



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Cynthia de Pádua da Silva

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL EFEITO ANTITUMORAL DE
NOVOS DERIVADOS DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS E CROMONAS
SELENILADAS**

FLORIANÓPOLIS

2019

Cynthia de Pádua da Silva

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL EFEITO ANTITUMORAL DE
NOVOS DERIVADOS DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS E CROMONAS
SELENILADAS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Farmacêutica.
Orientadora: Prof.^a Dra. Tânia Mara Fischer Günther
Coorientadora: Dra. Fabiana Ourique da Silva.

Florianópolis

2019

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

de Pádua da Silva, Cynthia

Avaliação in vitro do potencial efeito antitumoral de novos derivados de imidazo[1,2-a]piridinas e cromonas seleniladas / Cynthia de Pádua da Silva ; orientador, Tânia Mara Fischer Günther, coorientador, Fabiana Ourique da Silva, 2019.

52 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Câncer. 3. Imizadopiridinas. 4. Cromonas. I. Fischer Günther, Tânia Mara . II. Ourique da Silva, Fabiana . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Cynthia de Pádua da Silva

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL EFEITO ANTITUMORAL DE
NOVOS DERIVADOS DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS E CROMONAS
SELENILADAS**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “farmacêutica” e aprovado em sua forma final pelo Curso Farmácia.

Florianópolis, 26 de novembro de 2019.

Prof.^a Dra. Marení Rocha Farias

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Dirleise Colle
Universidade Federal de Santa Catarina

*Este trabalho é dedicado ao meu eterno e
venerado mestre da vida, Dr Daisaku Ikeda, o
homem mais corajoso que conheço.*

“A viagem de Kamakura a Quioto leva doze dias.

*Se viajar durante onze dias e parar antes de
completar o décimo segundo dia, como poderá
admirar a lua linda da capital?”*

Dr Daisaku Ikeda, poeta laureado do mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À minha família: em especial a minha mãe, Lourdes, e ao meu pai, Paulo. Sem o apoio dos meus pais jamais poderia ter realizado o sonho de estudar em uma universidade pública. Proporcionaram-me o que eles jamais tiveram, minha eterna gratidão;

À Universidade Federal de Santa Catarina pela educação de excelência, a infraestrutura dos laboratórios, salas e equipamentos tecnológicos que sempre impulsionaram o melhor aprendizado;

Às professoras e professores do curso que, desde o início, nos estimularam a tornarmo-nos futuros profissionais de qualidade, em especial à Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, muito obrigada pela oportunidade de ser sua aluna de iniciação científica;

A todos os colegas do LABIOEX, com quem convivi nesses anos, pela amizade, pelas trocas de experiências, pelos ensinamentos e aprendizado mútuo: Daniela, Elinete, Gabriela, Guilherme, Jean, Karina, Luiza, Nádia, Raquel, Rodrigo, Tâmila, Valdelúcia e Vilson.

A todos os animais criados com o intuito de serem utilizados em pesquisas, para que assim surjam novos tratamentos antitumorais, beneficiando nossas vidas.

Aos funcionários, servidores e colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial à Rosalba, pela participação e auxílio em minha jornada;

À professora Dr. Tânia Mara Fischer Günther e Dra. Fabiana Ourique da Silva, pelo apoio e orientação nesse longo trajeto;

À banca examinadora, por aceitar participar dessa etapa conosco e contribuir para tornar este trabalho ainda melhor;

Aos meus amigos e colegas do curso de Farmácia por toda ajuda. Fiz amizades incríveis na faculdade que desejo cultivar por toda vida. Foram anos compartilhando conhecimentos, sorrisos, lágrimas, angústia e muito esforço para estimular o pensamento positivo.

Ao meu namorado, Fernando, por ser um companheiro maravilhoso que sempre me apoia e me incentiva. Obrigada pelo amor, carinho e dedicação.

À minha filha, Maya, que ainda não conheço, mas já amo muito.

RESUMO

Introdução: O câncer é a segunda principal causa de óbitos no mundo. Bastante complexo e de origem multifatorial, o câncer engloba mais de 100 tipos de doenças. Caracterizado por alterações celulares, esta doença promove desregulação no ciclo celular, resultando em eventos de proliferação exacerbada, insensibilidade aos inibidores de crescimento e a imortalidade celular, e falhas nos mecanismos de morte celular programada. Como consequência destes eventos, pode invadir outros tecidos e órgãos, levando à metástase. **Objetivo:** Avaliar a atividade antitumoral de novas moléculas em busca de desenvolver fármacos antitumorais mais seletivos e citotóxicos. Sendo assim, derivados de cromonas e imidazopiridinas contendo átomo de selênio em suas estruturas químicas foram estudados. **Metodologia:** A citotoxicidade das cromonas e imidazopiridinas em estudo, nas concentrações variadas entre 1 μM a 1000 μM , foram testadas em linhagens tumorais MCF-7 (carcinoma de mama humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano) e HepG2 (hepatocarcinoma) utilizando a metodologia do MTT após 72 h de tratamento. Para o ensaio de formação de colônias, foram utilizadas concentrações sub-tóxicas (IC_{30}) e tratamento de 72 h, em células MCF-7 e HepG2, e incubação de 15 dias. A interação e intercalação dos compostos como CT-DNA foi realizada por espectrofotometria UV-Vis, com concentração fixa para o DNA de 150 μM e variações das concentrações dos compostos de 50 μM a 300 μM , e por medida de fluorescência utilizando o agente intercalante iodeto de propídio, respectivamente. A análise de morte celular para avaliar o tipo de morte induzido pelos compostos em células HepG2 foram realizados após 72 h de tratamento em concentrações não-tóxicas. **Resultados e Discussão:** As cromonas C1 e C3 apresentaram os melhores valores de IC_{50} para células MCF-7, sendo 33,58 μM e 40,65 μM , respectivamente. Na avaliação do efeito antiproliferativo, C3 apresentou redução bastante significativa na formação de colônias. Os testes de interação e intercalação com CT-DNA demonstraram a capacidade desses compostos de interagirem e intercalarem com o CT-DNA. Já as imidazopiridinas IP-Se-05 e IP-Se-06 foram os compostos que apresentaram os melhores valores de IC_{50} para a célula HepG2, 0,85 μM e 0,03 μM , respectivamente. O efeito antiproliferativo foi avaliado e IP-Se-06 reduziu consideravelmente a formação de colônias. Quanto à avaliação do tipo de morte celular, IP-Se-06 apresentou resultado significativo na quantidade de células apoptóticas e necróticas. **Conclusão:** Os resultados apresentados sugerem que os compostos avaliados apresentam efeito antitumoral sendo promissores na pesquisa de novos agentes na terapia contra o câncer, porém mais estudos são necessários para elucidar seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: Atividade antitumoral. Imizadopiridinas. Cromonas.

ABSTRACT

Introduction: Cancer is the second leading cause of death in the world. Quite complex and multifactorial origin, or cancer of England over 100 types of diseases. Characterized by cellular alterations, this disease promotes cell cycle dysregulation, resulting in exacerbated proliferation events, insensitivity to growth inhibitors and cell immortality, by lesions in cases of programmed cell death. As a consequence of these events, it can invade other tissues and organs, leading to metastasis. **Objective:** To analyze the antitumor activity of new molecules in order to develop more selective and cytotoxic antitumor drugs. Thus, the compounds of chromones and imidazopyridines that contain selenium atom in their chemical structures were studied. **Methodology:** Cytotoxicity of study chromones and imidazopyridines in 1 μM - 1000 μM samples was tested on MCF-7 (human breast carcinoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma) and HepG2 (hepatocarcinoma) tumor lines using the MTT methodology with 72 h of incubation. For colony training assays, sub-toxic (IC30) and 72 h treatment were used in MCF-7 and HepG2 cells and 15 days incubation. Interaction and intercalation of compounds such as CT-DNA was performed by UV-Vis spectrophotometry, with fixed DNA concentration of 150 μM and testing changes of 50 μM to 300 μM compounds, and by fluorescence measurement using iodide intercalating agent. propidium, respectively. A cell death analysis to assess the type of compound-induced death in HepG2 cells was performed after 72 hours of treatment on non-toxic samples. Results and Discussion: Chromones C1 and C3 showed the best IC50 values for MCF-7 cells, 33,58 μM and 40.65 μM , respectively. In the evaluation of antiproliferative effect, C3 shows quites significant reduction in colony formation. CT-DNA interaction and intercalation tests demonstrated the ability of these compounds to interact and intercalate with CT-DNA. Imidazopyridines IP-Se-05 and IP-Se-06 were the compounds with the best IC50 values for HepG2 cells, 0.85 μM and 0.03 μM , respectively. The antiproliferative effect was evaluated and IP-Se-06 strongly reduced colony formation. Regarding the evaluation of the type of death, IP-SE-06 presented significant result in the amount of apoptotic and necrotic cells. **Conclusion:** The results presented suggest that compounds subject to antitumor effects are promising in the search for new agents in cancer therapy, but more studies are needed to elucidate their mechanism of action.

Keywords: Antitumor activity. Imidazopyridines. Chromones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Papiro de Edwin Smith	16
Figura 2 – Imagem comparativa de um caranguejo e a microscopia eletrônica do câncer.....	16
Figura 3 – Surgimento de uma célula de câncer	18
Figura 4 – Progressão tumoral	19
Figura 5 – Mecanismos de amplificação, mutação e translocação	20
Figura 6 – Indução da morte celular via necrose e apoptose	22
Figura 7 – Estrutura química da cromona	23
Figura 8 – Estrutura química da imidazopiridina	25
Figura 9 – Elemento químico selênio	26
Figura 10 – Estruturas das cromonas seleniladas.....	29
Figura 11 – Estruturas das imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas.....	30
Figura 12 – Efeito antiproliferativo induzido pelas cromonas seleniladas na concentração de suas CI_{30} , após 72 h de tratamento	37
Figura 13 – Interação das diferentes cromonas seleniladas com o CT-DNA	38
Figura 14 – Efeitos intercalantes das cromonas seleniladas sobre o CT-DNA em comparação à doxorubicina	39
Figura 15 – Efeito antiproliferativo induzido pelas imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas na concentração de suas CI_{30} , após 72 h de tratamento	42
Figura 16 – Indução da morte celular em células HepG2, via apoptose e necrose pelos tratamentos com as imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Citotoxicidade das cromonas sobre células MCF-7 e HeLa após a incubação por 72 h com os respectivos tratamentos	27
Tabela 2 – Citotoxicidade das imidazopiridinas representada pelo valor do CI_{50} sobre diferentes linhagens tumorais HepG2 e HeLa	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bax – Proteína X associada à Bcl-2

