



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

**Daniela Coelho dos Santos**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS  
SELENILADAS: DANOS OXIDATIVOS, MODULAÇÃO DA VIA DA  
AKT/MTOR, INIBIÇÃO DE NLRP3 E ATIVAÇÃO DA APOPTOSE**

**Florianópolis**

**2022**

**Daniela Coelho dos Santos**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS  
SELENILADAS: DANOS OXIDATIVOS, MODULAÇÃO DA VIA DA  
AKT/MTOR, INIBIÇÃO DE NLRP3 E ATIVAÇÃO DA APOPTOSE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, para a  
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Ourique da Silva

**Florianópolis**

**2022**

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

dos Santos, Daniela Coelho  
Atividade Antitumoral de Imidazo[1,2- a]piridinas  
seleniladas: Danos oxidativos, modulação da via da  
Akt/mTOR, inibição de NLRP3 e ativação da apoptose / Daniela  
Coelho dos Santos ; orientador, Rozangela Curi Pedrosa,  
coorientador, Fabiana Ourique da Silva, 2022.  
182 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. câncer. 3. estresse oxidativo. 4.  
efeito antiproliferativo e apoptose. 5. derivados de  
Imidazo[1,2-a]piridinas e selênio. I. Pedrosa, Rozangela  
Curi. II. da Silva, Fabiana Ourique. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. IV. Título.

Daniela Coelho dos Santos

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS  
SELENILADAS: DANOS OXIDATIVOS, MODULAÇÃO DA VIA DA  
AKT/MTOR, INIBIÇÃO DE NLRP3 E ATIVAÇÃO DA APOPTOSE**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Karina Bettega Felipe

Universidade Federal do Paraná

Dr. Flávio Augusto Barbosa

Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago

Prof. Dr. Maicon Roberto Kwiecinski

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rozangela Curi Pedrosa

"Sabe, Sancho, todas essas tempestades que acontecem conosco são sinais de que em breve o tempo se acalmará e que coisas boas têm de acontecer; porque não é possível que o bem e o mal durem para sempre, e segue-se que, havendo o mal durado muito tempo, o bem deve estar por perto."

*Dom Quixote de la Mancha*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, “inteligência suprema, causa primária de todas as coisas” por capacitar-me a enfrentar todas as adversidades encontradas até aqui.

À minha família, mãe, pai (*in memoriam*), irmãos e sobrinhos que compartilharam comigo os momentos mais felizes e também os mais tristes de nossas vidas. Com muita luta e suor, chegamos até aqui. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos e principalmente, por vivê-los comigo. Amo vocês para todo o sempre.

Às minhas amigas, agradeço por se fazerem presente em minha vida. Obrigada por serem porto seguro.

À minha amiga-irmã de alma Vanessa, minha dupla dessa e de outras vidas. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos e que ainda iremos compartilhar nessa vida. “Eu fiz dela um amigo, agora ela é única no mundo”.

À professora Dra. Rozangela Curi Pedrosa, minha querida orientadora. Muito obrigada pela oportunidade de aprender com você. Aprender sobre ciência e principalmente, sobre lidar com pessoas. Você com seu carinhoso olhar, sempre soube ressaltar o melhor de cada aluno. Obrigada por confiar no meu trabalho e pelos quatro anos de aprendizado que tive ao seu lado.

À professora Dra. Fabiana Ourique, minha amiga e coorientadora. Querida Fabi, obrigada por todos os ensinamentos. Com você aprendi todas as técnicas que executei no laboratório, mas muito mais que isso, aprendi sobre força de vontade e que podemos ir além quando trabalhamos de forma árdua e correta. Obrigada por ser minha dupla de laboratório e principalmente, minha amiga. Todas as nossas conversas, crises de risos e choros (e teve choro!) ficarão guardadas em meu coração.

Aos colegas do LABIOEX, principalmente Tâmila, Gabriela, Nadia, Raquel, Jean, Valdelúcia e Cynthia. Obrigada pelo apoio e por tonar os dias mais leves e divertidos. Sentirei saudade dos nossos cafés.

Aos professores “vizinhos” Profa Dra. Ariane Zamoner, Profa Dra. Fatima Mena Barreto e Prof. Dr. Marcelo Farina, pelos momentos de descontração, pela troca de materiais e reagentes e principalmente pela sempre disposição em ajudar. Obrigada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFSC, por contribuírem na minha formação.

Aos servidores do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB),  
pelo grande auxílio e atenção prestados ao longo desses quatro anos.

Aos funcionários da Secretaria Integrada de Pós-Graduação do CCB.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela  
bolsa concedida.

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) e o glioblastoma (GBM) caracterizam-se pela agressividade relacionada a alterações bioquímicas nos mecanismos de diferenciação, proliferação e morte celular. A busca por moléculas que possam atuar de forma efetiva e seletiva no tratamento desses tumores é relevante para a clínica médica. Compostos organoselênio e derivados de imidazopiridinas são amplamente utilizados na química medicinal e no desenvolvimento de fármacos. O principal objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antitumoral *in vitro*, *in vivo* e *in silico* de derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas. Derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas (0-1000  $\mu$ M, 72 h) foram testados quanto à citotoxicidade (MTT) e seletividade em linhagens tumorais (HepG-2 e A172) e não tumorais (McCoy e HT-22). Os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** apresentaram maior citotoxicidade e seletividade para HepG-2 com  $CI_{50}$  de 0,85  $\mu$ M e 0,03  $\mu$ M respectivamente, sendo selecionados para os ensaios posteriores. O ensaio clonogênico demonstrou efeito antiproliferativo do composto **IP-Se-06** ( $p < 0,01$ ) que foi confirmado pela redução dos níveis de Akt, ERK1 e ERK2, e proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular ciclina B1 e CDK2. **IP-Se-06** induziu a parada do ciclo celular em G1 ( $p < 0,05$ ) além de significativa diminuição do número de células na fase S ( $p < 0,01$ ) e G2/M ( $p < 0,05$ ). O composto **IP-Se-05** aumentou significativamente a necrose celular ( $p < 0,01$ ), enquanto **IP-Se-06** causou um aumento significativo da morte por apoptose ( $p < 0,01$ ) com aumento dos níveis de p53 e diminuição de Bcl-xL. **IP-Se-06** ocasionou aumento significativo nos níveis de EROs ( $p < 0,01$ ), ocasionando a fragmentação do DNA ( $p < 0,001$ ) e aumento dos níveis da  $\gamma$ -H2AX. Além disso, o composto **IP-Se-05** diminuiu os níveis da TrxR ( $p < 0,01$ ) e GPx ( $p < 0,001$ ). Já o composto **IP-Se-06** foi capaz de diminuir o conteúdo de GSH ( $p < 0,05$ ) e a atividade da GR ( $p < 0,05$ ), GPx ( $p < 0,001$ ), CAT ( $p < 0,01$ ) e TrxR ( $p < 0,001$ ). Assim, ambos os compostos se apresentam como compostos líderes para o desenvolvimento de novos antitumorais para o tratamento de hepatocarcinoma. Em células A172, **IP-Se-06** apresentou maior citotoxicidade ( $CI_{50}$  de 1,78  $\mu$ M) e seletividade. **IP-Se-06** ocasionou redução dos níveis de GSH ( $p < 0,05$ ) e atividade TrxR ( $p < 0,05$ ), e a diminuição dos níveis de NRF2. O composto induziu a despolarização de membrana mitocondrial ( $p < 0,001$ ) e liberação de citocromo *c* para o citosol. A condensação da cromatina foi confirmada pelo aumento da fluorescência com DAPI e o dano ao DNA confirmado pelo aumento nos níveis de  $\gamma$ -H2AX. **IP-Se-06** induziu a morte celular por apoptose ( $p < 0,01$ ), confirmada com a diminuição dos níveis de Bcl-xL e aumento de p53. A parada do ciclo celular em G1 ( $p < 0,05$ ) por **IP-Se-06** corroborou com a diminuição dos níveis de proteínas envolvidas na via Akt/mTOR e diminuição de HIF-1 $\alpha$ . O ensaio clonogênico demonstrou significativo efeito antiproliferativo de **IP-Se-06** ( $p < 0,001$ ). Além disso, a presença do inibidor de MEK (U0126) causou um efeito sinérgico em células expostas também ao **IP-Se-06** ocasionando uma redução significativa no número de colônias. A inibição da via MEK por **IP-Se-06** foi comprovada pela diminuição dos níveis de ERK 1/2. Ainda, **IP-Se-06** diminuiu os níveis de p-38, NLRP3 e caspase-1, reduzindo a resposta inflamatória



desencadeada pelo complexo inflamassoma. Os resultados *in vivo* (tumor ascítico de Ehrlich) demonstraram inibição do crescimento tumoral (42%), aumento na sobrevivência dos animais (49,43%) e diminuição da angiogênese ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com o composto **IP-Se-06** na concentração de 1mg/kg. Foi observado que o composto **IP-Se-06** não foi capaz de alterar os níveis plasmáticos de glicose quando comparado ao controle. Por fim, as predições previstas no ADMET em conjunto com os resultados obtidos até o momento apontam **IP-Se-06** como promissor composto líder para o desenvolvimento de um possível fármaco antitumoral; no entanto, destaca-se a necessidade de futuras modificações estruturais.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo, efeito antiproliferativo, apoptose, Imidazo[1,2-*a*]piridinas, selênio.

## ABSTRACT

The hepatocellular carcinoma (HCC) and glioblastoma (GBM) are characterized by aggressiveness related to biochemical changes in differentiation mechanisms proliferation and cell death. The search for molecules that can act effectively and selectively in the treatment of these tumors it is relevant to clinical medicine. Organoselenium compounds and imidazopyridine derivatives are widely used in medicinal chemistry and drug development. The main objective of this study was to evaluate the *in vitro*, *in vivo* and *in silico* antitumor potential of selenylated imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives. Imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives (0-1000  $\mu\text{M}$ , 72 h) were tested for cytotoxicity (MTT) and selectivity in tumor (HepG-2 and A172) and non-tumor (McCoy and HT-22) lines. The compounds **IP-Se-05** and **IP-Se-06** showed greater cytotoxicity and selectivity for HepG-2 with  $\text{IC}_{50}$  of 0.85  $\mu\text{M}$  and 0.03  $\mu\text{M}$  respectively, being selected for further assays. The clonogenic assay demonstrated an antiproliferative effect of the compound **IP-Se-06** ( $p < 0.01$ ) which was confirmed by the reduction in the levels of Akt, ERK1 and ERK2, and proteins involved in the progression of the cyclin B1 and CDK2 cell cycle. **IP-Se-06** induced cell cycle arrest in G1 ( $p < 0.05$ ) in addition to a significant decrease in the number of cells in phase S ( $p < 0.01$ ) and G2/M ( $p < 0.05$ ). The compound **IP-Se-05** significantly increased cell necrosis ( $p < 0.01$ ), while **IP-Se-06** caused a significant increase in death by apoptosis ( $p < 0.01$ ) with increasing p53 levels and decreasing Bcl-xL. **IP-Se-06** caused a significant increase in ROS levels ( $p < 0.01$ ), causing DNA fragmentation ( $p < 0.001$ ) and increased  $\gamma\text{-H2AX}$  levels. Furthermore, the compound **IP-Se-05** decreased the levels of TrxR ( $p < 0.01$ ) and GPx ( $p < 0.001$ ). The compound **IP-Se-06** was able to decrease the content of GSH ( $p < 0.05$ ) and the activity of GR ( $p < 0.05$ ), GPx ( $p < 0.001$ ), CAT ( $p < 0.01$ ) and TrxR ( $p < 0.001$ ). Thus, both compounds are presented as leading compounds for the development of new antitumor drugs for the treatment of HCC. In A172 cells, **IP-Se-06** showed greater cytotoxicity ( $\text{IC}_{50}$  of 1.78  $\mu\text{M}$ ) and selectivity. **IP-Se-06** caused a reduction in GSH levels ( $p < 0.05$ ) and TrxR activity ( $p < 0.05$ ), and a decrease in NRF2 levels. The compound induced mitochondrial membrane depolarization ( $p < 0.001$ ) and release of cytochrome c into the cytosol. Chromatin condensation was confirmed by increased fluorescence with DAPI and DNA damage was confirmed by increased  $\gamma\text{-H2AX}$  levels. **IP-Se-06** induced cell death by apoptosis ( $p < 0.01$ ), confirmed by a decrease in Bcl-xL levels and an increase in p53. The arrest of the cell cycle in G1 ( $p < 0.05$ ) by **IP-Se-06** corroborated with a decrease in the levels of proteins involved in the Akt/mTOR pathway and a decrease in HIF-1 $\alpha$ . The clonogenic assay demonstrated a significant antiproliferative effect of **IP-Se-06** ( $p < 0.001$ ). Furthermore, the presence of the MEK inhibitor (U0126) caused a synergistic effect in cells also exposed to **IP-Se-06** causing a significant reduction in the number of colonies. Inhibition of the MEK pathway by **IP-Se-06** was proven by the decrease in ERK 1/2 levels. Furthermore, **IP-Se-06** decreased the levels of p-p38, NRLP3 and caspase-1, reducing the inflammatory response triggered by the inflammasome complex. The *in vivo* results (Ehrlich ascitic tumor) showed inhibition of tumor growth (42%), increased animal survival (49.43%) and decreased angiogenesis ( $p < 0.05$ ) in animals treated with the compound **IP-Se-06** at a concentration of 1mg/kg. It was observed that the compound **IP-Se-06** was not able to change the plasma glucose levels when compared to the control.

