. A; SCHWARTZ, G. K. Cell cycle-mediated drug resistance: An emerging concept in cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, n. 8, p. 2168-2181, 2001.

SHALINI, K.; SHARMA, P.; KUMAR, N. Imidazole and its biological activities: A review. **Chem. Sin.**, v. 1, n. 3, p. 36–47, 2010.

SHALTIEL, I. A., et al. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. **J. Cell Sci.**, v. 128, n. 4, p. 607–620, 2015.

SHAMAS-DIN, A., et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 5, n. 4, p. 1–21, 2013.

SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. **Int. J. Oncol.**, v. 30, n. 4, p. 905–18, 2007.

SHAPIRO, G. I.; HARPER, J. W. Anticancer drug targets: Cell cycle and checkpoint control. **J. Clin. Investigat.**, v. 104, n. 12, p. 1645-1653, 1999.

SHERR, C. J. Divorcing ARF and p53: An unsettled case. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 9, p. 663-673, 2006.

SHI, C., et al. A novel organoselenium compound induces cell cycle

arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, n. 3, p. 578–583, 2003.

SHUKLA, N. M., et al. Antibacterial activities of Groebke-Blackburn-Bienaymé derived imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, n. 19, p. 5850–5863, 2012.

SILVEIRA, V. C., et al. Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, n. 5–6, p. 1090–1103, 2008.

SINGH, N. P., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SINHA, R.; EL-BAYOUMY, K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 4, n. 1, p. 13–28, 2004.

SLEE, E. A., et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J. Cell Biol.**, v. 144, n. 2, p. 281–292, 1999.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 10, p. 7320–7326, 2001.

SOUZA, D., et al. New organochalcogen multitarget drug: Synthesis and antioxidant and antitumoral activities of chalcogenozidovudine derivatives. **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 8, p. 3329–3339, 2015.

SPALLHOLZ, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, n. 1, p. 45-64, 1994.

STAMBOLIC, V., et al. Regulation of PTEN transcription by p53. **Mol. Cell**, v. 8, n. 2, p. 317–325, 2001.

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 3, p. 3403-3431, 2014.

TAKAHASHI, H., et al. Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1833, n. 12, p. 2980-2987, 2013.

THORBURN, A. Death receptor-induced cell killing. **Cell. Signal.**, v. 16, n. 2, p. 139-144, 2004.

TORRE, L. A., et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin.**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

VADGAMA, J. V., et al. Effect of selenium in combination with adriamycin or taxol on several different cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 20, n. 3 A, p. 1391-1414, 2000.

VALDIGLESIAS, V., et al. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: A review. **Arch. Toxicol.**, v. 84, n. 5, p. 337-351, 2010.

VERMEULEN, K., et al. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALSH, J. G., et al. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, n. 35, p. 12815-12819, 2008.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

WERMUTH, C. G., et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1998). **Pure & Appl. Chem.**, v. 70, n. 5, p. 1129–1143, 1998.

WESTPHAL, D., et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1813, n. 4, p. 521–531, 2011.

XI, J., et al. Structure-based design and synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives as novel and potent Nek2 inhibitors with in vitro and in vivo antitumor activities. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 126, n. 2017, p. 1083–1106, 2017.

XIE, H., et al. An investigation of molecular docking and molecular dynamic simulation on imidazopyridines as B-raf kinase inhibitors. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 11, p. 27350–27361, 2015.

YANG, F., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 26, n. 6, p. 753–761, 2005.

YANG, Y., et al. Discovery of imidazopyridine derivatives as novel c-Met kinase inhibitors: Synthesis, SAR study, and biological activity. **Bioorg. Chem.**, v. 70, p. 126–132, 2017.

YU, L., et al. Chemical-genetic profiling of imidazo[1,2-*a*]pyridines and -pyrimidines reveals target pathways conserved between yeast and human cells. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 11, 2008.

YUAN, J. W., et al. Synthesis and biological evaluation of compounds which contain pyrazole, thiazole and naphthalene ring as antitumor agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 10, p. 2324–2328, 2014.

ZHANG, J.; YANG, P.; GRAY, N. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 1, p. 28–39, 2009.

ZHANG, S., et al. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of

1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity. **J. Inorg. Biochem.**, v. 98, n. 12, p. 2099–2106, 2004.

ZHONG, W.; OBERLEY, T. D. Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line. **Cancer Res.**, v. 61, n. 19, p. 7071–7078, 2001.

ZHONG, X., et al. Silymarin causes caspases activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathway. **Toxicology**, v. 227, n. 3, p. 211–216, 2006.

ZHOU, N., et al. DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 32, p. 29532–29537, 2003.