CI₅₀ – Concentração inibitória de 50%

CI₃₀ – Concentração inibitória de 30%

CO₂ – Dióxido de carbono

CT-DNA – *Calf thimus DNA*

DMEM – Meio de cultura modificado de Eagle

DNA – Ácido desoxirribonucleico

D.P. – Desvio padrão

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FBS – Soro fetal bovino

GPx – Glutathione peroxidase

HeLa – Adenocarcinoma cervical humano

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

KDR – Receptor de domínio de cinase

McCoy – Células de fibroblastos murinho

MCF-7 – Células de adenocarcinoma mamário

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazolium bromide

NaOH – Hidróxido de sódio

PARP – Poli(ADP-ribose)polimerase

PBS – Salina tamponada de fosfato

TrxR – Tioredoxina redutase

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	BREVE HISTÓRICO SOBRE O CÂNCER.....	15
1.2	CÂNCER.....	18
1.3	CROMONAS	23
1.4	IMIDAZOPORIDINAS	24
1.5	SELÊNIO.....	25
1.6	OBJETIVOS.....	27
1.6.1	Objetivo Geral	27
1.6.2	Objetivos Específicos	27
2	METODOLOGIA	29
2.1	SÍNTESE DOS COMPOSTOS.....	29
2.2	REAGENTES QUÍMICOS.....	31
2.3	CULTIVO DAS CÉLULAS	31
2.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	31
2.5	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	32
2.6	MORTE CELULAR.....	32
2.7	AVALIAÇÃO DOS DANOS DIRETOS DOS COMPOSTOS SOBRE O CT-DNA – ENSAIOS MOLECULARES	33
2.7.1	Interação com o CT-DNA.....	33
2.7.2	Intercalação com o CT-DNA.....	33
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1	VIABILIDADE CELULAR DAS CROMONAS SELENILADAS	35
3.2	INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS CROMONAS SELENILADAS.....	36
3.3	INTERCALAÇÃO DAS CROMONAS SELENILADAS COM O CT-DNA.....	37

3.4	EFEITO INTERCALANTE DAS CROMONAS SELENILADAS AO CT-DNA.....	39
3.5	VIABILIDADE CELULAR DAS IMIDAZO[1,2- <i>a</i>]PIRIDINAS SELENILADAS.....	40
3.6	INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS IMIDAZO[1,2- <i>a</i>]PIRIDINAS SELENILADAS	41
3.7	MORTE CELULAR INDUZIDA PELAS IMIDAZO[1,2- <i>a</i>]PIRIDINAS SELENILADAS.....	43
4	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

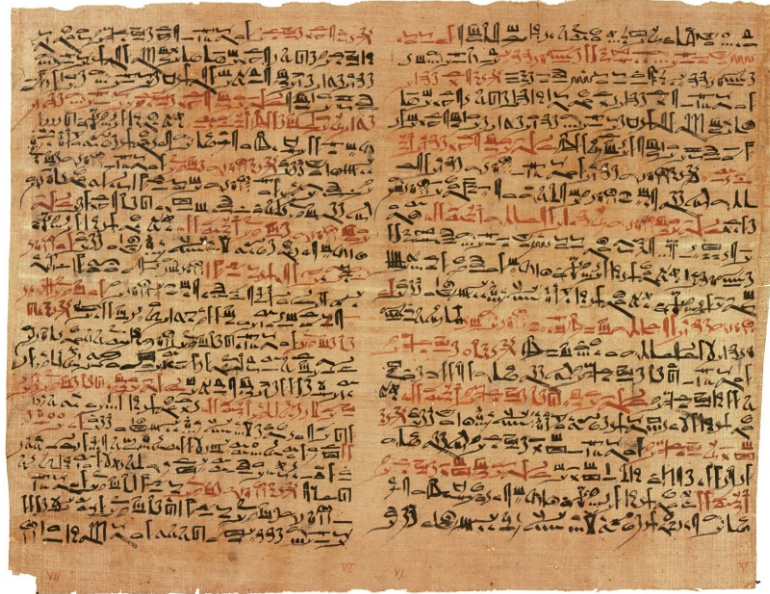
1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE O CÂNCER

Desde os tempos pré-históricos o câncer preocupa a humanidade. A mais antiga evidência aceita é que o câncer em mamíferos consiste em massas tumorais encontrado em dinossauros fossilizados e ossos humanos de tempos pré-históricos (Faguet, 2015).

O registro mais antigo sobre o câncer é encontrado no chamado Papiro de Smith. Encontrado por Edwin Smith no século XIX, acredita-se que o manuscrito tenha sido escrito há aproximadamente 3000 a. C. e possivelmente escrito por Imhotep, um médico-arquiteto da época. Neste documento histórico encontram-se relatos de diversos assuntos médicos, dentre eles pode-se extrair informações a respeito do câncer de mama. É possível concluir, a partir da narrativa exposta no papiro, que o tumor era bastante grave e não existiam recursos terapêuticos. Por volta de 1500 a. C. o Papiro de Ebers referencia pela primeira vez tumores de tecido mole e possíveis cânceres de pele, útero, estômago e reto. Com a finalidade de descobrir de alguma forma um tratamento para tumores e cânceres, os egípcios empregaram o uso de cautério (agente empregado para queimar tecidos, com finalidade terapêutica), facas e sais. Os egípcios também utilizavam um recurso curativo chamada "pomada egípcia". A formulação da pomada continha arsênio e foi usada para tratar pacientes com tumores e cânceres até o século XIX (VARGAS, 2012; HAJDU, 2011; FAGUET, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Figura 1 – Papiro de Edwin Smith.



Fonte: Adaptado de Vargas, 2012.

De origem grega e conhecido como "Pai da Medicina Ocidental", Hipócrates (460-375 a.C.) concluiu que tanto a carência como o excesso de sangue, muco, bile e outras secreções corporais, poderiam induzir ao câncer. Hipócrates comparou a forma de desenvolvimento da doença a um caranguejo que adere às estruturas circundantes com suas garras, dando origem aos termos carcinoma (tumor maligno) e câncer (úlcer tumor maligno). Além disso, foram diferenciados cânceres, carcinomas e tumores sólidos. A diferenciação ajudava no tipo de tratamento que o paciente receberia (HAJDU, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Figura 2 – Imagem comparativa de um caranguejo e a microscopia eletrônica do câncer.



Legenda: O caranguejo foi comparado a uma célula cancerígena por Hipócrates. A provável comparação do crustáceo a massa tumoral é justificada pelo fato do conjunto de células formar projeções que se espalham pelo tecido, assemelhando-se ao animal. Fonte: Adaptado de American Cancer Society, 2019, <https://br.depositphotos.com/199161474/stock-photo-crab-hand-drawing-vintage-clip.html> e https://brasil.elpais.com/brasil/2019/01/14/ciencia/1547480702_889920.html. Acessado em: 23/10/2019.

Mais do que qualquer um que o antecedeu, Galeno foi um escritor bastante produtivo, escreveu mais de 100 artigos sobre tumores e cancros. Galeno tinha origem grega. Suas importantes observações médicas foram traduzidas para o latim, ampliando o acesso de suas descobertas a outros estudiosos. As cópias das obras do escritor eram produzidas de forma manuscrita para todos os países conhecidos. Suas teorias foram redigidas com uma linguagem clara se adequando bem aos povos cristãos, bizantinos e árabes. (HAJDU, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Hipócrates e Galeno foram apresentados ao mundo árabe por Rhazes de Bagdá (860-932 d. C.). O tratamento cirúrgico do câncer foi introduzido na Espanha por Albucasis (1013-1106 d. C.) e, mesmo com a proibição de cirurgias decretada pelo Papa em 1215, o bispo e médico Theodoric (1205-1296 d. C.) praticava em Salerno, Itália. A cirurgia francesa foi fundada por Lanfranc (1252-1315 d. C.) (HAJDU, 2011; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os médicos e cirurgiões franceses Lanfranc (1252-1315 d. C.), Henri de Mondeville (1260-1320 d. C.) e Guy de Chauliac (1300-1368 d. C.) rejeitaram a famosa teoria humoral de Galeno. Este acontecimento somado a primeira dissecação pública pós-morte em 1315 na Itália e a introdução da tipografia em 1450 na Alemanha por Johannes Guttenberg (1395-1468 d. C.), pôs um fim na Idade das Trevas e deu-se início ao Renascimento das artes e ciências. (HAJDU, 2011)

As células cancerosas foram observadas pela primeira vez ao microscópio em 1838 d. C. pelos pesquisadores Harold E. Varmus e J. Michael Bishop. Séculos se passaram e o câncer continua sendo um grande desafio para a ciência atual (HAJDU, 2011).

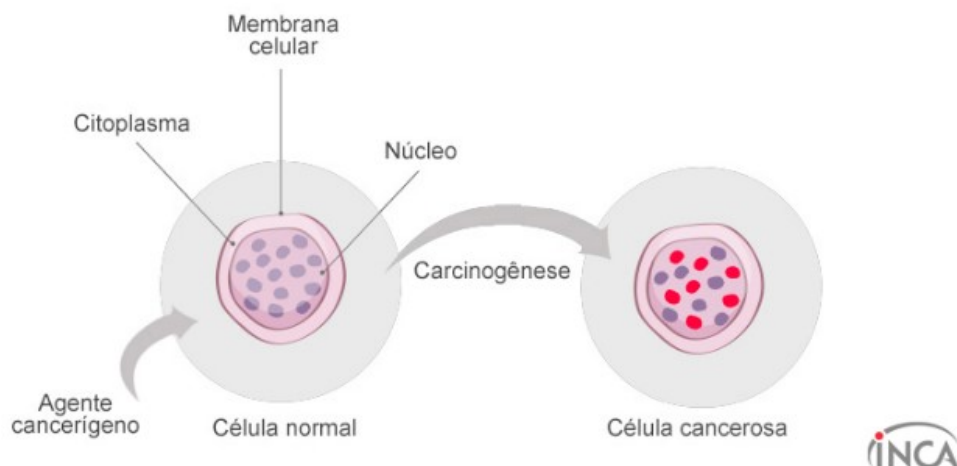
1.2 CÂNCER

Anualmente a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IRCA, sigla em inglês para International Agency for Research on Cancer), divulga estatísticas preocupantes em relação aos novos casos de câncer. Esta doença é a segunda principal causa de óbitos no mundo e estima-se que 29,5 milhões de pessoas morrerão até 2040, impactando diretamente o sistema de saúde pública mundial (BRAY et al., 2012; IARC, 2019; OPAS, 2019).

No Brasil, dados estatísticos do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostraram que em 2018 foram diagnosticados 583 mil novos casos de câncer e a mortalidade da doença atingiu 219 mil homens e mulheres. Os tipos de cânceres que vitimaram os homens foram principalmente os de: pulmão (14%), próstata (13%), cólon e reto (8%), estômago (8%), esôfago (6%). Já em mulheres, a principal causa de óbito foram em virtude de cânceres de: mama (16%), pulmão (11%), cólon e reto (9%), colo do útero (6%), pâncreas (5%). (INCA, 2019).