Finally, the predictions of ADMET together with the results obtained so far point to **IP-Se-06** as a promising lead compound for the development of a possible antitumor drug; however, the need for future structural changes is highlighted.

**Key-words:** oxidative stress, antiproliferative effect, apoptosis, imidazo[1,2-*a*]pyridine, selenium.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações na fisiologia celular consideradas <i>Hallmarks</i> do câncer.....	22
Figura 2 – Oxidação da glicose em células não tumorais e o efeito Warburg em células tumorais.....	24
Figura 3 – Sinalização na via MAPK/ERK.....	27
Figura 4 – Cascata de sinalização PI3K/Akt/mTOR.....	30
Figura 5 – Via de ativação molecular do HIF-1 $\alpha$ .....	33
Figura 6 – A sinalização de p38 e JNK1 e JNK2.....	34
Figura 7 – O ciclo celular com suas diferentes proteínas reguladoras e vias que modulam seu funcionamento.....	36
Figura 8 – Principais alvos moleculares da p53.....	39
Figura 9 – Equilíbrio redox nas células tumorais.....	42
Figura 10 – Danos ao DNA e proteínas envolvidas em seu reparo.....	47
Figura 11 – Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3.....	49
Figura 12 – As vias extrínseca e intrínseca de apoptose.....	53
Figura 13 – Derivados de imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas.....	66
Figura 14 – Condensação da cromatina revelada pelo DAPI.....	72
Figura 15 – Células viáveis, apoptóticas e necróticas, respectivamente, após coloração com iodeto de propídio (IP) e laranja de acridina (AL).....	73
Figura 16 – Imunocitoquímica para localização de HIF-1 $\alpha$ .....	77
Figura 17 – Estrutura química dos compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> .....	83
Figura 18 – Efeito de imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas ( <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> ) sobre a proliferação celular em células HepG-2.....	85
Figura 19 – Tipo de morte induzida em células HepG-2 pelas imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas ( <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> ) e conteúdo de proteínas envolvidas na sinalização para a morte celular.....	86

Figura 20 – <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> modificaram a progressão do ciclo celular e a proliferação de células HepG-2.....	90
Figura 21 – Efeito dos compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> nos níveis das proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular em células HepG-2.....	91
Figura 22 – Efeito dos compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> sobre proteínas da via de sinalização ERK 1/2.....	93
Figura 23 – Efeito dos compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> sobre proteínas da via de sinalização Akt/mTOR.....	95
Figura 24 – Níveis de EROs em células expostas aos compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> ....	97
Figura 25 – Fragmentação do DNA e conteúdo de $\gamma$ -H2AX em células HepG-2 tratadas com <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> .....	99
Figura 26 – Alteração das defesas antioxidantes em células HepG-2 tratadas com <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> .....	101
Figura 27 – Alteração no conteúdo de GSH e atividade da TrxR em células A172 tratadas com <b>IP-Se-06</b> (1 $\mu$ M).....	106
Figura 28 – Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> sobre o conteúdo do fator de transcrição NRF2.....	108
Figura 29 – Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> sobre a função mitocondrial de células A172 e níveis de citocromo <i>c</i> .....	110
Figura 30 – Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> sobre a condensação da cromatina e conteúdo de $\gamma$ -H2AX em células A172.....	112
Figura 31 – Tipo de morte induzida em células A172 e níveis de proteínas envolvidas em sua sinalização após tratamento com <b>IP-Se-06</b> .....	113
Figura 32 – <b>IP-Se-06</b> altera a progressão do ciclo celular em A172.....	116
Figura 33 – Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> com conteúdo de proteínas envolvidas na via de sinalização Akt/mTOR.....	118
Figura 34 – Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> sobre o conteúdo de HIF-1 $\alpha$ em células A172.....	120
Figura 35 – Efeito de <b>IP-Se-06</b> sobre a proliferação celular em células A172.....	122
Figura 36 – Conteúdo de ERK 1/2 em células A172 expostas ao composto <b>IP-Se-06</b> ....	124

Figura 37 – Conteúdo de proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma NLRP3....	127
Figura 38 – Sobrevida de camundongos Balb-c transplantados com TAE e tratados com diferentes concentrações de <b>IP-Se-06</b> .....	130
Figura 39 – Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> e da doxorrubicina na inibição do crescimento tumoral e sobrevida dos animais transplantados com TAE.....	131
Figura 40 – Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> na angiogênese e na glicemia de animais transplantados com TAE.....	132

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados nos ensaios de imunoeletoforese.....	67
Tabela 2 – Citotoxicidade das imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas e índice de seletividade após o tratamento por 72 horas.....	82
Tabela 3 – Perfil citotóxico de imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas e índice de seletividade em células A172.....	104
Tabela 4 – Predição das propriedades ADMET para o composto <b>IP-Se-06</b> .....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A

AIF – Fator indutor de apoptose (*Apoptosis Inducing Factor*)

Akt – Proteína cinase B

AMPK – Proteína cinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)

Apaf-1 – Fator ativador de proteases pró-apoptose (*Apoptotic protease activating factor-1*)

ATM – Serina/Treonina Cinase ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*)

ATR – *Ataxia telangiectasia and Rad 3 related protein*

ATP – Adenosina trifosfato

Bad – Promotor de morte associado ao Bcl-2

Bcl-2 – Proteína de linfoma de células B2 (*B-cell lymphoma 2*)

Bcl-xL – Proteína de linfoma de células B extragrande (*B-cell lymphoma-extra large*)

CAT – Catalase

CDKs – Cinases dependentes de ciclinas

CDKN2A – Cinase dependente de ciclina 2A

CHC – Carcinoma hepatocelular

DAMPs – Padrões moleculares associados a perigos

DAPK1 – Proteína cinase 1 associada à morte (*Death-associated protein kinase 1*)

DCC – *Netrin 1 receptor*

DIABLO/Smack – *Second Mitochondrial derived activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with a LOw pI*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNA-PK – Proteína cinase dependente de DNA (*DNA dependent protein kinase*)

DSBs – Quebras de fitas duplas (*Double strand breaks*)

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Fas – Antígeno de apoptose 1 (*Apoptosis antigen 1*)

G6PD – Glicose 6-fosfato desidrogenase



GLUT – Transportador de glicose

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GRB2 – Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (*Growth factor receptor-bound protein 2*)

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione dissulfeto

HIFs – Fatores induzíveis por hipóxia

HIF-1 $\alpha$  – Fator 1-alfa de indução de hipóxia

HTRA – 2 Serina peptidase 2

IAPs – Proteínas inibidoras de apoptose

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

IP-Se – Imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas

IRS – Substrato do receptor de insulina

IDH – Isocitrato desidrogenase

kDa – Kilo Dalton

Keap 1 – *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LDH – Lactato desidrogenase

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno

MDM2 – *Murine Double minute-2*

MOMP – Permeabilidade da membrana mitocondrial (*Mitochondrial outer membrane permeabilization*)

mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian target of rapamycin*)

NADPH – Fosfato de dinucleotido de nicotinamida e adenina, forma reduzida

NF- $\kappa$ B – Fator Nuclear Kappa B (*Factor nuclear kappa B*)

NRF2 – Fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

ODDD – Domínio de degradação dependente de Oxigênio

p16 – Proteína supressora tumoral p16

p21 – Inibidor de cinase dependente de ciclina 1

p38 – Proteína cinase ativada por mitógeno p38

p53 – Proteína supressora tumoral p53

pAKT – Proteína cinase B fosforilada

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PARP – Poli(ADP-ribose)polimerase

PHD – Prolil hidroxilase

PIP2 – Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PIP3 – 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol

PI3K – Fosfatidilinositol-3 cinase

PTEN – Fosfatase homóloga à tensina (*Phosphatase and tensin homolog*)

Se – Selênio

SHC – Proteína 1 de transformação (*Transforming protein*)

SOD – Superóxido dismutase

TAE – Tumor ascítico de Erlich

TMZ – Temozolomida

TNF – Fator de Necrose Tumoral (*Tumour Necrosis Factor*)

TNFR1 – Receptor do fator de necrose tumoral 1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*)

TP53 – Gene da proteína p53

Trx – Tiorredoxina reduzida

TrxR – Tiorredoxina Redutase

Trx-S2 – Tiorredoxina oxidada

UNC5B – *UNC-5 netrin receptor B*

VEGF – Fator de crescimento endotelial (*Endothelial vascular growth factor*)

VHL – *Von Hippel-Lindau*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1 Conceitos gerais em neoplasias.....	22
1.2 Características biológicas, bioquímicas e moleculares do câncer: possíveis alvos terapêuticos para a terapia antitumoral.....	23
1.2.1 Reprogramação metabólica da célula tumoral.....	23
1.2.2 Vias de sinalização envolvidas na proliferação, sobrevivência e morte celular.....	26
1.2.3 Ciclo celular.....	35
1.2.4 Status oxidativo e defesas antioxidantes das células tumorais.....	39
1.2.5 Danos ao DNA.....	45
1.2.6 O papel do inflamassoma NLRP3.....	47
1.2.7 Mecanismos de Morte celular.....	51
1.2.8 Carcinoma hepatocelular: características gerais e bioquímicas.....	54
1.2.9 Glioblastoma: características gerais e bioquímicas.....	56
1.3 Imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas com ação antitumoral promissora.....	58
1.4 Compostos organoselênio com ação antitumoral.....	60
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	62
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	64
3.1 Objetivo geral.....	64
3.2 Objetivos específicos.....	64
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	66
4.1 Imidazopiridinas seleniladas.....	66
4.2 Reagentes e anticorpos.....	67
4.3 Ensaio biológicos <i>in vitro</i> .....	68
4.3.1 Cultura de células.....	68

4.3.2 Avaliação da viabilidade celular.....	69
4.3.3 Ensaio Clonogênico.....	70
4.3.4 Dano ao DNA.....	71
4.3.4.1 Índice de fragmentação do DNA (Teste Cometa) em células HepG-2.....	71
4.3.4.2 Detecção de condensação da cromatina para células A172.....	71
4.3.5 Morte celular.....	72
4.3.6 Ciclo celular.....	73
4.3.7 Avaliação do conteúdo de EROs intracelulares em células HepG-2.....	73
4.3.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em células de A172.....	74
4.3.9 Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	74
4.3.9.1 Avaliação da atividade da catalase (CAT).....	75
4.3.9.2 Atividade da Tiorredoxina Redutase (TrxR).....	75
4.3.9.3 Atividade da Glutathione redutase (GR).....	75
4.3.9.4 Atividade da Glutathione peroxidase (GPx).....	76
4.3.9.5 Conteúdo total de GSH.....	76
4.3.10 Ensaio de imunocitoquímica para detecção da HIF-1 $\alpha$ .....	76
4.3.11 Ensaio de imunoeletoforese.....	77
4.4 Ensaio biológicos <i>in vivo</i> .....	78
4.4.1 Animais.....	78
4.4.2 Modelo do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) – Protocolo Experimental.....	79
4.4.3 Inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevivência dos animais.....	79
4.4.4 Avaliação do efeito antiangiogênico.....	80
4.4.5 Avaliação do perfil glicêmico.....	80
4.4.6 Análise estatística.....	80

4.5 Ensaio <i>in silico</i> .....	80
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	82
5.1 Parte I – Efeitos das imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas em células HepG-2.....	82
5.1.1 Citotoxicidade e seletividade das imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas.....	82
5.1.2 Atividade antiproliferativa e tipo de morte celular induzida em células HepG-2.....	85
5.1.3 Efeito dos compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> sobre o ciclo celular.....	89
5.1.4 Compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> alteram vias de proliferação celular.....	93
5.1.5 Efeito de <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> nos níveis de EROs intracelulares e fragmentação do DNA em células HepG-2.....	97
5.1.6 Compostos <b>IP-Se-05</b> e <b>IP-Se-06</b> alteram as defesas antioxidantes.....	100
5.2 Parte II – Efeitos das imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas em células A172.....	103
5.2.1 Citotoxicidade de imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas em células A172.....	103
5.2.2 Efeito do composto <b>IP-Se-06</b> no conteúdo de GSH e atividade da TrxR em células A172.....	105
5.2.3 Disfunção mitocondrial, danos ao DNA e morte em células A172 expostas ao composto <b>IP-Se-06</b> .....	109
5.2.4 Alteração nas vias de proliferação celular em células A172 expostas ao composto <b>IP-Se-06</b> .....	115
5.2.5 Alteração do mecanismo de resposta inflamatória em células A172.....	126
5.3 Parte III – Efeitos das imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridinas seleniladas <i>in vivo</i> .....	129
5.3.1 Efeito antitumoral do composto <b>IP-Se-06</b> em animais transplantados com TAE.....	129
5.4 Parte IV – Predições dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos do <b>IP-Se-06</b> .....	135

5.4.1 Estudos <i>in silico</i> com <b>IP-Se-06</b> .....	135
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	140
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	141
<b>8. ANEXOS</b> .....	142
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	143

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Conceitos gerais em neoplasias

O conceito de neoplasias pode ser entendido como conjunto de desordens caracterizadas pela desregulação do ciclo celular e falhas nos mecanismos de morte programada, resultando em proliferação exacerbada e perda progressiva dos processos de diferenciação da célula (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Do ponto de vista bioquímico, pode-se inferir que o câncer é uma desordem genética causada por mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) que são adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões ambientais. Tais alterações modificam a expressão ou função de genes-chave que regulam diferentes vias de sinalização que são essenciais para o crescimento, sobrevivência e proliferação tumoral (ALBERTS *et al.*, 2010). Conforme descrito por Hanahan e Weinberg (2011), algumas características são fundamentais e compartilhadas entre diferentes tipos de cânceres, as quais os autores denominaram de *Hallmarks* do câncer (Figura 1).

Figura 1 - Alterações na fisiologia celular consideradas *Hallmarks* do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

## **1.2 Características biológicas, bioquímicas e moleculares do câncer: possíveis alvos terapêuticos para a terapia antitumoral**

O processo carcinogênico é determinado por diferentes eventos bioquímicos como: desregulação do ciclo celular, falhas no processo de morte programada e proliferação desordenada. Esses fatores podem ocorrer por diferentes mecanismos moleculares, como por exemplo, mutações nos genes de reparo ao DNA, inativação de supressores tumorais e ativação dos proto-oncogenes em oncogenes (VASQUEZ *et al.*, 2010).

Os proto-oncogenes são genes que controlam a proliferação e a diferenciação de células normais, porém, quando sofrem mutações, tornam-se oncogenes sendo responsáveis pelo crescimento celular exacerbado (ALBERTS *et al.*, 2010). Mutações também podem ocorrer em genes supressores de tumor conferindo, principalmente, a perda de sua função, como por exemplo, mutações no gene *TP53* (GURPINAR e VOUSDEN, 2015). Esta perda de função está intimamente relacionada ao descontrole da divisão celular, inibindo a parada do ciclo celular favorecendo diferentes vias de proliferação.

Ainda, quando há dano ao DNA, proteínas de reparo são direcionadas ao sítio danificado para realização do reparo nas duplas fitas. Caso este evento não seja conduzido de forma efetiva, indutores de apoptose sinalizarão para que esta célula seja encaminhada para a morte programada (apoptose). É imprescindível que os mecanismos de reparo ao DNA estejam com sua funcionalidade estabelecida pois mutações não reparadas, podem levar a instabilidade do genoma, que será posteriormente repassado para células filhas (PFEIFER, 2010).

### **1.2.1 Reprogramação metabólica da célula tumoral**

A reprogramação metabólica de células tumorais é reconhecida como uma das principais características do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011; PAVLOVA e THOMPSON, 2016). Esse processo está associado a rápida proliferação celular, sobrevivência, migração e metástase, além de resistência ao tratamento farmacológico do tumor (CAZZANIGA e BONANNI, 2015; PHAN *et al.*, 2014).

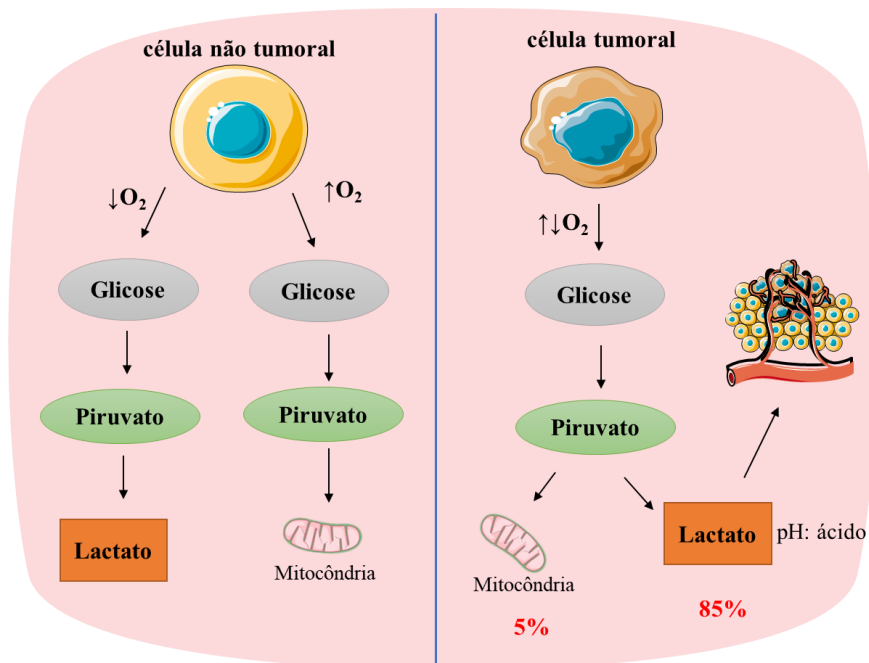
Células não tumorais em condições aeróbicas captam a glicose no trato gastrointestinal através de transportadores específicos (GLUT). No citosol, a glicose é metabolizada a piruvato onde será oxidada a acetil-coenzima A (acetil-CoA) no interior



da matriz mitocondrial. Esta por sua vez passa pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) seguido pela fosforilação oxidativa com alta produção de adenosina trifosfato (ATP). Na presença de oxigênio, este processo é denominado glicólise aeróbica. Na ausência de oxigênio, o piruvato pode ser direcionado para a formação de lactato via glicólise anaeróbica (GAO e CHEN, 2015).

A partir dos estudos de Otto Warburg, foi observado que células tumorais mesmo em condições normais de oxigênio tendem a converter glicose a lactato (SEMENZA, *et al.*, 2003; WARBURG, 1956). Este fenômeno passou a ser denominando de Efeito Warburg. Embora, a glicólise anaeróbica seja responsável por uma produção menor de ATP quando comparado com a glicose aeróbica, essa baixa eficiência é compensada pela maior expressão de GLUT-1, o que conduz ao aumento exponencial do transporte de glicose para o interior da célula tumoral (Figura 2). Tal alteração metabólica é imprescindível para célula tumoral, pois fornece os átomos de carbono necessários para a síntese de macromoléculas e organelas para as células em crescimento rápido (ZAMBRANO *et al.*, 2019).

Figura 2 - Oxidação da glicose em células não tumorais e o efeito Warburg em células tumorais.



Legenda. Na presença de oxigênio, as células metabolizam a glicose a piruvato através da glicólise e, então, o piruvato é oxidado na mitocôndria sendo direcionado ao ciclo de Krebs e posteriormente seus elétrons carregados pelo NADH ou FADH sendo finalmente acoplado a fosforilação oxidativa. Quando o conteúdo de oxigênio é limitado, as células direcionam o piruvato para a geração de lactato, através da glicólise anaeróbica. Células em estado de proliferação exacerbada, como as células neoplásicas, direcionam o maior

aporte de piruvato para a produção de lactato mesmo na presença de oxigênio, caracterizando o Efeito Warburg. O piruvato que não for convertido em lactato será oxidado pelo TCA. A excessiva produção de lactato implica na formação de ambiente acidificado favorecendo a angiogênese. Fonte: Imagem da autora.

Inicialmente, acreditava-se que as células tumorais sofriam essa readaptação metabólica por defeitos mitocondriais. No entanto, sabe-se que defeitos mitocondriais são incomuns nesse tipo de células (FREZZA e GOTTLIEB, 2009; VAUPEL; SCHMIDBERGER; MAYER, 2019) e que a grande maioria dos tumores retém a capacidade de fosforilação oxidativa. Alternativamente, foi proposto que o metabolismo glicolítico surge como uma adaptação às condições de hipóxia durante a fase avascular do desenvolvimento do tumor, uma vez que permite a produção de ATP na ausência de oxigênio. Por fim a adaptação ao microambiente ácido causada pelo excesso de produção de lactato impulsiona ainda mais o fenótipo glicolítico anaeróbico na célula tumoral (WANG *et al.*, 2020).

O crescimento desordenado da célula tumoral e sua rápida expansão ultrapassa o tempo necessário para uma nova geração vascular, resultando num fornecimento insuficiente de sangue e, conseqüentemente, de oxigênio para determinadas áreas dos tecidos tumorais. Tal ambiente, com baixas taxas de oxigênio limita a respiração mitocondrial e síntese de ATP, direcionando as células para a utilização da glicólise anaeróbica como a principal rota de produção de energia (VAUPEL; SCHMIDBERGER; MAYER, 2019). O aumento da produção de ácido láctico na glicólise gera um microambiente celular acidificado, o que favorece a promoção de angiogênese (CANTOR e SABATINI, 2012; WANG *et al.*, 2020). Portanto, propõe-se que o fenótipo glicolítico, além de conferir uma poderosa vantagem de crescimento, também é necessário para a evolução de tumores invasivos (ZHU E THOMPSON, 2019).

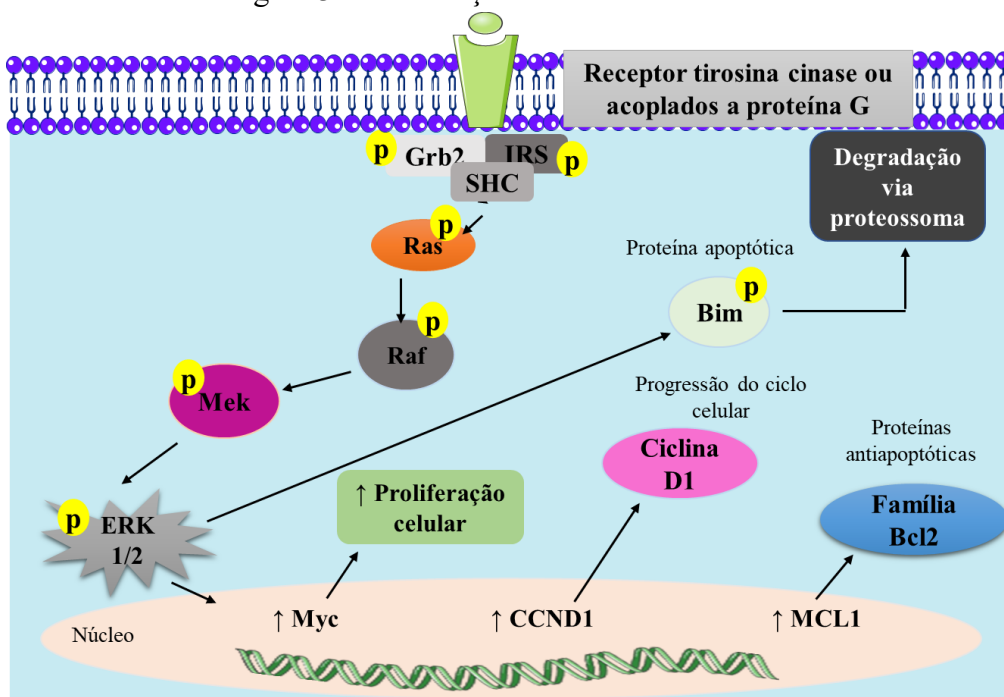
Essa reprogramação metabólica tem sido preferida por células tumorais por conferir substratos energéticos para a proliferação e sobrevivência em ambientes com baixa vascularização, formação de um microambiente acidificado e inibição de apoptose (HANAHAN e WEINBERG, 2011). O ambiente glicolítico exacerbado demonstra que as células tumorais são dependentes de glicose para sua proliferação e sobrevivência; sendo esta característica bioquímica importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas focadas nessa alteração metabólica (ZHU E THOMPSON, 2019). Diferentes abordagens visando pontos específicos no metabolismo glicolítico vêm sendo estudadas, como, por exemplo, inibição da enzima lactato desidrogenase (LDH) e a inativação dos

transportadores de monocarboxilatos, responsáveis pelo transporte de lactato através da membrana plasmática a fim de inibir a produção de substratos para o tumor (FANTIN *et al.*, 2006; LE *et al.*, 2010). Além disso, os níveis aumentados de GLUT-1 também representam um possível alvo terapêutico para o controle da proliferação de células tumorais (ANCEY; CONTAT; MEYLAN, 2018).

### **1.2.2 Vias de sinalização envolvidas na proliferação, sobrevivência e morte celular**

Células não tumorais possuem vias de sinalização bem reguladas para seu crescimento e proliferação, mantendo assim a homeostase celular. Por outro lado, em células tumorais, essas vias estão altamente desajustadas devido à desregulação de fatores de crescimento que se ligam em receptores na membrana celular com domínios intracelulares de tirosina cinase (HANAHAN e WEINBERG, 2011; MAYER e ARTEAGA, 2016). Em um ambiente não tumoral, as vias de proliferação celular MAPK/ERK e a PI3K/Akt/mTOR são ativadas por receptores de membrana com domínio tirosina cinase a partir da ligação de fatores de crescimento (Figura 3), no entanto, devido a diversas mutações encontradas no ambiente tumoral, é comum que essas vias sejam reguladas de forma autossuficiente.