Englobando mais de 100 tipos de doenças que tem em comum o crescimento desordenado, os cânceres humanos são bastante complexos e tem origem multifatorial. As causas mais comuns são por efeitos de vírus, bactérias, substâncias químicas, radiação, estilo e hábitos de vida, todos os quais são capazes de induzir o aparecimento do câncer através de mutações e modificações no DNA celular como pode ser observado na figura 3 (INCA, 2018; IARC, 2019).

Figura 3 – Surgimento de uma célula de câncer.



Fonte: <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>. Acessado em 27/11/2019

Caracterizada por uma sequência de eventos fisiológicos, o câncer é uma doença que promove desregulação no ciclo celular, resultando em eventos de proliferação exacerbada, insensibilidade aos inibidores de crescimento e a imortalidade celular, pelas falhas nos mecanismos de morte celular programada. Estes eventos são resultantes de diversas mutações genéticas cumulativas ao longo da vida levando a uma perda do controle homeostático, responsável pela regulação de morte e proliferação celular (HAHN & WEINBERG, 2002). Parte deste processo é ilustrado na figura 4.

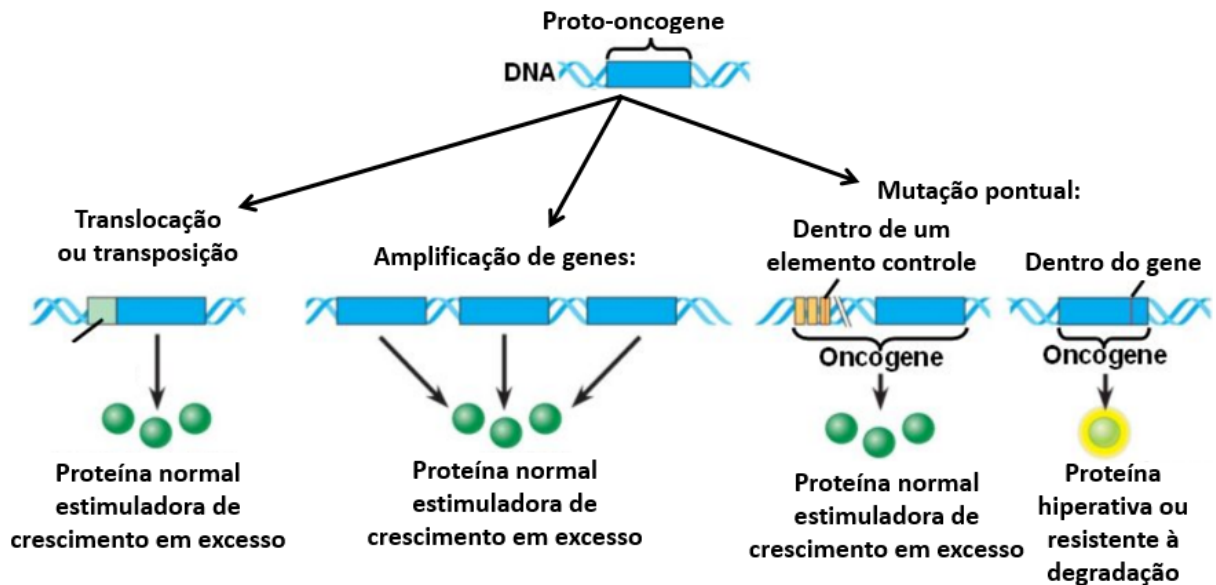
Figura 4 – Progressão tumoral.



Fonte: <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>. Acessado em 27/11/2019

Atualmente, sabe-se que oncogenes, ou a inibição de genes supressores de tumor, são capazes de transformar células normais em células cancerosas, que contribuem para a transformação neoplásica e progressão de tumores primários e metastáticos por amplificação, mutação e translocação como observado na figura 5 (HAJDU et al., 2015).

Figura 5 – Mecanismos de amplificação, mutação e translocação.



Legenda: Os proto-oncogenes são genes normais responsáveis por codificar proteínas que ajudam a regular o crescimento e a diferenciação celular. Estes genes podem tornar-se um oncogene devido a uma mutação levando a produção de proteínas estimuladoras de crescimento que estão em excesso, hiperativas ou resistentes à degradação. Como consequência destes eventos tem-se o surgimento do câncer. Fonte: <http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch18/proto-oncogene.html>. Acessado em 23/10/2019.

De acordo com Alberts e colaboradores (2010), existem algumas características presentes nas células tumorais que favorecem a progressão da doença, tais como: 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.

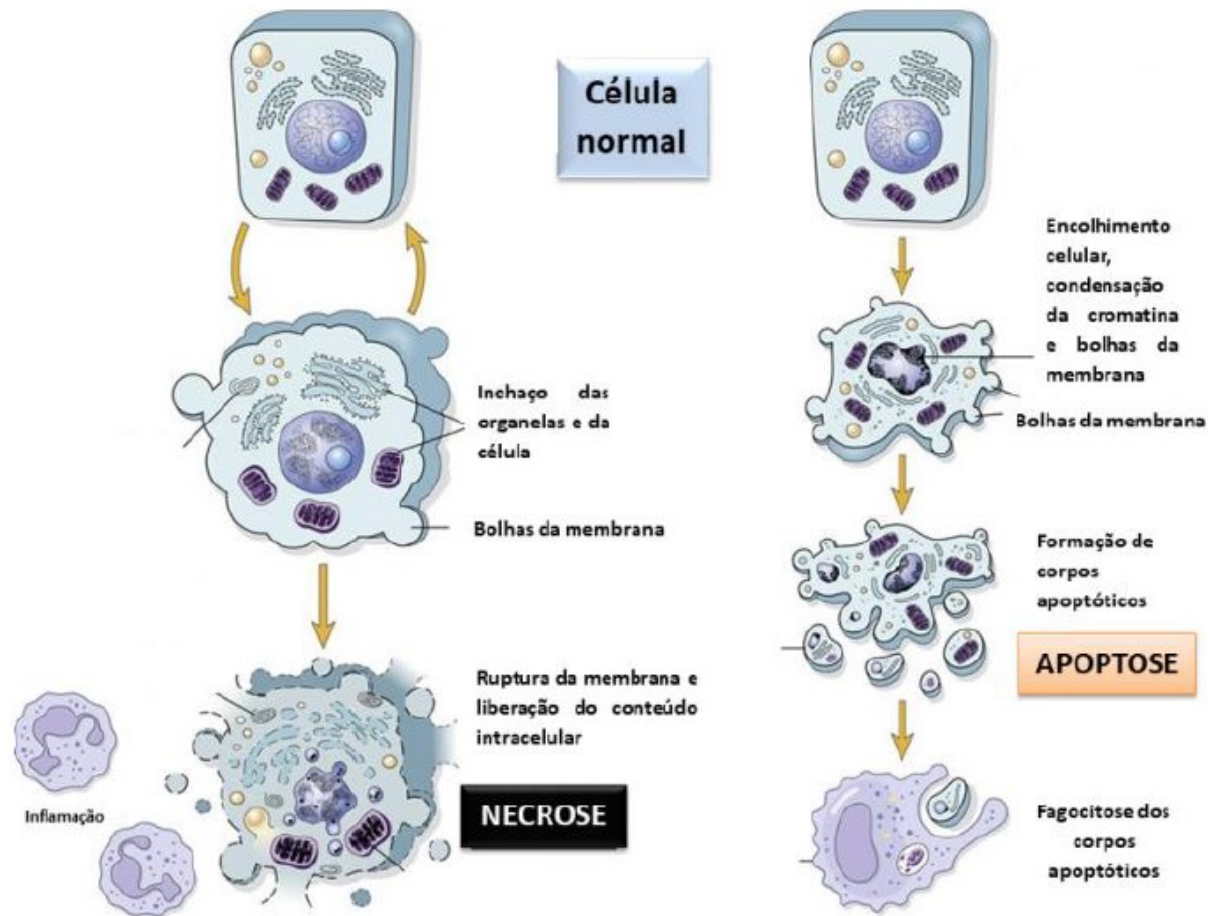
A morte celular é um processo importante para a homeostase do organismo. Existem diferentes formas de indução da morte celular descritos na literatura: apoptose, autofagia, necrose e catástrofe mitótica (CASTEDO et al., 2004; KROEMER et al., 2007; OUYANG et al., 2012; O'CONNELL).

A morte por necrose gera edema citoplasmático que leva a um dano irreversível da membrana plasmática. Este acontecimento acarreta em quebra de organelas e extravasamento do conteúdo celular, afetando as características das

células adjacentes. Como consequência, as células necróticas geram inflamação no local de forma direta ou indireta, desencadeando um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos ativados. (KERR et al.,1994; FESTJENS et al., 2006). Diversas pesquisas apontam que algumas das principais mudanças morfológicas que ocorrem na morte celular causadas por necrose incluem inchaço celular, formação de vacúolos citoplasmáticos; retículo endoplasmático dilatado; formação citoplasmática de bolhas; mitocôndrias condensadas, inchadas ou com rupturas; desagregação e separação dos ribossomos; membranas das organelas rompidas; lisossomos inchados e com rupturas da membrana celular (KERR et al, 1972; MAJNO et. al, 1995; TRUMP et al, 1997).

Apoptose é um processo de “morte celular programada” responsável por eliminar do organismo células nos tecidos normais, podendo ocorrer em contextos patológicos específicos. As células apoptóticas formam corpos apoptóticos que são fagocitados e digeridos por células próximas. Por realizar uma morte “limpa”, este tipo de morte celular não gera inflamação no local. Encontramos a apoptose ocorrendo de forma espontânea em tumores malignos, muitas vezes diminuindo expressivamente seu crescimento, e é aumentada em tumores que respondem à irradiação, quimioterapia citotóxica, aquecimento e ablação hormonal. Um dos motivos pelo interesse neste tipo de morte celular é devido a descobertas relacionadas com processo regulatórios promovido por certos proto-oncogenes e o gene supressor de tumor p53 (KERR et al.,1994; OUYANG et al., 2012). No esquema da figura 6 podemos observar como ocorre a morte pela via necrótica e pela via apoptótica.

Figura 6 - Indução da morte celular via necrose e apoptose



Legenda: Na necrose, as células sofrem ruptura da membrana plasmática desencadeando a inflamação. As células apoptóticas formam corpos apoptóticos que serão fagocitados e digeridos por células próximas. Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2009.

Em busca de frear a progressão da doença e possibilitar um melhor prognóstico, tratamentos como quimioterapia, radioterapia, cirurgia para remoção de tumores, transplante de medula óssea ou uma combinação destas modalidades são uma das estratégias utilizadas (OPAS; INCA, 2019).