Figura 3 – Sinalização na via MAPK/ERK.



Legenda. Cascata de sinalização de ERK. Uma vez que o receptor do tipo tirosina cinase acoplado a proteína G é ativo, a cascata de sinalização mediada por Ras leva a sucessivas fosforilações até a proteína ERK, ativando-a. No citoplasma, a ERK pode levar a fosforilação da proteína apoptótica Bim, o que leva a sua degradação proteossomal. No núcleo, a ERK 1/2 conduz a transcrição de Myc, CCND1 e MCL1, contribuindo para um ambiente proliferativo e resistente à morte celular. Fonte: Imagem da autora.

A via das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK), muitas vezes conhecida como cascata de proteínas cinases de Ras, é composta pelas proteínas Ras, Raf, proteína ativada por mitógeno/cinase regulada por sinal extracelular (MEK) e a cinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2). A via MAPK é uma das cascatas de sinalização mais bem caracterizadas que regula uma variedade de funções celulares, como proliferação, sobrevivência e apoptose celular, transmitindo sinais de fatores de crescimento extracelular para diversos efetores localizados no núcleo (LAVOIE e THERRIEN, 2015; LIU *et al.*, 2018).

Alguns autores consideram Ras como o principal componente desta via, devido ao fato de que mutações em *Ras* oncogênico parecem exercer importante papel no processo de carcinogênese, principalmente por promover sinalização celular proliferativa mediada por Fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) (DRAGAN, 2016). Os oncogênes *Ras* codificam proteínas mutadas que abrigam substituições de aminoácidos principalmente em glicina

12 e glutamina 16 em cânceres. Essas proteínas mutadas são constantemente ativadas independente do estímulo dos efetores. Entre a família *Ras* o *KRas* é a isoforma mais frequentemente mutada e ocorre em mais de 20% de todos os cânceres humanos (HOBBS; DER; ROSSMAN, 2016).

A ativação de Raf envolve uma série de processos complexos que incluem o recrutamento dessa proteína a formação de um complexo Ras-Raf, sendo a dimerização de Raf etapa fundamental para continuidade da via (WELLBROCK; KARASARIDES; MARAIS, 2004, GUO *et al.*, 2020). Após ser ativada, a proteína Raf fosforila e ativa MEK, seguida pela fosforilação positiva de ERK 1 (treonina 202 e tirosina 204) e ERK 2 (treonina 173 e tirosina 185). Em condições de repouso, a ERK 1/2 é ancorada no citoplasma por sua associação com MEK (FUKUDA *et al.*, 1997) e em situação de estímulo, a proteína ERK 1/2 é translocada para o núcleo onde ativará múltiplos fatores de transcrição que alterarão a proliferação e sobrevivência celular (GUO *et al.*, 2020).

A ERK1/2 possui papel crucial na progressão do ciclo celular, uma vez que sua ativação é essencial para a progressão da fase G1 para a fase S (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020; VOISIN *et al.*, 2010). Isso ocorre devido a transcrição da ciclina D1, principal ponto de regulação para a entrada no ciclo celular. A fase G2/M do ciclo também é modulada pela ERK 1/2 embora em menor grau, e a hiperativação da ERK 1/2 pode induzir inversamente a saída do ciclo celular, levando à senescência celular (DESCHÊNES-SIMARD *et al.*, 2014).

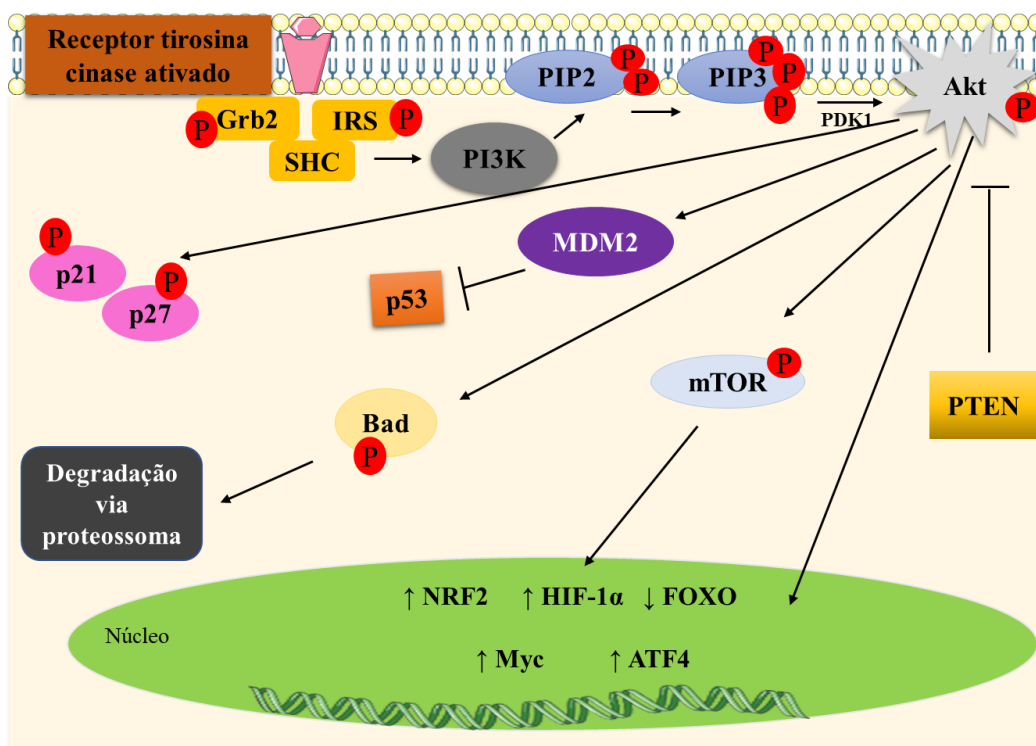
Como mencionado anteriormente, além de atuar no ciclo celular, a ERK1/2 parece atuar em vias de sobrevivência celular dificultando a morte por apoptose. Isso porque a ERK 1/2 é capaz de conduzir à fosforilação da proteína Bim através da estimulação de sua degradação via proteossoma. Ainda, pode exercer efeitos antiapoptóticos através da transcrição de *MCL1*, gene da família Bcl-2 contribuindo para um ambiente antiapoptótico (JACOBS *et al.*, 1999).

A ERK 1/2 também induz a transcrição do fator de transcrição Myc, responsável pela indução de genes que promovem o crescimento e a proliferação celular acarretando no aumento da expressão do transportador GLUT-1 e da maioria das enzimas glicolíticas, contribuindo de forma significativa na captação de substratos para as células tumorais (BLAKE *et al.*, 2016).

Apesar dos benefícios alcançados pelos inibidores de Raf e MEK, a quimiorresistência tornou-se o principal desafio de projetar e desenvolver novos inibidores direcionados à via de MAPKs (DEGIRMENCI; WANG; HU, 2020; SABIO e DAVIS, 2014). Nesse sentido, tem sido a heterogeneidade do câncer e a instabilidade genômica observadas nos tumores levam a ativação compensatória de componentes dessa via (LIU *et al.*, 2018). A exploração mais extensa da biologia das MAPKs leva à proposição de que seria benéfico o direcionamento de quimioterápicos para ERK 1/2, bem como combinar a inibição de ERK 1/2 com outros inibidores da via, visto que inibidores ERK 1/2 podem reverter a ativação anormal da via MAPKs induzida por mutações incluindo mutações *Ras* (AHRONIAN *et al.*, 2015; HATZIVASSILIOU *et al.*, 2012). Ainda, inibidores seletivos de ERK 1/2 foram associados a reversão da resistência adquirida aos inibidores de MEK (HATZIVASSILIOU *et al.*, 2012), bem como a dupla resistência aos medicamentos para BRAF e inibidores de MEK (CARLINO *et al.*, 2014; MERCHANT *et al.*, 2017). Acredita-se que os inibidores de ERK 1/2 podem ser menos sensíveis aos mecanismos de resistência do que os inibidores de proteínas da via das MAPKs. Assim, alvejar inibidores da proteína ERK 1/2 pode ser considerado de maior eficácia do que alvejar vias com direcionamento apenas para BRAF ou MEK, por exemplo (LIU *et al.*, 2018).

Além da ativação da via das MAPKs, a ativação de receptores do tipo tirosina cinase, levam a sinalização da via PI3K/Akt/mTOR (Figura 4).

Figura 4 – Cascata de sinalização PI3K/Akt/mTOR.



Legenda. Cascata de sinalização relacionada a sobrevivência e crescimento celular mediada por Akt. Uma vez que o receptor do tipo tirosina cinase é ativo, sucessivas fosforilações levam à ativação da proteína Akt. A Akt por sua vez leva a ativação de mTOR sinalizando para estímulos de proliferação e sobrevivência através da transcrição e/ou inibição de diferentes genes como *NRF2*, *Myc*, *FOXO* e *ATF4*. Além disso, no citoplasma, a Akt também pode atuar inibindo a p53 através do aumento de MDM2 assim como levar a progressão do ciclo celular através da fosforilação de p21 e p27 levando-as à degradação via proteossoma. Ainda, a Akt possui efeito antiapoptótico, uma vez que leva a fosforilação de Bad também conduzindo-a à degradação via proteossoma. Fonte: Imagem da autora.

O receptor do tipo tirosina cinase quando ativo é capaz de fosforilar o substrato do receptor de insulina (IRS) sinalizando para a conversão de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) que, então, desencadeará a fosforilação da proteína Akt. A Akt fosforilada (pAkt), ativa a mTOR que é responsável por estimular o crescimento, sobrevivência, proliferação celular e angiogênese tumoral (CARNEIRO *et al.*, 2008; EDIRIWEERA *et al.*, 2019).

A hiperativação da via da Akt é bem descrita no câncer (WANG *et al.*, 2017) e está relacionada com o processo de tumorigênese e resistência aos quimioterápicos (GASPARRI *et al.*, 2017; WITTIG-BLAICH *et al.*, 2011). A Akt estimula a glicólise aumentando a expressão de GLUT-1 através da estimulação do HIF-1 $\alpha$  pela mTOR, e também pode atuar ativando as principais enzimas glicolíticas, como a hexocinase e a fosfofrutocinase 2 (ELSTROM *et al.*, 2004; ROBEY e HAY, 2009). Outro substrato da

Akt é a família FOXO de fatores de transcrição (FOXO1, FOXO3A, FOXO4), que após a fosforilação são sequestrados do núcleo, evitando assim a expressão de seus genes alvo (GREER e BRUNET, 2008). Dado o programa de expressão do gene FOXO estabelecido, que inclui numerosos supressores de crescimento, proliferação e sobrevivência, com enzimas metabólicas específicas, a inibição de FOXO mediada por Akt tem sido implicada em vários aspectos do desenvolvimento e progressão do câncer (HORNSVELD *et al.*, 2018). Ainda, a Akt estimula as mudanças metabólicas que contribuem para o metabolismo anabólico, ativando diretamente as principais enzimas metabólicas e aumentando a expressão de GLUT-1 na membrana plasmática para impulsionar a captação de glicose por inibição da proteína que interage com a tiorredoxina (TXNIP), uma proteína que promove a endocitose de GLUT-1 e também é conhecida inibidora de TrxR (HOXHAJ e MANNING, 2019). Ainda, a sinalização de mTORC1 aumenta a tradução de Myc (CSIBI *et al.*, 2014), enquanto que a Akt promove sua estabilização ao inibir GSK3, que em condições normais fosforilaria o Myc direcionando-o para degradação proteossomal (WELCKER *et al.*, 2004).

A Akt também contribui para a ativação sustentada do fator nuclear eritróide 2 (NRF2), um fator de transcrição que controla a expressão de vários genes envolvidos na resposta antioxidante, incluindo enzimas envolvidas na síntese de glutatona e o sistema da tiorredoxina (TONELLI *et al.*, 2018). O NRF2 é um sensor celular de sinalização do estresse oxidativo e do fator de crescimento, entretanto, sua constante ativação no ambiente tumoral auxilia no aumento de defesas antioxidantes de células tumorais, o que contribui para a resistência a medicamentos quimioterápicos que apresentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como mecanismos de ação (LEE *et al.*, 2020).

A fosfatase homóloga à tensina (PTEN) inibe a conversão de PIP2 em PIP3, conferindo conseqüentemente uma atividade de regulador negativo da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. No entanto, devido a mutações, PTEN está inibida em uma grande variedade de tumores, e, desta forma sendo associada a processos carcinogênicos (JANKU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017).