A mortalidade causada pelo câncer juntamente aos efeitos citotóxicos causados pelo tratamento da quimioterapia e radioterapia é significativa. A quimioterapia é uma abordagem importante no tratamento que traz diversos benefícios ao indivíduo; porém existem muitos efeitos adversos como vômito e náusea, sangramento, diarreia, hipotensão, alopecia, trombocitopenia, anemia, dentre outros (HARMER, 2008).

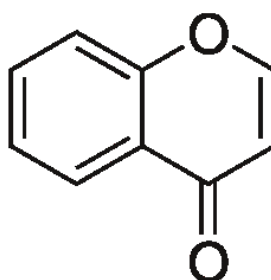
A elevada toxicidade associada à falta de seletividade dos agentes antitumorais são importantes limitantes do tratamento e estão associados ao ataque de células tumorais e células saudáveis que estão em proliferação. Outro desafio da quimioterapia é o agravante aumento da resistência aos medicamentos em diversos tipos de câncer tornando o desenvolvimento de novos fármacos um desafio da ciência para os próximos anos (MASSOD, 2016; PAN et al., 2016).

Neste contexto, buscando atividade tumoral de novos fármacos mais seletivos e citotóxicos, as imidazopiridinas e cromonas, podem desempenhar um papel importante devido as suas atividades biológicas descritas na literatura (KHAN et al., 2010, THANIGAIMALAI et al., 2010; KERI et al, 2014; PIRES et al., 2016; SHALINI et al, 2010).

1.3 CROMONAS

As cromonas são conhecidas como um grande número de moléculas bioativas naturais e sintéticas. São formadas por um heterociclo constituído por um núcleo básico de flavonas, uma classe importante e generalizada de compostos originado de plantas com um grande número de atividades biológicas (GASPAR et al., 2014, KERI et al., 2014). A estrutura molecular da cromona pode ser observada na figura 7.

Figura 7 – Estrutura química da cromona.



As cromonas são bem conhecidos pela diversidade de propriedades farmacológicas, como antialérgicas, antidiabéticas (REIS et al., 2017), anti-

inflamatórias (KHAN et al., 2010, THANIGAIMALAI et al., 2010), antimicrobianos (KERI et al., 2014), antitumorais (BUDZISZ et al., 2002), esta última associada com a baixa toxicidade (PIRES et al., 2016).

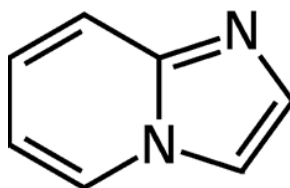
Segundo Reis e colaboradores (2017) as cromonas são modelos excelentes para promover modificações estruturais, pois permite realizar a síntese de uma grande variedade de compostos com diferentes perfis farmacológicos. Além disso, os pesquisadores relatam que esta classe possui uma acessibilidade sintética e diversidade estrutural responsável por desempenhar um papel importante na química medicinal.

As cromonas possuem uma estrutura que pode ajudar na descoberta de novos medicamentos, já que os compostos desta classe vêm sendo descritos como agentes citotóxicos potentes e seletivos (BHATNAGAR et al. 2010; NAM et al., 2010; VALDAMERI et al., 2012; REDDA et al., 2014).

1.4 IMIDAZOPIRIDINAS

As imidazopiridinas pertencem à classe de compostos heterocíclicos. Junto à estrutura molecular dos anéis encontramos átomos de nitrogênio fundido. Este arranjo molecular é responsável por melhorar a biodisponibilidade e a solubilidade dos fármacos, sendo de grande interesse farmacocinético. O esqueleto estrutural possui importância na área de produtos naturais e farmacêuticos devido às atividades biológicas abrangentes. Estudos apontam que as imidazopiridinas possuem ação antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica, antituberculosa, antiviral, antidepressiva, antitumoral e antileishmanial (SHALINI et al., 2010). Amplamente utilizado para vários benefícios terapêuticos, medicamentos como olprinona, nicopidem, saripidem, zolpidem e zolimidina pertencem ao grupo das imidazopiridinas. (SAYEED et al., 2017). A estrutura geral das imidazopiridinas pode ser observada na figura 8.

Figura 8 – Estrutura química da imidazopiridina.

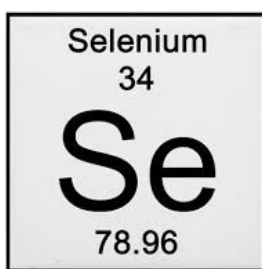


De acordo com Sunkari e colaboradores (2019), as imidazopiridinas agem como inibidores da aromatase, supressores da produção de estrogênio, agentes inotrópicos positivos, inibidores da agregação plaquetária e tromboxano, inibidores da sintetase. Como agente citotóxico, compostos derivados de imidazopiridinas apresentam atividade em células tumorais como mama (MCF-7), câncer cervical (HeLa), próstata (DU-145) e pulmão (A549). Entre os diversos mecanismos de ação, foi observado a atuação do composto através do receptor de domínio de cinase (KDR) do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), gerando inibição dos mesmos e ocasionando indução de apoptose.

1.5 SELÊNIO

Encontrado no ambiente nas formas inorgânicas e orgânicas, o selênio (figura 9) é um elemento presente em diferentes enzimas do corpo humano, como a glutathione peroxidases, sendo um nutriente fundamental para a saúde. Também apresenta função de antioxidante no balanceamento redox, na remoção de peróxidos lipídicos e de hidrogênio. Além disso, este elemento age na regulação hormonal (MUSTACICH et al., 2000; YU et al., 1999, COMINETTI et al., 2009). Estudos recentes têm evidenciado um importante papel do selênio promovendo atividade antitumoral (WANG et al., 2012; FERNÁNDEZ-BANÑARES et al., 2002; CLARK et al., 1996; SANDSTROM et al., 1990).

Figura 9 – Elemento químico selênio.



Fonte: <https://escolaeducacao.com.br/selenio/selenio-tabela-periodica/>. Acessado em 23/10/2019.

Um dos mais importantes e principais mecanismos antitumorais induzidos pelo selênio é a apoptose realizada por meio da oxidação direta de grupos de cisteína e sulfidrilas em domínios catalíticos de diversas enzimas celulares, e também por produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DRAKE et al., 2006). Em mamíferos são mais de vinte selenoproteínas que se ligam a resíduos de cisteína depois do processo transcricional (KRYUKOV et al., 2003). Cientistas demonstraram em outros estudos que a adição do selênio em compostos orgânicos melhora a resposta antitumoral, diminuindo as CI_{50} . Como consequência, a geração de EROs e indução do apoptose aumentaram significativamente (PLANO et al., 2016; MARTINS et al., 2015).

Dentre os elementos da família dos calcogênios, o selênio tem se destacado em inúmeros processos reativos, apresentando uma maior atividade biológica quando comparado com os outros elementos deste grupo 6A, como o oxigênio, o enxofre, o telúrio e o polônio (ALCOLEA et al., 2016). Estudos com calcogênios ligados a flavonoides demonstraram um maior efeito antiproliferativo, pró-apoptótico e seletivo dos compostos associados ao selênio em comparação com os ligados ao enxofre ou ao oxigênio, em células MCF-7 (MARTINS et al., 2015).

Como demonstrado em diversos estudos *in vitro*, compostos organosselênios são considerados potenciais antitumorais devido à sua atividade pró-oxidante, pró-apoptótica e seletiva, tendo sua ação citotóxica modulada pelas propriedades químicas do próprio núcleo orgânico (LEE et al., 2012; VALDIGLESIAS et al., 2010).

Compostos citotóxicos contendo selênio normalmente demonstram pouco efeito em células normais. Clement e colaboradores (2000) demonstraram em um

estudo que células normais não são sensíveis à ação citotóxica da Selenometilcisteína, enquanto que células transformadas ou pré-malignas são afetadas, o que possivelmente pode bloquear a carcinogênese. Além disso, eles demonstraram que o crescimento tumoral em glândulas mamárias de ratas foi inibido, argumentando que talvez as células tumorais possam apresentar certos defeitos em suas vias de sinalização que auxiliem a ação do selênio.

Sendo assim, considerando os inúmeros trabalhos que destacam o potencial antiproliferativo de diversos compostos de selênio e derivados de imidazopiridinas e cromonas, o Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), do Departamento de Bioquímica da UFSC, coordenado pela Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, em parceria com o Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio (LabSelen), do Departamento de Química da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Braga, sintetizou novos compostos derivados de imidazo[1,2-a]piridinas e cromonas com átomo de selênio em suas estruturas, sendo os mesmos testados como possíveis agentes antitumorais.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Este projeto de Trabalho de Conclusão de Curso tem como principal objetivo avaliar *in vitro* o potencial efeito antitumoral de novos derivados de imidazo[1,2-a]piridinas e cromonas seleniladas.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos derivados de imidazopiridinas e cromonas sobre diferentes linhagens de células tumorais;
- Avaliar o efeito antiproliferativo dos compostos;

- Avaliar o tipo de morte celular (apoptose ou necrose) induzida pelos compostos em diferentes linhagens celulares;
- Avaliar a possível interação e intercalação dos compostos com o CT-DNA.

2 METODOLOGIA

2.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Os compostos derivados de imidazopiridinas e cromonas que possuem selênio incorporado a sua estrutura foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio (LabSelen) coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Braga, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina. Nas figuras 10 e 11 estão apresentadas as estruturas químicas dos compostos estudados no presente trabalho.

Figura 10 - Estrutura das cromonas.