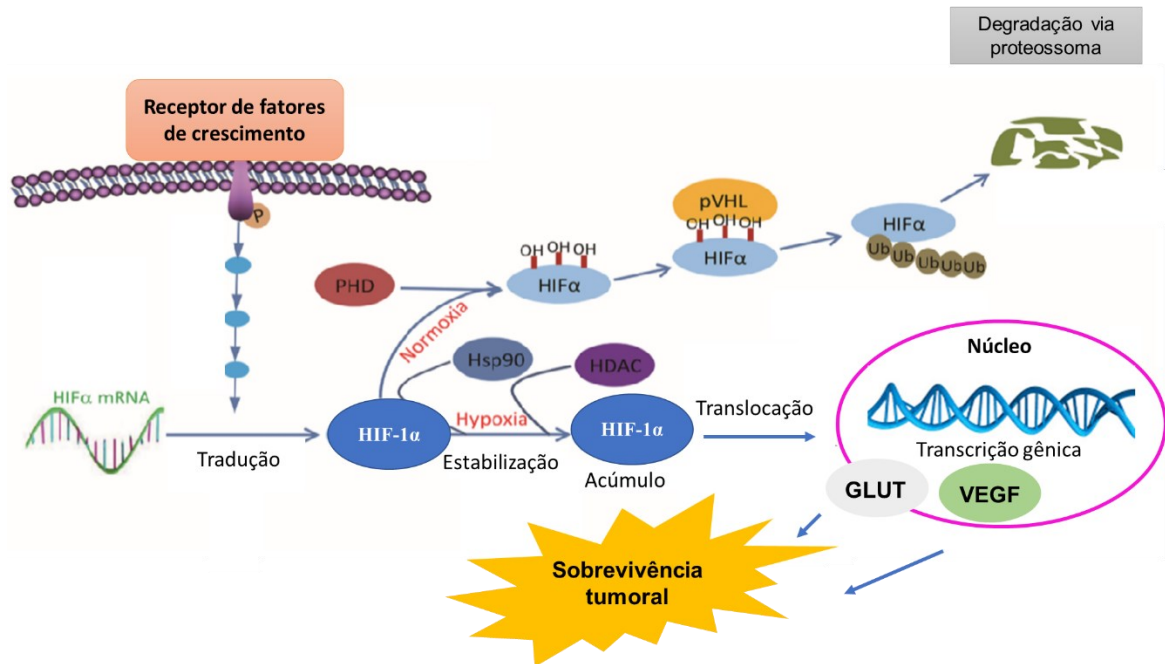
A ativação da Akt, auxilia na estabilização do HIF-1 $\alpha$ , importante fator de transcrição associado à malignidade tumoral (UNWITH *et al.*, 2015). Este é formado por duas subunidades: HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  faz parte de um complexo chave que medeia a resposta celular à hipóxia (BERTOUT *et al.*, 2008). Modificações pós-



transcricionais regulam a atividade do HIF-1 $\alpha$ , aumentando a estabilidade da proteína. A subunidade  $\alpha$  contém os domínios TAD-N e TAD-C que sob condições de hipóxia, justapõe-se ao domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD), mantendo a estabilidade da proteína. Em seguida, o domínio TAD-C interage com o co-ativador p300/CBP, promovendo a ativação total de HIF (KIZAKA-KONDOH *et al.*, 2009).

Em condições de normóxia, a estabilidade do HIF-1 $\alpha$  é regulada pela hidroxilação dependente de oxigênio. A associação do HIF-1 $\alpha$  com a proteína supressora de tumor *Von Hippel-Lindau* (VHL) é iniciada pela modificação pós-transcricional dada pela hidroxilação de resíduos de prolina, mediados pela prolil hidroxilase (PHD). A hidroxilação destes resíduos proporciona a associação do HIF-1 $\alpha$  com a VHL. Nesse momento, VHL atua como substrato de reconhecimento do complexo ubiquitina ligase E3, levando à rápida degradação do HIF-1 $\alpha$  via proteossoma (KIZAKA-KONDOH *et al.*, 2009; SEMENZA, 2008). No microambiente tumoral, a ativação de HIF-1 $\alpha$  leva à regulação positiva de mais de cem genes, que codificam proteínas chaves na angiogênese tumoral, proliferação celular, sobrevivência, metabolismo, invasão e metástase e inflamação (BALAMURUGAN, 2016; PENG e LIU, 2015; YANG *et al.*, 2015). O fator de crescimento endotelial vascular (*Endothelial Vascular Growth Fator* - VEGF) está associado à angiogênese tumoral e pode ser regulado por HIF-1 $\alpha$ . Além disso, o aumento da expressão de GLUT-1 mediada por HIF-1 $\alpha$  fornece maior captação de glicose pela célula tumoral garantido assim aporte de nutrientes para sua expansão e metástase (LOBODA *et al.*, 2010; MORLAND *et al.*, 2017) (Figura 5).

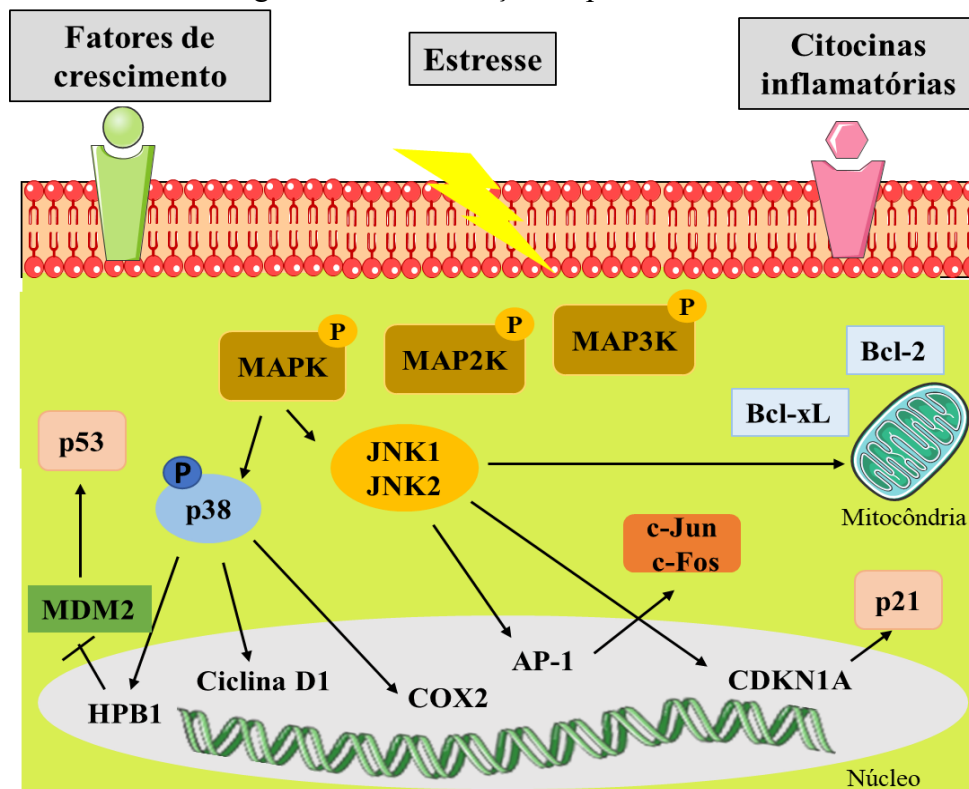
Figura 5 – Via de ativação molecular do HIF-1 $\alpha$ .



Legenda. Em condições de normóxia, HIF-1 $\alpha$  é ubiquitinizado após sua interação com VHL onde será degradado via proteossoma. Em condições de hipóxia, como no caso dos tumores, HIF-1 $\alpha$  será translocado para o núcleo onde sinalizará a transcrição e tradução de GLUT e VEGF e posterior translocação para a membrana celular. Fonte: Adaptado de Tianchi e colaboradores (2017).

As vias da c-Jun N-terminal cinase (JNK) e da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38), também denominada de vias da proteína cinase ativada por estresse, podem estar desreguladas no câncer. JNKs e p38 são proteínas cinases ativadas por estresses ambientais e genotóxicos e possuem papéis importantes na inflamação, bem como na homeostase do tecido, pois regulam a proliferação, diferenciação, sobrevivência e a migração celular (RINCÓN e DAVIS, 2009) (Figura 6).

Figura 6 – A sinalização de p38 e JNK1 e JNK2.



Legenda. Diferentes estímulos levam a ativação de JNKs e p38, como citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e estresse ambiental. Uma vez fosforilada, a proteína p38, é capaz de atuar na progressão do ciclo celular através da regulação de ciclina D1. Além disso, pode atuar elevando os níveis de COX2 e HPB1, este por sua vez é um inibidor de MDM2, o que leva ao aumento de p53. As JNKs podem atuar nos níveis de proteínas mitocondriais como Bcl-2 e Bcl-xL, assim como nos níveis de AP-1, importante fator de transcrição para ativação da via c-Jun/c-Fos. Além disso, as JNKs também podem atuar na progressão do ciclo celular através da regulação de CDKN1a, gene que codifica a proteína p21. Fonte: Imagem da autora.

A proteína p38 é responsável por diferentes funções celulares incluindo proliferação celular, resposta ao estresse, apoptose e sobrevivência celular (CUENDA E SANZ-EZQUERRO, 2017). Existem quatro genes que codificam a proteína p38: *MAPK14* (codifica p38 $\alpha$ ), *MAPK11* (codifica p38 $\beta$ ), *MAPK12* (codifica p38 $\gamma$ ) e *MAPK13* (codifica p38 $\delta$ ), entretanto, a maioria dos estudos refere-se a p38 $\alpha$  (ONO e HAN, 2000; CUENDA e ROUSSEAU, 2007). A p38 pode ser ativada por uma ampla gama de estímulos ambientais (choque térmico, mudanças na osmolaridade e estresse oxidativo), citocinas inflamatórias, PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados a danos) (KYRIAKIS e AVRUCH, 2012).

A importância da via p38 na regulação da resposta imune tem atraído considerável atenção no contexto da carcinogênese. As células imunes podem modular fortemente a

progressão do tumor, secretando citocinas e quimiocinas. Na verdade, o câncer e a inflamação estão fortemente associados (GRETEN e GRIVENNIKOV, 2019) e p38 possui papel fundamental devido sua capacidade em induzir mediadores pró-inflamatórios como a Ciclooxygenase 2 (COX2), que pode contribuir potencialmente para a progressão de diferentes tipos de câncer (YANG *et al.*, 2006). Além da COX2, outros mediadores inflamatórios podem ser regulados por p38, o que ocorre por meio da modulação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como NF- $\kappa$ B (CANOVAS e NEBREDA, 2021; WAGNER e NEBREDA, 2009) levando ao mau prognóstico do câncer. Por exemplo, em um modelo de câncer de mama, a deleção de p38 reduziu o volume do tumor assim como os níveis de marcadores inflamatórios, resultando em melhor sobrevivência dos animais (WADA *et al.*, 2017).

O papel da p38 na tumorigênese também foi explorado por Gupta e colaboradores (2014), que demonstraram que a p38 $\alpha$  é capaz de suprimir o dano epitelial intestinal associado à inflamação e a tumorigênese, entretanto contribui para a proliferação e sobrevivência das células tumorais do cólon. Recentemente, KO e colaboradores (2017) demonstraram que p38 desempenha papel na ativação do inflamassoma de NLRP3, regulando positivamente o perfil pró-inflamatório de diferentes doenças, incluindo o câncer. A p38 também possui papel pró-tumorigênico em células imunes, como macrófagos e células dendríticas, pois facilita o processo inflamatório, que foi associado à tumorigênese de cólon em modelos animais (YOUSSIF *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2018). Além disso, a ativação não canônica de p38 $\alpha$  em células-T promove um estado inflamatório que facilita o desenvolvimento de carcinoma ductal pancreático (ALAM *et al.*, 2015). Por fim, tem sido relatado que as células tumorais também dependem de p38 para produzir citocinas e quimiocinas que recrutam células mielóides pró-tumorigênicas para o nicho tumoral (ZONNEVILLE *et al.*, 2020).

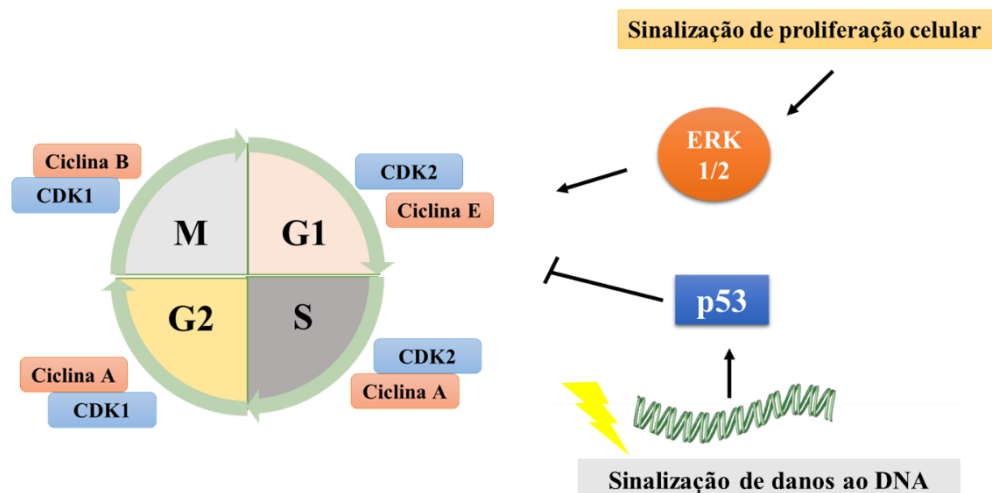
### **1.2.3 Ciclo celular**

A divisão celular é um processo altamente ordenado num ciclo de quatro fases: fase G1 (GAP1), fase S (Síntese de DNA), fase G2 (GAP2) e fase M (Mitose) (DIAS-MORALLI *et al.*, 2013). Se as condições do ambiente não estão favoráveis ao crescimento celular, as células permanecem na fase de quiescência denominada fase G0 (repouso celular). Nesta fase, o DNA está superrenovado com baixa atividade nuclear.