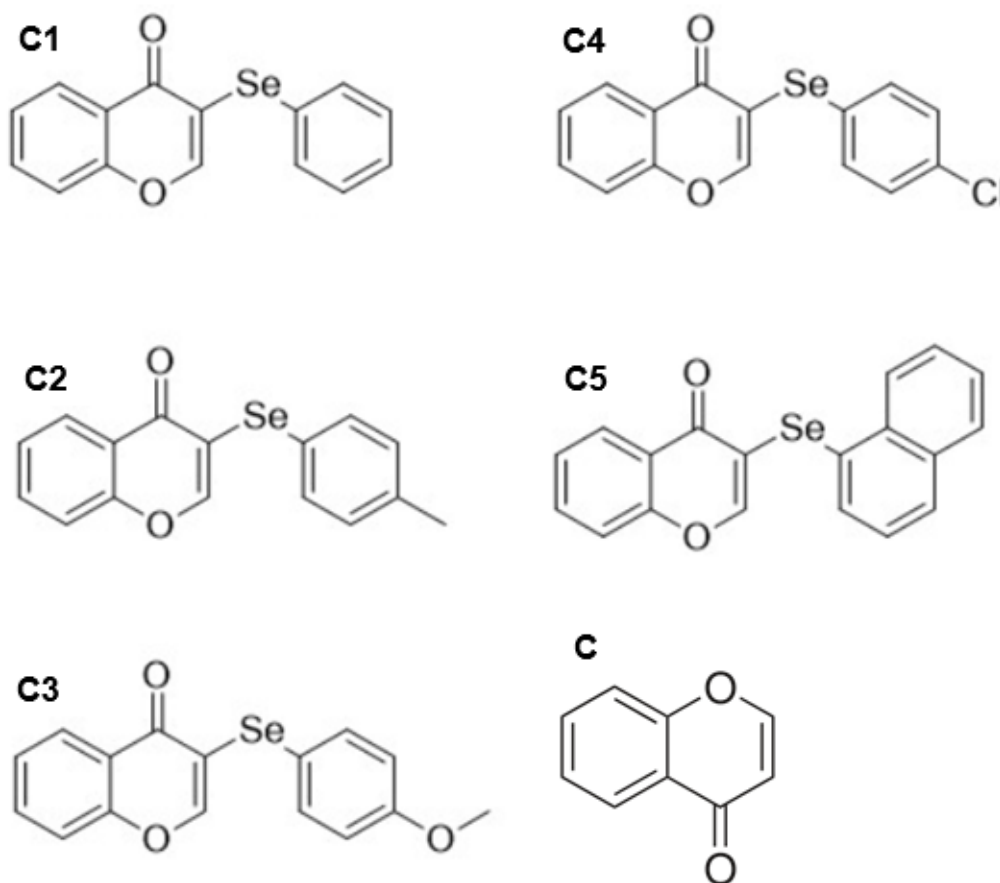
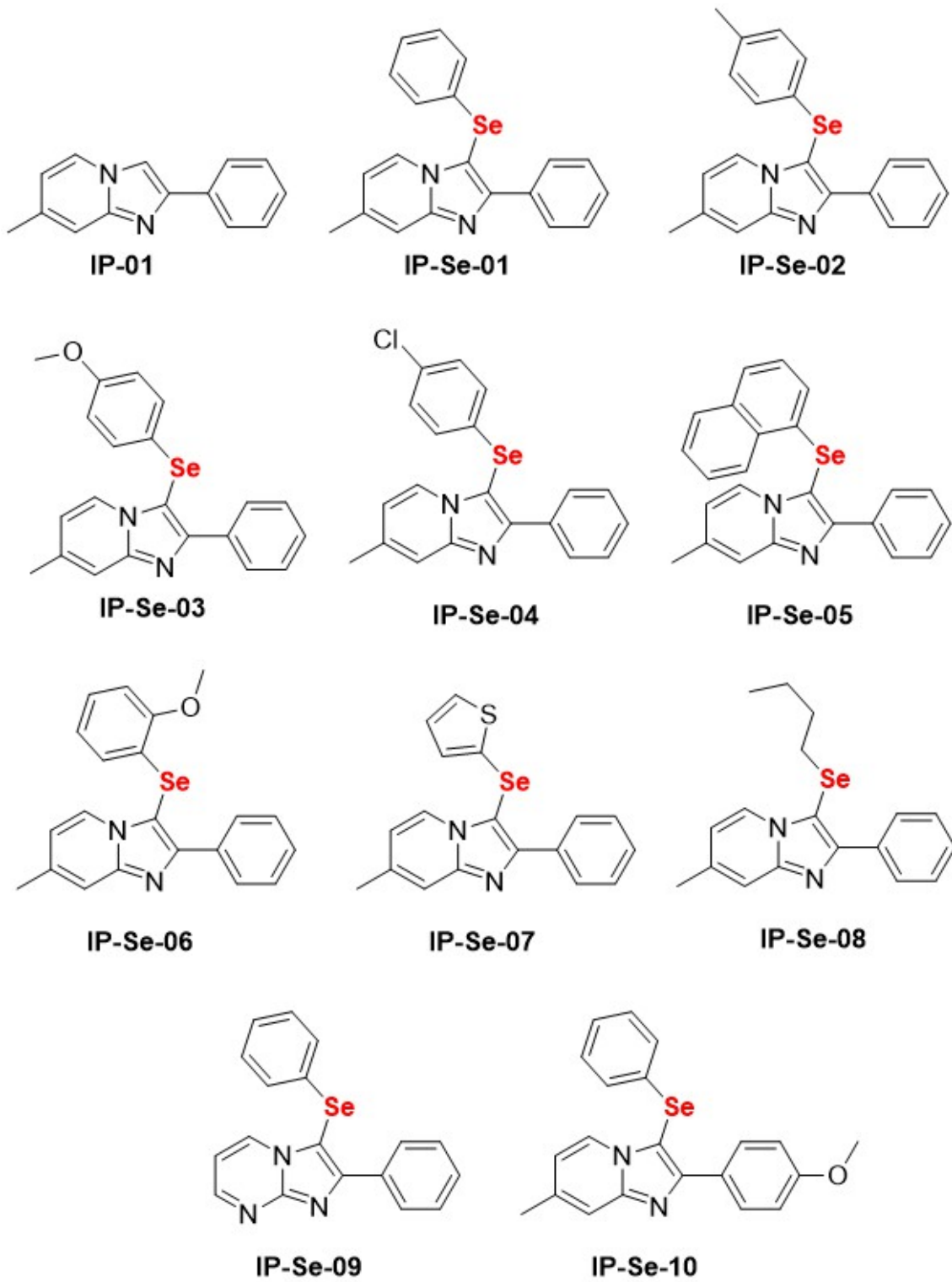


Figura 11 - Estruturas das imidazopiridinas



2.2 REAGENTES QUÍMICOS

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). O 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), doxorubicina (Cat. D2975000), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Cat. M5655) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Todos os outros reagentes químicos foram utilizados com grau de pureza atendendo as normas da American Chemical Society (ACS).

2.3 CULTIVO DAS CÉLULAS

Para a execução do presente estudo foram utilizadas células das linhagens tumorais MCF-7 (carcinoma de mama), HeLa (adenocarcinoma cervical) e HepG2 (hepatocarcinoma), que foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%) com 95% de umidade. Utilizou-se meio de cultura Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em estufa de cultivo celular.

Estas células crescem em monocamada e foram destacadas por tratamento com uma solução de tripsina-EDTA (0,25 %), quando chegaram a uma confluência de aproximadamente 90 %.

2.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade potencial *in vitro* dos compostos derivados das cromonas e imidazopiridinas foi avaliada através do método de coloração pelo sal de tetrazólio (MTT) (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], empregando células tumorais expostas a diferentes concentrações dos compostos em estudo em

diferentes tempos de tratamento (24 h, 48 h e 72 h) (MOSMANN, 1983). A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) obtida foi calculada a partir de regressão linear e expressas em média \pm desvio padrão. O controle negativo apresentava somente o meio com veículo e foi considerado como 100% de viabilidade celular. Cada tratamento foi realizado em três poços de placas de cultura com 96 poços, tendo sido executados três experimentos independentes em dias diferentes, para cada tratamento.

2.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A atividade antiproliferativa dos compostos derivados das cromonas e imidazopiridinas foram avaliadas pelo método de formação de colônia de acordo com Franken et al. (2006). Este ensaio tem o objetivo de avaliar a perda da capacidade de proliferação das células tumorais. As células (500 células por poço em placa de 6 poços) foram tratadas por tempo pré-determinado (72 h) com os compostos em concentrações sub-tóxicas, lavadas (2x) com salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,4; 37°C) e meio fresco será adicionado. Após aproximadamente 15 dias, as células foram coradas com cristal violeta e as colônias com mais de 50 células foram contadas.

2.6 MORTE CELULAR

O tipo de morte celular induzido pelos compostos em células HepG2 foram avaliados. As células tumorais foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas na estufa de CO₂ (5%) por 24 h. Dando continuidade, o meio foi substituído pelos tratamentos com as imidazopiridinas em concentrações sub-tóxicas por um período de 72 h, apresentando o controle negativo apenas o veículo DMSO 1%. Ao término do tratamento as células foram transferidas para microtubo de 1,5 mL e centrifugadas a 1500 g durante 10 min. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e as células ressuspendidas em PBS. Para a coloração utilizou-se uma solução de laranja de acridina e iodeto de propídio, agente intercalante do DNA. 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®. Esse experimento foi realizado em triplicata e apresentado em forma de porcentagem. De acordo com este método, as células viáveis aparecem com o núcleo corado em verde e estrutura organizada. As células apoptóticas se apresentam com o núcleo corado de laranja a vermelho com cromatina condensada e as células necróticas seu núcleo estará vermelho com a cromatina fragmentada (MCGAHON et al., 1995).

2.7 AVALIAÇÃO DOS DANOS DIRETOS DOS COMPOSTOS SOBRE O CT-DNA – ENSAIOS MOLECULARES

2.7.1 Interação com CT-DNA

O monitoramento da interação entre os compostos derivados das cromonas em estudo com o CT-DNA foi realizado por meio da titulação espectrofotométrica de varredura UV-Vis, sendo a concentração de CT-DNA fixa em 150 μM (conforme previamente determinado) e concentrações variadas dos compostos (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 μM). A partir destas condições, foram determinadas as alterações na absorção das amostras, bem como o deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima conforme proposto por Navarro e colaboradores (2003).

2.7.2 Intercalação com CT-DNA

A intercalação dos compostos derivado das cromonas com a molécula de CT-DNA foi avaliada utilizando o iodeto de propídeo como padrão de agente intercalante ao DNA, sendo as medidas de fluorescência realizadas no leitor TECAN Infinity M200, conforme adaptação da metodologia descrita por Silveira et al. (2008). O comprimento de onda de excitação foi de 492 nm e de emissão 620 nm. A concentração de CT-DNA utilizada foi de 150 μM . O espectro de emissão do iodeto de propídeo, na ausência e na presença do CT-DNA, registrou-se variando a

concentração do mesmo, obtendo-se a concentração de saturação. Em seguida, o experimento foi conduzido com concentrações crescentes dos compostos (50 – 400 μM). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo para a intercalação ao CT-DNA.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VIABILIDADE CELULAR DAS CROMONAS SELENILADAS

Inicialmente foi realizada uma triagem para avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos compostos sintetizados. Os seis diferentes compostos de cromonas (C, C1, C2, C3, C4, C5) possuem átomos de selênio e anéis aromáticos em diferentes posições estruturais. A atividade antitumoral das cromonas foi testada inicialmente em células MCF-7 (carcinoma de mama) e HeLa (câncer cervical). Após as células serem tratadas durante 72 h com as diferentes cromonas, foi realizado o teste de citotoxicidade. Após o resultado de citotoxicidade, os compostos com melhores CI_{50} (C1 e C3) foram testados para o efeito antiproliferativo.

A tabela 1 mostra os melhores resultados para CI_{50} , entre as 6 cromonas testadas. Os testes de citotoxicidade foram conduzidos em 24 h, 48 h e 72h, sendo este último tempo de tratamento o que causou uma diminuição significativa da viabilidade celular para todas as cromonas em estudo. Os resultados evidenciam que a presença do átomo de selênio juntamente com a adição de anéis aromáticos com grupos substituintes aumentou consideravelmente a toxicidade dos compostos.

Tabela 1: Citotoxicidade das cromonas sobre células MCF-7 e HeLa após a incubação por 72 h com os respectivos tratamentos.

Composto	CI_{50} (μM)	
	MCF-7	HeLa
C	178,96	587,71
C1	33,58	60,64
C2	95,39	208,90
C3	40,65	78,18
C4	66,45	222,84
C5	40,26	72,56

Legenda. A citotoxicidade para os diferentes compostos obtida pelo ensaio de MTT nas concentrações de 0,1 a 1000 μM frente às linhagens tumorais MCF-7 e HeLa em tratamentos de 72

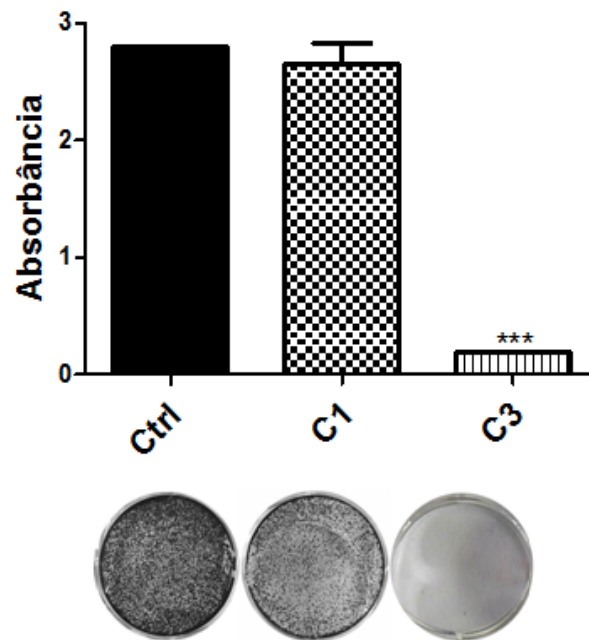
h. Os dados da CI_{50} foram obtidos a partir de três experimentos independentes e os resultados expressos pela média \pm D.P.

Com base nos resultados da tabela 1, podemos concluir que os compostos C1, C3 e C5 foram os que tiveram os menores valores de IC_{50} . O estudo prosseguiu analisando a resposta das células MCF-7 tratadas pelas cromonas seleniladas. Nota-se que o CI_{50} dos compostos C1, C3 E C5 reduziram significativamente neste novo estudo. Desta forma, C1 e C3 foram selecionados para a continuidade do trabalho.

3.2 INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS CROMONAS SELENILADAS

Além da atividade citotóxica, investigar o potencial antiproliferativo de um composto é bastante importante, tendo em vista que este método avalia a capacidade de recuperação das células tumorais após a exposição a um determinado agente. As cromonas seleniladas foram testadas em concentrações sub-tóxicas, utilizando os valores da CI_{30} de C1 e C3 frente a células MCF-7. Os resultados indicam efeito antiproliferativo significativo do composto C3 após 72 h de exposição, como pode ser observado na figura 12. Os dados obtidos sugerem que mesmo em dose sub-tóxica o composto C3 inibiu o processo clonogênico, reduzindo o número de colônias.

Figura 12 – Efeito antiproliferativo induzido pelas cromonas seleniladas na concentração de suas CI_{30} , após 72 h de tratamento.



Legenda. Células MCF-7 tratadas com concentrações sub-tóxicas dos compostos durante 72 h. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Valores expressos como média \pm D.P, (***) indicam diferenças estatísticas em $p < 0,001$ em comparação com células de controle (não tratadas). Os resultados foram avaliados pelo teste de Bonferroni ao nível de 95% de significância.

Apesar de seu CI_{50} não ter sido de grande destaque, C3 apresentou uma redução bastante significativa na formação de colônias. Dados da literatura mostram que as cromonas podem ter efeito antiproliferativo devido ao fato de as mesmas agirem diretamente sobre a tubulina (KOBAYASHI et al., 2017).

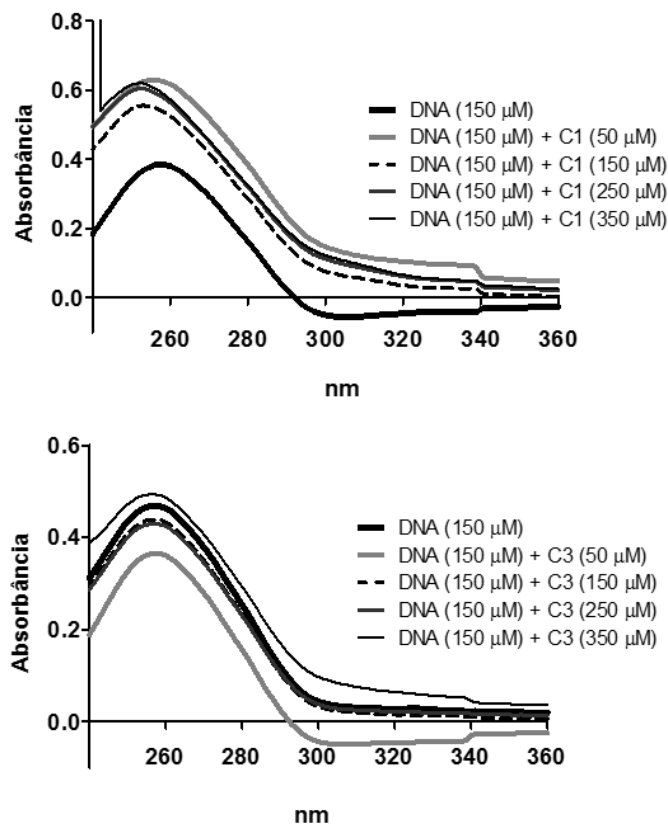
3.3 INTERAÇÃO DAS CROMONAS SELENILADAS COM O CT-DNA

A interação dos compostos com o CT-DNA foi avaliada através de espectrometria UV-Vis. A avaliação de alterações das medidas de absorbância do CT-DNA é um método efetivo para examinar o possível modo de interação de diferentes moléculas com o DNA. Compostos que possivelmente intercalam com o DNA alterando a conformação da dupla hélice causam um efeito hipocrômico, ou seja, uma diminuição da absorbância do DNA quando em contato com o composto.

Já compostos capazes de se interagir a partir de ligações covalentes com o DNA estão relacionados com o efeito hiper-crômico, ou seja, um aumento da absorbância do DNA (KASHANIAN et al., 2012).

Após as análises *in vitro*, seguiram-se os ensaios moleculares com CT-DNA. Para a obtenção dos espectros foi utilizada uma concentração fixa de CT-DNA (150 μM) previamente definida e concentrações variáveis dos compostos (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 μM).

Figura 13 – Interação das diferentes cromonas seleniladas com o CT-DNA.



Legenda. Os compostos foram testados nas concentrações (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 μM), enquanto o DNA foi testado em uma concentração fixa de 150 μM . Espectrometria UV/Vis da interação dos compostos. Efeitos causados pela ação dos compostos C1 com CT-DNA e composto C2 com CT-DNA. Leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 230 a 340 nm.

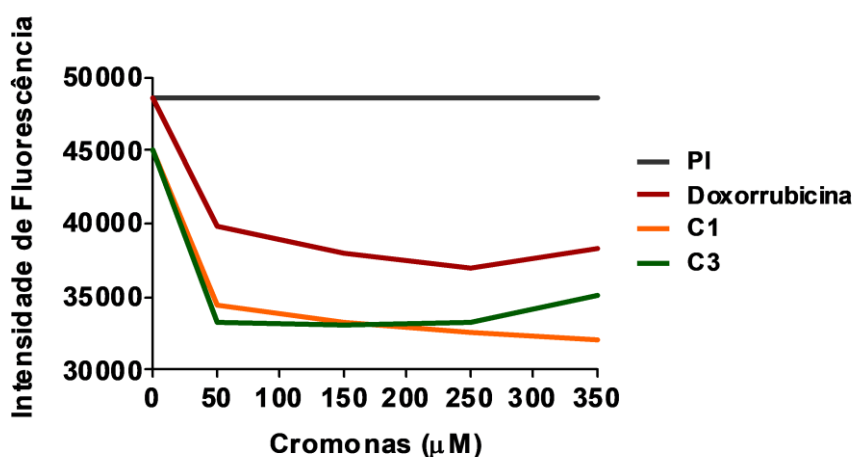
Os resultados apresentados na figura 13 evidenciam que o composto C1 é um potencial intercalante à molécula do DNA, devido ao efeito hiper-crômico (aumento da absorbância das bandas do DNA); enquanto, o composto C3 parece somente interagir com o DNA, sem causar intercalação.

3.4 EFEITO INTERCALANTE DAS CROMONAS SELENILADAS AO CT-DNA

O efeito intercalante dos compostos ao CT-DNA foi avaliado usando o agente intercalante fluorescente iodeto de propídeo (PI, *propidium iodide*). Moléculas que se intercalam ao DNA competem com o iodeto de propídeo e reduzem a fluorescência deste composto, conforme observado com a doxorubicina, fármaco antitumoral padrão utilizado como controle positivo neste experimento. O resultado indica, de forma surpreendente, que todos os compostos causaram uma intercalação se não semelhante, maior que a doxorubicina.

Lerman (1963) demonstrou que moléculas aromáticas policíclicas são típicas agentes intercalantes da dupla hélice do DNA, e este postulado permanece vigente atualmente. Sendo assim, o fato de todos os compostos testados serem moléculas policíclicas planares, os tornam moléculas de interesse para pesquisa de novos antitumorais.

Figura 14 – Efeitos intercalantes das cromonas seleniladas sobre o CT-DNA em comparação à doxorubicina.



Legenda. Os compostos e a doxorubicina foram testados nas concentrações (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 µM). O iodeto de propídeo (PI) foi utilizado na concentração de saturação previamente definida (300 µM).

Segundo Zhang e colaboradores (2019), a doxorubicina é um fármaco antitumoral desenvolvido no tratamento quimioterapia de vários tumores. A molécula

da doxorubicina intercala entre os pares de bases de DNA da fita dupla e ancora suas porções de açúcar no sulco menor do DNA. Isso inibe a replicação e processos de transcrição do DNA, eventualmente levando à apoptose.

Os dados apresentados na figura 14 indicam que além de interagir com o CT-DNA, como demonstrado nos resultados anteriores, os compostos C1 e C3 também intercalam na molécula de CT-DNA, sendo potenciais compostos intercalantes ao DNA tal como ocorre com a doxorubicina.

Sendo assim, estes resultados abrem caminho para o aprofundamento das pesquisas e quem sabe num futuro próximo, o desenvolvimento de um promissor fármaco antitumoral.