Na passagem da fase G0 para a fase G1 ocorre a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de diferentes constituintes celulares e a preparação para a síntese de DNA (WILLIAMS e STOEBER, 2012). Na fase G1 a célula responde a estímulos emitidos por vias de sinalização associadas ao crescimento e proliferação celular. Nesta fase ocorre a mobilização de fosfatos, bases nitrogenadas e riboses, para a síntese de aminoácidos, proteínas, enzimas e nucleotídeos. Após esse ponto, as células se comprometem com a replicação do DNA, mesmo que os sinais extracelulares, que estimulam o crescimento e a divisão celular sejam removidos (MALUMBRES e BARRACID, 2009).

Na fase S, ocorre a replicação do DNA (WILLIAMS e STOEBER, 2012). Após a síntese, as células fazem a progressão para a fase G2, preparando-se para a mitose. Nesta fase, o núcleo se prepara para a divisão celular rearranjando os cromossomos e se prepara para a mitose além de realizar o reparo de erros que eventualmente tenham ocorrido na duplicação do DNA (DE FALCO e DE LUCA, 2010). Em seguida, na fase M ocorre a movimentação dos cromossomos e clivagem das células, dividindo os pares desses para cada uma das células filhas, que podem entrar novamente no ciclo celular na fase G1, serem conduzidas à morte ou entrar em quiescência na fase sub-G1 (Figura 7).

Figura 7 - O ciclo celular com suas diferentes proteínas reguladoras e vias que modulam seu funcionamento.



Legenda. Visão geral do modelo clássico do ciclo celular com suas fases e respectiva regulação realizada por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Fonte: Imagem da autora.

Para assegurar a correta replicação e separação dos cromossomos, a progressão do ciclo é controlada em pontos de checagem molecular denominados *checkpoints*. Os

*checkpoints* asseguram que a replicação celular somente ocorra em condições favoráveis, garantindo assim a integridade do genoma (DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; WILLIAMS e STOEBER, 2012).

Existem três *checkpoints* bem descritos na literatura: (i) o ponto de restrição no final da fase G1, relacionado com o comprometimento celular a entrada no ciclo e a duplicação dos cromossomos; (ii) o ponto de checagem G2/M, responsável por desencadear os eventos iniciais que conduzem ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico; (iii) o ponto de checagem M (transição entre metáfase e anáfase), responsável pelo controle da separação das cromátides-irmãs, conduzindo a conclusão da mitose e citocinese (ALBERTS *et al.*, 2010).

O ciclo celular é regulado por dois importantes grupos de proteínas, as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) (BEHL e ZIEGLER, 2014; HERRERO-RUIZ *et al.*, 2014). A progressão normal do ciclo é determinada por fosforilações específicas que envolvem as ciclinas e suas parceiras catalíticas, as CDKs (MAKAREVIC *et al.*, 2014). As CDKs são enzimas heterodiméricas que dirigem a progressão do ciclo através da fosforilação de fatores regulatórios (SCHNERCH *et al.*, 2012). A atividade das CDKs é controlada pelo seu acúmulo durante a progressão do ciclo celular e subsequente degradação proteolítica de subunidades de ciclinas, fosforilação de subunidades de CDK, bem como por interações com inibidores de CDK (MURRAY, 2004). A união ciclina A/CDK2, por exemplo, está envolvida na replicação celular (COPELAND *et al.*, 2010), na progressão do ciclo celular e mitose (GONG *et al.*, 2007).

Em células de vertebrados existem quatro CDKs e diferentes complexos de ciclinas que atuam em conjunto. O ponto de restrição de G1 é marcado pela ação integrada da ciclina D e CDK4 ou CDK6. Já o estímulo para iniciar a fase S (transição das fases G1-S) é mediado pela ciclina E-CDK2, enquanto a regulação do final da fase S ocorre pela ciclina A-CDK2 e ciclina A-CDK1 (CHI *et al.*, 2008). Por fim, a mitose é regulada pela ciclina B-CDK1 (ALBERTS *et al.*, 2010). Essa regulação é de grande importância, uma vez que células tumorais apresentam um ciclo celular anormal, que é principalmente atribuído a alterações na estrutura e função das ciclinas e CDKs. Estudos voltados para os pontos de verificação do ciclo celular visando o desenvolvimento de abordagens de tratamento para diversas neoplasias tem sido o foco de diferentes pesquisas (WANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016).

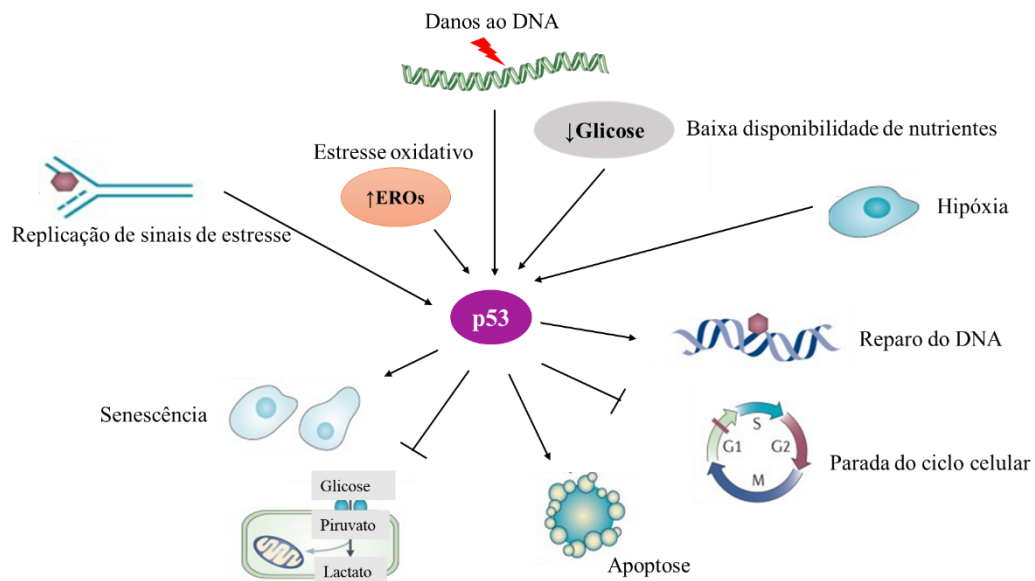
A ciclina D1 é superexpressa no carcinoma hepatocelular (CHC) (MALUMBRES e CARNERO, 2003) e este evento pode estar associado a alterações na via de sinalização MAPKs devido a superativação da ERK 1/2 (AKULA *et al.*, 2019; HWANG *et al.*, 2011). Segundo o estudo de Pereira e colaboradores (2016), a inibição da ERK 1/2 leva a diminuição dos níveis da ciclina D1 ocasionando parada do ciclo em G1 em células HepG-2. Ainda, segundo Tang e colaboradores (2020), a parada do ciclo celular em G2/M pode representar importante alvo terapêutico no tratamento de glioblastomas (GBMs) em linhagens celulares diferentes (U87 e U251). Wen e colaboradores (2019) relataram que a diminuição dos níveis de p-Akt representa uma estratégia viável para a parada do ciclo celular em gliomas devido a fosforilação e consequente inibição dos inibidores do ciclo celular, p21 e p27.

A proteína p53 é capaz de regular diferentes vias envolvidas na sobrevivência celular, reparo do DNA, apoptose e senescência, além de ser conhecida como “guardião do genoma”, sendo capaz de preservar a integridade do DNA em resposta a diferentes estímulos, como radiações ionizantes, insultos genotóxicos e estresse oxidativo (PERRI *et al.*, 2016). Em células não tumorais, a proteína p53 está relacionada à parada do ciclo celular uma vez que possíveis danos ao DNA tenham sido encontrados (ALBERTS *et al.*, 2017). Caso p53 direcione o DNA danificado para ser reparado, após o reparo, a p53 associa-se à proteína MDM2 (*Murine Double Minute-2*), revertendo o bloqueio celular e possibilitando o avanço para a fase S do ciclo celular (PERRI *et al.*, 2016). Por outro lado, quando a proteína não consegue reverter o dano ao DNA, a p53 exerce sua função pró-apoptótica ao induzir a parada do ciclo celular (OZAKI e NAKAGAWARA, 2011), estimulando a transcrição da proteína inibidora de cinase dependente de ciclina 1 (p21), a qual atua inibindo a atividade de CDKs e promovendo o bloqueio do ciclo celular em G1 (VERMEULEN *et al.*, 2003). Todavia, uma vez que p53 é mutada em grande parte dos tumores, esses processos ocorrem de forma incorreta, levando a replicação de células com DNA instável podendo levar ao processo carcinogênico. Mutações de p53 podem ser encontradas em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama, colo retal, gliomas, próstata e CHC (GURPINAR e VOUSDEN, 2015; PERRI *et al.*, 2016).

Estudos demonstram que, além da parada do ciclo celular, indução de senescência, reparo do DNA e apoptose, a p53 é capaz de exercer funções na regulação do metabolismo energético e na expressão de defesas antioxidante (ZHANG *et al.*,

2011). Em células não tumorais, a proteína p53 bloqueia a captação de glicose, inibindo a expressão de GLUT-1 e GLUT-4, além de reduzir a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que tem um papel importante no início na via das pentoses fosfato (ZAWACKA-PANKAU *et al.*, 2011). Entretanto, em condições aberrantes, como no ambiente tumoral, a proteína p53 não desempenha esse papel, podendo levar ao aumento de substrato energético para células tumorais, uma vez que a via das pentoses fosfato é frequentemente empregada por células tumorais (JIANG *et al.*, 2011) (Figura 8).

Figura 8 – Principais alvos moleculares da p53.



Legenda. Diferentes fatores de estresse podem levar a ativação de p53 incluindo privação de nutrientes, hipóxia, estresse oxidativo ou danos ao DNA. A ativação da p53 por esses sinais pode, conseqüentemente, promover diversas respostas que levam à supressão do tumor como parada do ciclo celular, senescência, apoptose, reparo de DNA, reprogramação metabólica oposta e limitar o acúmulo de EROs, ativando a autofagia. Fonte: Adaptado de Bieging; Mello; Attardi (2014).

#### 1.2.4 Status oxidativo e defesas antioxidantes das células tumorais

As EROs são formadas a partir da adição sequencial de elétrons ao oxigênio. A redução parcial do oxigênio gera o radical superóxido, que dá origem ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela sua subsequente redução. A adição de um elétron ao  $H_2O_2$  pode ser catalisada por metais como ferro (Fe) e cobre (Cu), gerando o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ).

A toxicidade das EROs é associada à sua capacidade em oxidar macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos conduzindo a danos celulares (SINGH *et al.*, 2019). A mitocôndria é uma grande produtora de oxidantes celulares (BRANDES *et al.*, 2014) uma vez que as enzimas da cadeia transportadora de elétrons podem doar um elétron para



o oxigênio molecular, gerando o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). O complexo III mitocondrial também gera  $O_2^{\bullet-}$  através da reação do oxigênio com uma ubiquinona instável, gerando  $O_2^{\bullet-}$  tanto no espaço intermembranas como na matriz mitocondrial (HOFFMAN e BROOKES, 2009). Outras flavoproteínas, como a  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase, piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, também contribuem para a produção de EROs mitocondrial (BINDOLI e RIGOBELLO, 2013).

O radical superóxido é responsável pela oxidação de centros ferro/enxofre [4Fe-4S] de proteínas. Nessa reação, o  $O_2^{\bullet-}$  oxida um dos átomos de ferro sendo reduzido à  $H_2O_2$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Apesar do ânion superóxido ser carregado negativamente evidências sugerem que ele pode atravessar canais de cloreto (MUMBENGEGWI *et al.*, 2008). O  $H_2O_2$  é capaz de oxidar grupos tióis de proteínas, formando ácido sulfênico, sulfônico e sulfínico, além de dissulfetos, que geralmente resultam em alterações na estrutura e função das proteínas e ao contrário do  $O_2^{\bullet-}$ , o  $H_2O_2$  é permeável a membranas biológicas, podendo agir em locais distantes de onde foi produzido (DALLE-DONNE *et al.*, 2007).

O radical hidroxila é formado pela redução de  $H_2O_2$  por metais de transição como  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$ , via reação de Fenton e, é capaz de reagir rapidamente com os componentes celulares perto do local onde foi gerado (MURPHY, 2009). Este radical, por ser muito reativo, é capaz de causar danos oxidativos em proteínas, peroxidação lipídica, além de quebras e oxidações nas fitas de DNA (YANG e STOCKWELL, 2016). Em condições fisiológicas, a capacidade antioxidante da célula é capaz de controlar os níveis de EROs produzidos naturalmente garantindo a homeostase celular. Porém, quando a produção de EROs torna-se excessiva, ocorre a quebra da homeostasia redox, predominando um ambiente oxidativo.