3.5 VIABILIDADE CELULAR DAS IMIDAZO[1,2-a]PIRIDINAS SELENILADAS

A avaliação da citotoxicidade das imidazo[1,2-a]piridinas também foram realizadas, porem as linhagens de células tumorais estudadas foram com a HepG2 e HeLa. As mesmas foram tratadas no tempo de 72 h, em concentrações crescentes (0,1-1000 μM). Os melhores resultados de citotoxicidade, representados pelos valores de CI_{50} , foram observados no tempo de tratamento de 72 h, assim como nas cromonas. Com isso, os demais ensaios biológicos foram conduzidos com 72 h de tratamento.

Todos os compostos testados demonstraram potencial citotóxico, contudo o IP-Se-05 e IP-Se-06 reduziram significativamente a viabilidade celular, apresentando os menores valores de CI_{50} entre as imidazopiridinas nas células tumorais testadas. Em pequenas concentrações estes dois compostos diminuíram mais de 50% a viabilidade celular. O composto IP-Se-05 apresentou CI_{50} de 0,85 μM para HepG2 e 29,9 μM para a linhagem células HeLa. Já o IP-Se-06 apresentou um resultado ainda melhor em que o CI_{50} para HepG2 ficou em 0,03 μM e 7,4 μM para a linhagem celular HeLa (Tabela 2).

Tabela 2 – Citotoxicidade das imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas representada pelo valor do CI_{50} sobre diferentes linhagens tumorais HepG2 e HeLa.

<i>Composto</i>	<i>CI₅₀ (μM)</i>	
	<i>HepG2</i>	<i>HeLa</i>
<i>IP-01</i>	83.5	>100
<i>IP-Se-01</i>	>100	>100
<i>IP-Se-02</i>	88.0	91.7
<i>IP-Se-03</i>	80.6	36.0
<i>IP-Se-04</i>	57.0	>100
<i>IP-Se-05</i>	0.85	29.9
<i>IP-Se-06</i>	0.03	7.4
<i>IP-Se-07</i>	39.0	70.9
<i>IP-Se-08</i>	22.0	26.2
<i>IP-Se-09</i>	28.0	>100
<i>IP-Se-10</i>	38.5	87.3

Legenda. citotoxicidade para os diferentes compostos obtida pelo ensaio de MTT nas concentrações de 0,1 a 1000 μ M frente às linhagens tumorais MCF-7 e HeLa em tratamentos de 72 h. Os dados da CI_{50} foram obtidos a partir de três experimentos independentes e os resultados expressos pela média \pm D.P.

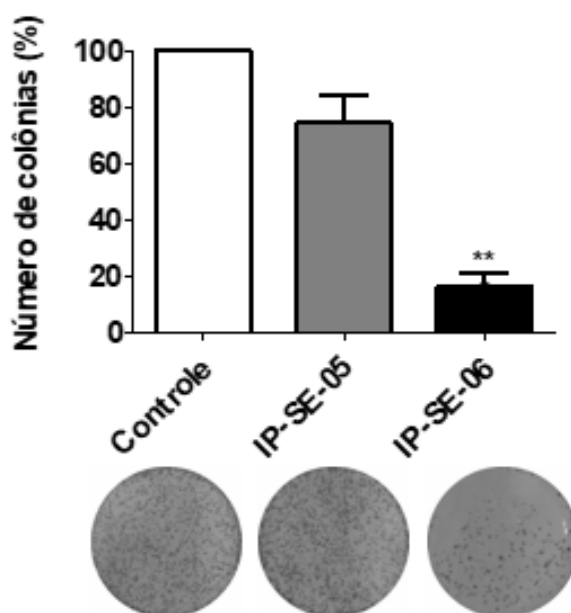
Estudos anteriores, realizados por Almeida e colaboradores (2018), com as imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas demonstraram um aumento significativo da atividade citotóxica em células tumorais MCF-7 e HeLa.

Em busca de avaliar o potencial efeito dos compostos inéditos frente a outras linhagens tumorais, o estudo prosseguiu analisando a resposta das células HepG2 tratadas pelas imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas. Nota-se que o CI_{50} do composto IP-Se-05 e IP-Se-06 reduziram significativamente neste novo estudo. Desta forma, foram selecionados para a continuidade do trabalho.

3.6 INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS IMIDAZO[1,2-a]PIRIDINAS SELENILADAS

As imidazo[1,2-a]piridinas também foram testadas em concentrações sub-tóxicas, utilizando os valores da CI_{30} frente a células HepG2. Os resultados indicam efeito antiproliferativo significativo após 72 h de exposição, como pode ser observado na figura 15. Os dados obtidos sugerem que mesmo em dose sub-tóxica os compostos inibem o processo clonogênico, reduzindo o número de colônias. Os compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 foram capazes de reduzir o número de colônias quando comparadas ao controle negativo, sendo que o último apresentou resultado mais significativo. A partir destes dados é possível supor que o composto IP-Se-06 tem a capacidade de manter os danos às células tumorais, mesmo após cessar o tratamento.

Figura 15 – Efeito antiproliferativo induzido pelas imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas na concentração de suas CI_{30} , após 72 h de tratamento.



Legenda. Células HepG2 tratadas com concentrações sub-tóxicas dos compostos durante 72 h. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Valores expressos como média \pm D.P, (***) indicam diferenças estatísticas em $p < 0,001$ em comparação com células de controle (não tratadas). Os resultados foram avaliados pelo teste de Bonferroni ao nível de 95% de significância.

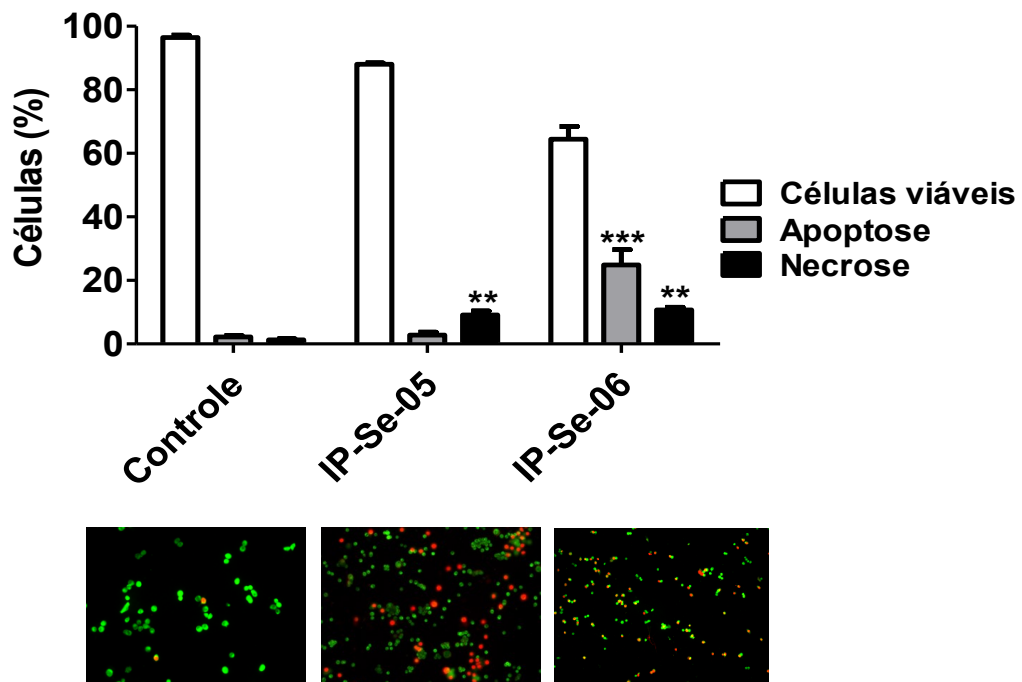
Almeida e colaboradores (2018) também avaliaram a atividade antiproliferativa e citotóxica dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 frente à linhagem células MCF-7. As amostras apresentaram importante atividade antiproliferativa e citotóxica com diferença estatística significativa, sendo que IP-Se-06 obteve o menor

número de colônias. Podemos observar resultado semelhante destes compostos frente às células tumorais HepG2.

3.7 MORTE CELULAR INDUZIDA PELAS IMIDAZO[1,2-a]PIRIDINAS SELENILADAS

Ao avaliar a capacidade das imidazopiridinas em induzir a morte celular, foi possível constatar que todos os eventos apresentados anteriormente culminaram em morte das células HepG2. O resultado sugere que os compostos foram capazes de levar as células tumorais à morte pelo processo de apoptose e necrose, diminuindo significativamente as células viáveis como pode ser observado na figura 16.

Figura 16 – Indução da morte celular em células HepG2, via apoptose e necrose pelos tratamentos com as imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas.



Legenda: Morte celular analisada pela coloração com LA/IP, induzida pelo tratamento com imidazopiridinas em concentrações sub-tóxicas em células HepG2, durante 72 h. Número de células viáveis, apoptóticas e necróticas, representado em porcentagem. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. (***) indicam diferenças estatísticas de $p < 0,001$ e (**) indicam diferenças estatísticas de $p < 0,01$ em comparação com células do controle negativo (não tratadas).

Valores expressos como média \pm D.P. Os resultados foram avaliados pelo teste de Bonferroni ao nível de 95% de significância.

O composto IP-Se-06 apresentou majoritariamente células apoptóticas e maior número de células necróticas quando comparados ao controle. Já o composto IP-Se-05 apresentou apenas células necróticas em maior número, quando comparado ao controle. Estes resultados demonstram que o composto IP-Se-06 possui efeito antiproliferativo e também induziu a apoptose em células HepG2. A morte celular por apoptose é desejável para a eliminação de células danificadas, uma vez que normalmente não acarreta em processo inflamatório (KERR et al., 1994; OUYANG et al., 2012).

Almeida e colaboradores (2018) avaliaram o potencial envolvimento dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 em induzir morte celular. A porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas tiveram diferença estatística significativa em relação ao controle. 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 em relação ao controle.

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

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho, até o momento, nos permitem concluir que as cromonas seleniladas:

- Apresentaram efeitos citotóxicos importante sobre a linhagem tumoral de mama (MCF-7) cultivada *in vitro*.
- Em doses sub-tóxicas o composto C3 foi capaz de reduzir a proliferação celular.
- O composto C1 interagiu com CT-DNA por intercalação e causou efeito hipercrômico.
- O composto C3 interagiu com CT-DNA por intercalação e causou efeito hipocrômico em baixas concentrações.

Já dados obtidos sobre as imizado [1,2a]piridinas permitem concluir que:

- Apresentaram efeitos citotóxicos importante sobre as linhagens tumorais de hepacarcinoma (HepG2) cultivadas *in vitro*.
- Em doses sub-tóxicas IP-Se-06 foi capaz de reduzir a proliferação celular.
- O composto IP-Se-06 induziu a morte das células tumorais principalmente por apoptose.

Pode-se concluir que os resultados apresentados são bastante promissores e abrem portas para estudos mais aprofundados buscando elucidação do mecanismo de ação das cromonas e das imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas. Além disso, propõe-se modificações estruturais principalmente nas moléculas das cromonas, que possam conduzir a um melhor e mais promissor efeito citotóxico e antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B., et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5a ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 1205-1256, 2010.
- ALCOLEA, Verónica et al. Novel seleno-and thio-urea derivatives with potent in vitro activities against several cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 113, p. 134-144, 2016.
- ALMEIDA, G. M. Estudo *in vitro* do potencial antitumoral de novos derivados de imidazo[1,2-a]piridinas seleniladas. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/references.html>. Acesso eletrônico em 27 de novembro de 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/118661/mod_resource/content/2/hystory_cancer.pdf. Acesso eletrônico em 27 de novembro de 2019.
- AMIN, K. M.; SYAM, Y. M.; ANWAR, M. M., et al. Synthesis and molecular docking studies of new furochromone derivatives as p38a MAPK inhibitors targeting human breast cancer MCF-7 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.25, p. 2423-2436, 2017.
- AUFFRET, G.; LABAIED, M.; FRAPPIER, F., et al. Synthesis and antimalarial evaluation of a series of piperazinyl flavones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 959–963, 2017.
- BAGDI, A. K., et al. Synthesis of imidazo[1,2-a]pyridines: a decade update. **Chemical Communications**, v. 51, n. 9, p. 1555–1575, 2015.
- BARVE, V.; AHMED, F.; ADSULE, S., et al. Synthesis, molecular characterization, and biological activity of novel synthetic derivatives of chromen-4-one in human cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 3800–3808, 2006.
- BHATNAGAR, S.; SAHI, S.; KACKAR, P., et al. Synthesis and docking studies on styryl chromones exhibiting cytotoxicity in human breast cancer cell line. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4945–4950, 2010.
- BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N., et al. Global cancer transitions according to the human development index (2008–2030): A population-based study. **Lancet Oncol**, v. 13, p. 790–801, 2012.

BUDZISZ, E.; GRACZYK-WOJCIECHOWSKA, J.; ZIEBA, R., et al. A new series of 2-substituted 3-phosphonic derivatives of chromone. Part II. Synthesis, in vitro alkylating and in vivo antitumour activity. **New Journal Chemistry**, v. 26, p. 1799–1804, 2002.

CHAUBEY, A.; PANDEYA, S. N. Pyridine: a versatile nucleuse in pharmaceutical field. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. 4, p. 5-8, 2011.

CLARK, Richard F. et al. Selenium poisoning from a nutritional supplement. **Jama**, v. 275, n. 14, p. 1087-1088, 1996.

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 Prevention**, 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.

DA SILVEIRA, Vivian Chagas et al. Binding of oxindole-Schiff base copper (II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1692-1703, 2011.

DANKÓ, B.; TÓTH, S.; MARTINS, A.; et al. Synthesis and SAR study of anticancer protoflavone derivatives: investigation of cytotoxicity and interaction with ABCB1 and ABCG2 multidrug efflux transporters. **ChemMedChem**, v. 12, p. 850-859, 2017.

DRAKE, E. N. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. **Medical hypotheses**, v. 67, n. 2, p. 318-322, 2006.

DYRAGER, C.; M€OLLERS, L. N.; KJ€ALL, L. K., et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Chromone-Based p38 MAP Kinase Inhibitors. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 7427-7431, 2011.

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.

FAGUET, G.B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 2022–2036, 2015).

FERNÁNDEZ-BANÁRES, F. et al. Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 8, p. 2103, 2002.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1757, p.1371–1387, 2006.

FRANKEN, N.A.P.; RODERMOND, H.M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells *in vitro*, **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315–2319, 2006.

FRESHNEY, R.I. Freshney's Culture of Animal 413 Cell – A Multimedia Guide, John Wiley & Sons Ltd., NY, 1999002E

GASPAR, A.; MATOS, M.J.; GARRIDO, J.; URIARTE, E.; BORGES, F. Chromone: a valid scaffold in medicinal chemistry. **Chem Review**, v. 114, p. 4960–4992, 2014.

HAJDU, S. I.; VADMAL, M.; TANG, P. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 7. **Cancer Review**, p. 2480–2513, 2015

HARMER, V. Breast cancer: Part 2: present and future treatment modalities. **British Journal of Nursing**, 17, p. 1028-9-1032-5, 2008.

HUGHES, J.T. The Edwin Smith Surgical Papyrus: An analysis of the first case reports of spinal cord injuries. **International Medical Society of Paraplegia**, v. 26, p. 71-82, 1988.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA: <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>. Acesso eletrônico em 21 de maio de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso eletrônico em 22 de maio de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA: <https://www.inca.gov.br/tratamento>. Acesso eletrônico em 02 de junho de 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC: <http://gco.iarc.fr/>. Acesso eletrônico em 22 de maio de 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. Acesso eletrônico em 22 de maio de 2019.

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

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

KERI, R.S.; BUDAGUMPI, S.; PAI, R.K., et al. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 340–374, 2014.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R.. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, p.239, 1972.

KERR, J. F.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V.. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v.73, p.2013–26, 1994.

KHAN, K.M.; BREEN, A. N.; MUGHAL, U.R., et al. 3-Formylchromones: potential antiinflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 4058–4064, 2010.

KOBAYASHI, Y.; SAITO, Y.; GOTO, M.; et al. Antitubulin effects of aminobenzothiophene-substituted triethylated chromones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 2731-2735, 2017.

KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, p. 1439, 2003.

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

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

MAJNO, G.; and JORIS, I.. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v.146, p.3–15, 1995.

MARTINS, I. L.; Charneira C.; Gandin V.; et al. Selenium-containing chrysin and quercetin derivatives: attractive scaffolds for cancer therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 4250-4265, 2015.

MASSOD, I; KLANL, M. H.; AHMAD, M. Major contributions towards finding a cure for câncer through chemotherapy: a historical review. **Tumori Journal**, v. 102, p. 6–17, 2016.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol Methods**. v. 16, p. 55-63, 1983.

MUSTACICH, D.; POWIS, G. Thioredoxin reductase. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 1, p. 1-8, 2000.

NAM, D.H.; LEE, K.Y.; MOON, C. S., et al. Synthesis and anticancer activity of chromone-based analogs of lavendustin A. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4288–4292, 2010.

NAVARRO, M.; CISNEROS, F.E.J.; FERNANDEZ, M.M., et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania uinine* of [Cu(dppz)₂]BF₄. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 364-369, 2003.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS BRASIL: <https://nacoesunidas.org/cancer-de-colo-do-utero-e-terceiro-mais-comum-entre-mulheres-latino-americanas/>. Acesso eletrônico em 11 de junho de 2019.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS BRASIL: <https://nacoesunidas.org/agencia-especializada-ve-aumento-do-numero-de-mortes-por-cancer-no-mundo/>. Acesso eletrônico em 11 de junho de 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAUDE – OPAS BRASIL: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094. Acesso eletrônico em 03 de junho de 2019.

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. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 640–646, 2016.

PAN, S-T.; Li, Z-L.; He, Z-X.; Qiu, J-X., et al. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.43, p. 723–737, 2016.

PLANO, D.; KARELIA, D.; PANDEY, M., et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Selenium (Se-NSAID) Molecules as Anticancer Agents. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1946–1959, 2016.

PIRES, A. R. A.; LECERF-SCHMIDT. F.; GURAGOSSIAN. N.; PAZINATO, J., et al. New, highly potent and non-toxic, chromone inhibitors of the human breast cancer

resistance protein ABCG2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p.291–301, 2016.

REDDA, K. K.; GANGAPURAM, M.; GHAFARI, M. A., et al. Synthesis of substituted chromone-2-phenylcarboxamides as anti-breast cancer agents. **Cancer Research**, v. 74, p. 1, 2014.

REIS, J.; GASPAR, A.; MILHAZES, N.; BORGES, F. Chromone as a Privileged Scaffold in Drug Discovery: Recent Advances. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 7941–7957, 2017.

SANDSTROM, B. et al. Selenium status and absorption of zinc (^{65}Zn), selenium (^{75}Se) and manganese (^{54}Mn) in patients with short bowel syndrome. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 44, n. 10, p. 697-703, 1990.

SAYEED, I.B.; NAYAK, V. L.; SHAREEF, M.A. et al. Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridinepropenone conjugates as potent tubulin inhibitors. **Medicinal Chemistry Communications**, v.1, p. 1-10, 2017.

SILVEIRA, V.C.; Benezra, H.; LUZ, J. S., et al. Binding of oxindole-Schiff base copper (II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 1692-1703, 2011.

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

SOUZA, D; MARIANO, D.O.C; NEDEL, F; et al. New OrganochalcogenMultitarget Drug: Synthesis and Antioxidant and Antitumoral Activities of Chalcogenozidovudine Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 3329–3339, 2015.

HAJDU, S. I. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. **Cancer**, p. 1097-1102, 2011.

SUNKARI, S.; BONAM. S. R.; RAO, A. V. S., et al. Synthesis and biological evaluation of new bisindoleimidazopyridine hybrids as apoptosis inducers. **Bio-organic Chemistry**, 2019.

THANIGAIMALAI, P.; LE HOANG, T.A.; LEE, K-C., et al. Synthesis and evaluation of novel chromone analogs for their inhibitory activity against interleukin-5. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2531–2536, 2010.

TRUMP, B. F., BEREZESKY, I. K., CHANG, S. H., AND PHELPS, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicologic Pathology**, v.25, p.82–8, 1997.

VALDAMERI, G.; GENOUX-BASTIDE, E.; PERES, B., et al. Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 966–970, 2011.

VALDIGLESIAS, V.; PASÁRO E.; MÉNDEZ J., et al. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: A review. **Archives of Toxicologic**, v. 84, n. 5, p. 337-351, 2010.

VARGAS, A.; LÓPEZ, M.; LILLO, C., et al. El papiro de Edwin Smith y su trascendencia médica y odontológica. **Revista Médica de Chile**, v. 140, p. 1357-1362, 2012.

WANG, Gongke et al. Specific binding of a dihydropyrimidinone derivative with DNA: Spectroscopic, calorimetric and modeling investigations. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 7, p. 1656-1662, 2012.

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. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, n. 2017, p. 1083–1106, 2017.

YU, Ming-Whei et al. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. **American Journal of Epidemiology**, v. 150, n. 4, p. 367-374, 1999.

Zhang, X; Poniewierski, A; Sozan´ski, K., et al. Fluorescence correlation spectroscopy for multiple-site equilibrium binding: a case of doxorubicin–DNA interaction. **Royal Society of Chemistry**, v. 21, p. 1572, 2019.