O direcionamento das EROs tem sido considerado uma estratégia promissora para a terapia antitumoral, pois pode estimular ou inibir diferentes vias de sinalização celular para induzir apoptose e autofagia, inibindo o crescimento do tumor (DU *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017). Sabe-se que à medida que o tumor progride, a atividade metabólica das células tumorais é aumentada, resultando em um aumento na produção de EROs e na subsequente ativação de vias de sinalização que apoiam a proliferação, a sobrevivência e a adaptação metabólica (CHANDEL e TUVESON, 2014), como por exemplo, ativação

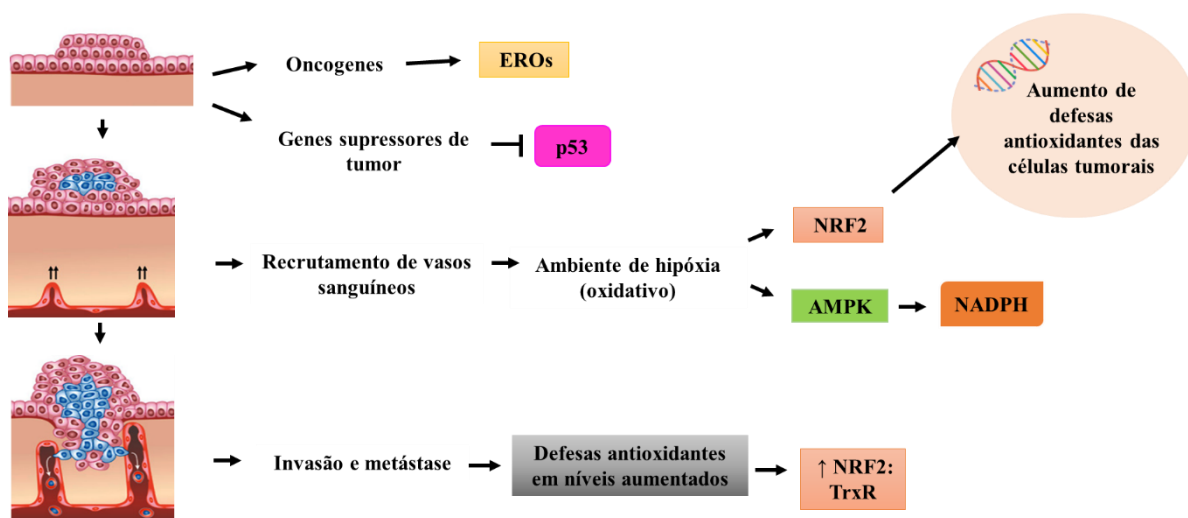
de HIF-1 $\alpha$  e *nuclear fator kappa B* (NF- $\kappa$ B) necessários para a tumorigênese (CHEUNG *et al.*, 2016).

O microambiente tumoral eleva os níveis de EROs devido à hipóxia, e os baixos níveis de glicose limitam o fluxo da via das pentoses fosfato, diminuindo assim os níveis citosólicos de NADPH. As células nessas condições privadas de nutrientes ativam a *AMP-activated protein kinase* (AMPK) para aumentar os níveis de NADPH (SAITO *et al.*, 2015). Essa capacidade de regular positivamente as proteínas antioxidantes e aumentar o fluxo de vias metabólicas produtoras de NADPH pode contribuir para a malignidade tumoral e formação de metástases (Figura 9).

Em contrapartida, para evitar níveis tóxicos de EROs, as células tumorais tendem a aumentar sua capacidade antioxidante para permitir a progressão do câncer (GORRINI *et al.*, 2013; HAMAÏET *et al.*, 2017). Assim, células tumorais possuem níveis mais elevados de proteínas que eliminam EROs quando comparado com as células não tumorais, impedindo a ativação mediada por EROs de vias indutoras de morte. Um mecanismo pelo qual as células tumorais aumentam sua capacidade antioxidante é pela ativação do fator de transcrição NRF2 (JARAMILLO e ZHANG, 2013). Uma vez ativo, o NRF2 induz a transcrição de diferentes proteínas antioxidantes, bem como enzimas envolvidas na síntese de GSH. Além disso, o NRF2 desempenha importante papel na ativação de proteínas que elevam os níveis de NADPH (DENICOLA *et al.*, 2015).

Essa capacidade antioxidante aumentada das células tumorais é frequentemente associada à resistência à quimioterapia, já que alguns medicamentos antitumorais são conhecidos por induzir citotoxicidade via geração de oxidantes (YANG *et al.*, 2018). Um exemplo clássico desses quimioterápicos é a doxorrubicina, que possui como principal mecanismo de ação a inibição da atividade da topoisomerase II, induzindo a parada no processo de replicação além de causar disfunção mitocondrial reduzindo a atividade dos complexos I e IV, aumentando desta forma, os níveis de espécies reativas e levando ao estresse oxidativo exacerbado (TACAR *et al.*, 2013). Esses achados sugerem que a diminuição da atividade de proteínas antioxidantes nas células tumorais levaria ao aumento dos níveis de EROs conduzindo a ativação de vias de morte celular por apoptose.

Figura 9 - Equilíbrio redox nas células tumorais.



Legenda. Células tumorais possuem alta produção de EROs devido à ativação de oncogenes e inibição de supressores tumorais. Os oncogenes induzem a inibição de p53, no entanto, à medida que o tumor progride, para impedir o acúmulo de EROs a níveis danosos, ocorre ativação de NRF2. Além disso, o ambiente de hipóxia devido a nova vasculatura é pobre em nutrientes, sendo necessário a ativação de AMPK para produção de NADPH. À medida que as células tumorais migram para formação de metástases, é necessário um aumento adicional nos níveis de EROs, o que requer aprimoramentos das defesas antioxidantes para evitar a morte celular. Fonte: Adaptado de Deberardinis e Chandel (2016).

Estudos demonstram indução de apoptose em células HepG-2 através da depleção de GSH, resultando em aumento de EROs e conduzindo as células tumorais a morte programada (KAHN *et al.*, 2013<sup>a</sup>; LEI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2020). Esses dados corroboram com os achados de Kang e colaboradores (2019), nos quais os autores demonstraram que o acúmulo de EROs produzido por alantolactona (um sesquiterpeno extraído de *Inula helenium*) induziu à parada do ciclo celular, supressão da via de sinalização da Akt e apoptose por ativação p53 em células HepG-2.

Segundo Ahmad e colaboradores (2016), existe uma relação entre estresse oxidativo e resistência à apoptose no glioblastoma. Os autores sugerem que a inibição de NRF2 elevaria os níveis de EROs o que conduziria à apoptose dessas células tumorais por ativação de p53 (VOLONTE *et al.*, 2013). Curiosamente, biópsias e pacientes diagnosticados com glioblastoma exibiram níveis elevados de NRF2, conforme descrito por Jaramillo e Zhang (2013). Ainda, Ahmad e colaboradores (2016) demonstraram que a modulação redox promovida pela ativação de NRF2 auxilia na proliferação e sobrevivência celular em células A172 e U87 (ambas linhagens celulares provenientes de glioblastomas humanos). Esses achados reforçam a hipótese de que a modulação redox pode ser de grande importância terapêutica para novos tratamentos antitumorais.

Estudos associam os níveis de EROs com a inibição da via da PI3K/Akt (PALANIVEL *et al.*, 2014). Zhong e colaboradores (2016) avaliaram o efeito antitumoral da Eupatilina (componente bioativo da planta *Artemisia*) frente a células de câncer renal humano (RCC 786), no qual foi constatado que o componente bioativo induziu apoptose das células tumorais através da indução de EROs e inibição da via de sinalização PI3K/Akt. No mesmo contexto, Hao e colaboradores (2015) relataram que o licochalcona A, um flavonoide extraído da raiz de alcaçuz, inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose das células tumorais gástricas através da modulação de MAPKs mediadas por EROs e vias de sinalização PI3K/Akt. Ourique e colaboradores (2015) também identificaram inibição da sinalização da Akt devido ao aumento de EROs em células MCF-7 e em tumor de Ehrlich submetidas ao tratamento com 1,4-naftoquinonas em associação com ascorbato.

As defesas antioxidantes podem ser de natureza enzimática ou não enzimática e são responsáveis por manter as EROs em níveis basais. Entre os antioxidantes não enzimáticos estão a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e o tripeptídeo glutaciona ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina – GSH). Por outro lado, as principais enzimas antioxidantes são: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), tioredoxina redutase (TrxR), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) (OYEWOLE E BIRCHMACHIN, 2015).

A GSH é um tripeptídeo que desempenha papel crucial na homeostase estado redox e é considerado o tiol de maior valor biológico, pois é responsável por prevenir o processo de apoptose das células, redução do ácido ascórbico e do  $\alpha$ -tocoferol, transporte de aminoácidos pela membrana plasmática, detoxificação de xenobióticos e também como cofator de enzimas antioxidantes (BIRBEN *et al.*, 2012; COUTO *et al.*, 2016; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Sua síntese ocorre pela ação de duas enzimas: glutamatocisteína ligase (GCL) e glutaciona sintetase. A GCL é responsável pela primeira das duas reações dependentes de ATP, formando  $\gamma$ -glutamilcisteína a partir de glutamato e cisteína. Em seguida, a glutaciona sintetase adiciona a glicina gerando uma molécula de GSH. Em seu estado oxidado, são formadas pontes dissulfeto entre duas moléculas de GSH, formando a GSSG. Por ser o tiol mais abundante na célula, a GSH é responsável por manter a homeostase do ambiente redox intracelular, dependendo de um equilíbrio entre seu estado reduzido e oxidado (GSH/GSSG) (COUTO *et al.*, 2016).

A GR é uma flavoenzima responsável por reduzir os níveis de GSSG, mantendo assim, os níveis de glutathiona reduzido, para tal processo é necessário a oxidação de NADPH. Em eucariotos, a GR encontra-se no citoplasma e na mitocôndria (COUTO *et al.*, 2016). As GPx são uma família de peroxidases que utilizam os equivalentes redutores da GSH para degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos orgânicos. Já foram identificadas oito isoformas de GPx em mamíferos e sabe-se que GPx1 e GPx4 possuem uma selenocisteína no seu sítio catalítico (PASSAIA e MARGIS-PINHEIRO, 2015). A GPx1 é expressa no citosol e mitocôndria (LIDDELL *et al.*, 2006). Já a enzima GPx4 é encontrada em membranas biológicas e é considerada a única GPx capaz de degradar peróxidos orgânicos complexos (BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013).

As TrxR são proteínas óxido-redutases envolvidas em processos celulares, como defesa frente ao estresse oxidativo, proliferação e viabilidade celular que envolvem trocas tióis-dissulfeto (LU e HOLMGREN, 2014). A TrxR catalisa a transferência de elétrons através de NADPH para a tiorredoxina (Trx). De forma semelhante ao grupo tiol da GSH, a oxidação da Trx envolve sulfidrilas em resíduos de cisteína no sítio ativo da molécula, onde forma-se ponte dissulfeto intramolecular, formando a Trx-S<sub>2</sub>. Essa é reduzida novamente à Trx, sendo recuperada por reação catalisada pela TrxR. A estrutura da Trx apresenta um domínio característico, o “domínio tiorredoxina”, composto de uma sequência de quatro aminoácidos (-Cys-Gly-Pro-Cys-), contendo duas cisteínas estruturalmente próximas em seu sítio ativo (LU e HOLMGREN, 2014; MAULIK e DAS, 2008).

A SOD desempenha importante papel na defesa do organismo contra o estresse oxidativo, uma vez que remove o radical superóxido por meio do processo de dismutação em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido a partir deste processo é reduzido a O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pela enzima CAT (JO *et al.*, 2008). A CAT é uma das proteínas capazes de degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células. Além disso, é uma das enzimas de atividade mais rápida conhecidas na natureza ( $k \sim 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), não necessitando de cofator para a sua atividade. Por ser encontrada quase que exclusivamente nos peroxissomos na maioria das células, sua atividade contra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado em outros compartimentos celulares pode ser limitada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Para evitar os efeitos prejudiciais do aumento de EROs, acredita-se que as células tumorais aumentem a atividade do seu sistema antioxidante a fim de promover a

sobrevivência e progressão do tumor (ISMAIL *et al.*, 2019). Nesse sentido, por exemplo, pode ser encontrado aumento da atividade da SOD<sub>2</sub>/MnSOD em diferentes tumores (TOLEDANO *et al.*, 2010). A glicólise também desempenha papel na homeostase redox em cânceres através da transferência de intermediários produzidos na via das pentoses-fosfato, resultando na produção de agentes redutores, como o NADPH e aumento da GSH gerado pela glutaminólise (LI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016<sup>a</sup>). Níveis elevados de GSH nas células tumorais são capazes de proteger essas células nos cânceres de medula óssea, mama, cólon, laringe e pulmão, conferindo resistência a vários medicamentos quimioterápicos (BANSAL e SIMON, 2018).

A TrxR também parece desempenhar um importante papel na progressão tumoral. A superexpressão da TrxR pode ser encontrada em diferentes tipos de câncer, como o colorretal (ZUO *et al.*, 2018), hepático (XING *et al.*, 2018) e gástrico (SHANG *et al.*, 2019). Esse fato pode estar associado à sua capacidade em inibir a PTEN, um inibidor conhecido da via de proliferação celular PI3K/Akt/Mtor. A ligação de Trx1 ao domínio C2 da proteína PTEN ocorre através de uma ligação dissulfeto inibindo sua atividade de maneira efetiva (ZHANG *et al.*, 2017).

### **1.2.5 Danos ao DNA**

O DNA é formado por um conjunto de nucleotídeos, os quais são constituídos por um grupamento fosfato, uma pentose e uma base nitrogenada, está podendo ser citosina, guanina, timina ou adenina, unidos através de ligações fosfodiéster. Ao longo de um dia a molécula de DNA sofre inúmeros insultos que podem conduzir a alterações no genoma (BAYNES e DOMINICZAK, 2010). No entanto, um sistema de checagem e reparo de dano ao DNA durante a progressão do ciclo celular, é capaz de reverter tais alterações. No caso de inibição desses pontos de checagem, as alterações serão transmitidas para as células-filhas durante a mitose, podendo dar início ao processo de carcinogênese (BERNSTEIN *et al.*, 2013). Por outro lado, defeitos no sistema de reparo do DNA, em células tumorais, permite o acúmulo de alterações genômicas que contribuem para um fenótipo mais agressivo (BASU, 2018; DIETLEIN *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2016).

Diferentes agentes químicos endógenos e/ou exógenos podem levar a modificações na molécula de DNA. Os agentes endógenos são produzidos pelo próprio metabolismo celular, principalmente as EROs. Já os danos exógenos ocorrem quando células são

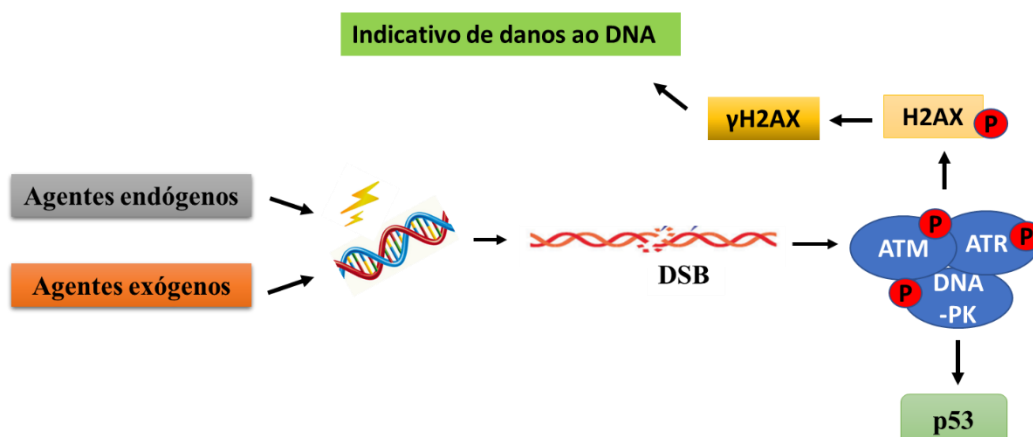
expostas a agentes externos como radiações ultravioleta, raios-X, tabagismo e/ou exposição a toxicantes, como os agrotóxicos, gerando assim, instabilidade genômica. Esses danos ao longo do tempo, podem ocasionar quebra de fita simples e/ou dupla, ligações cruzadas entre proteína-DNA e outras modificações em bases, levando a instabilidade do material genético (BASU, 2018). Em células tumorais, genes envolvidos na resposta de dano ao DNA, tais como *Breast cancer gene 1* e p53 estão mutados, assim como genes envolvidos na sinalização oncogênica como *Akt* e *c-Myc* estão hiperativos favorecendo a instabilidade genômica (KARANIKA *et al.*, 2015).

A proteína p53 participa diretamente na manutenção da integridade do genoma (GIORGI *et al.*, 2015; TOUFEKTCHAN E TOLEDO, 2018). A função da p53 é regulada por uma variedade de modificações pós-traducionais. Essas modificações ocorrem nas regiões N- e C-terminais da proteína e incluem ubiquitinação, fosforilação e acetilação (TANG *et al.*, 2008). A ubiquitinação de p53 ocorre na ausência de estresse celular e é mediada pela MDM2 (*murine double minute 2*), principal regulador dessa proteína. O MDM2 se liga e ubiquitina a p53, promovendo sua degradação via proteossoma (RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Isso permite que a p53 seja mantida em níveis baixos na ausência de estresse celular. Durante o dano ao DNA, são ativadas proteínas cinases, como ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad 3 related protein*) e DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (BARLEV *et al.*, 2001; LOUGHERY *et al.*, 2014; SAKAGUCHI *et al.*, 1998) que fosforilam a p53 em resíduos de serina (Ser-15, Ser-20, Ser-33, Ser-37 e Ser-46) e treonina (Thr-18), levando a sua estabilização (BARLEV *et al.*, 2001). O status de acetilação também determina a função dessa proteína. A acetilação da p53 estimula sua atividade transcricional (LUO, 2010) promovendo sua capacidade de ligar-se ao DNA, além de ativar genes como *MDM2*, *p21* e *Bax*, envolvidos na regulação da proliferação e apoptose celular (TANG *et al.*, 2008).

O DNA é ancorado por proteínas denominadas histonas, que são responsáveis por repará-lo em casos de danos. Após o dano ao DNA, principalmente na dupla fita ou DSBs (*doublestrand breaks*), as proteínas Mre11, Nbs1 e Rad50 fosforilam a proteína ATM que irá fosforilar a proteína H2AX, tornando-a  $\gamma$ -H2AX. Após os mecanismos de reparo do DNA, a  $\gamma$ -H2AX será desfosforilada pelas fosfatases PP2A, PP4C, PP6 e Wip1 (CHOWDURY *et al.*, 2005). Entretanto, caso o reparo não seja bem-sucedido, esta célula

com genoma danificado será encaminhada para apoptose via ativação de p53 (MARÉCHAL e ZOU, 2013). Sendo assim, o aumento da expressão da  $\gamma$ -H2AX é indicio de que o DNA celular foi danificado (PODHORECKA *et al.* 2010), conforme exemplificado na figura 10.

Figura 10 – Danos ao DNA e proteínas envolvidas em seu reparo.



Legenda. Agentes agressores podem causar danos à molécula de DNA levando a formação de DSBs. O complexo formado pelas proteínas ATM, ATR e DNA-PK são fosforilados após a sinalização de dano. Esse por sua vez, ativará a proteína para a fosforilação de H2AX que será convertida em  $\gamma$ -H2AX, o qual é um indicativo de danos ao DNA. Ao mesmo tempo, a ATM e ATR fosforilarão a proteína p53 para sua ativação. Conforme a extensão do dano, essa célula poderá ter seu genoma reparado ou em caso de dano extenso será encaminhada para via de morte celular por apoptose. Fonte: Da autora.

### 1.2.6 O papel do inflamassoma NLRP3

Está bem estabelecido que a inflamação causada por infecções virais ou microbianas contribui para a tumorigênese. Além disso, evidências demonstram que a inflamação também tem um papel fundamental na maioria dos estágios do desenvolvimento do câncer, além de interferir na capacidade do sistema imunológico de neutralizar as células tumorais e afetar a resposta ao tratamento (DIAKOS *et al.*, 2014; TOŁOCZKO-IWANIUK *et al.*, 2019). Esses mecanismos são impulsionados principalmente por células imunes inatas e adaptativas, como células dendríticas, macrófagos, célula *natural killer*, neutrófilos e linfócitos (COUSSENS e WERB, 2002; GRIVENNIKOV, GRETEN, KARIN, 2010).

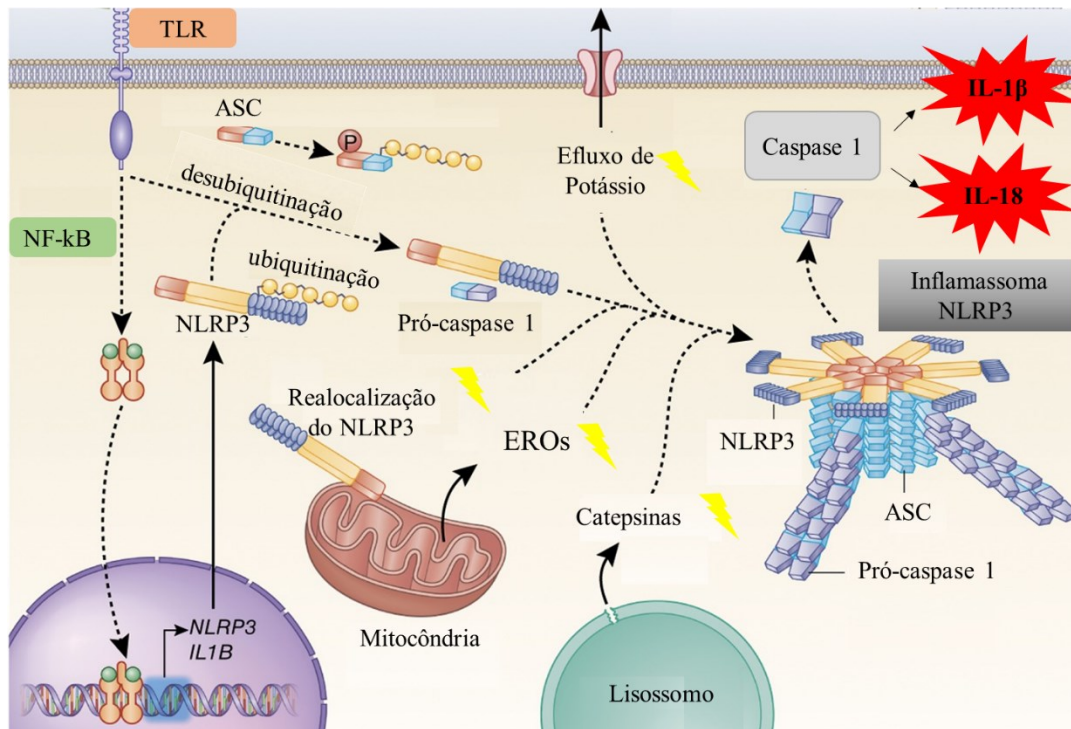
Um dos mecanismos centrais que contribuem para ativação da cascata inflamatória é mediado por proteínas que formam o complexo inflamassoma. Os inflamassomas são divididos com base em suas características estruturais e pertencem a uma família de receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões



(SCHRODER e SCHOPP, 2010). Os inflamassomas são capazes de se agregar em resposta a DAMPs (padrões moleculares associados a danos) e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) levando a ativação de respostas inflamatórias. Dentre a família dos inflamassomas, o inflamassoma NLRP3 é o mais caracterizado devido ao seu papel principal: ativação de caspase-1, que por sua vez, é responsável pela clivagem e ativação das formas precursoras das interleucinas IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 18 (IL-18) induzindo a resposta inflamatória (GURUNG, LUKENS e KANNEGANTI, 2015; MATHUR, HAYWARD, e MAN, 2018).

O inflamassoma NLRP3 é ativado em resposta a uma ampla gama de estímulos: efluxo de potássio para fora da célula, a geração de EROs mitocondrial, a translocação de NLRP3 para a mitocôndria, a liberação de DNA mitocondrial, e liberação de catepsinas para o citosol após a desestabilização lisossomal (VANAJA, RATHINAM, FITZGERALD, 2015; SUTTERWALA, HAASKEN, CASSEL, 2014) (Figura 11).

Figura 11 – Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3.



Legenda: Mecanismo de ativação do inflamassoma NLRP3. Primeiramente ocorre o reconhecimento de DAMPs ou PAMPs pelos receptores TLRs, principalmente pelo TLR-4, o qual induz uma sinalização intracelular para a ativação e translocação do fator de transcrição NF-Kb para o núcleo onde ele irá estimular a transcrição dos genes de IL-1β e da proteína NLRP3. Um segundo sinal, que pode ser a partir da liberação de catepsinas após desestabilização de membranas lisossomais, EROs mitocondriais, realocização do NLRP3 para a mitocôndria ou efluxo de potássio através de canais iônicos são necessários para induzir o recrutamento da proteína adaptadora ASC e recrutamento e ativação da pró-caspase-1 em caspase-1. Uma vez que a caspase-1 é ativada, o inflamassoma NLRP3 pode processar as pró-formas de IL-1β e IL-18 em interleucinas maduras que são liberadas e podem atuar como mediadores inflamatórios. Fonte: Adaptado de Guo; Callaway; Ting, 2015.

Para ocorrer ativação do inflamassoma NLRP3, são necessárias duas etapas: a primeira etapa é induzida por TLRs (receptores do tipo toll) e receptores de citocinas, como o receptor do fator de necrose tumoral (TNF) ou o receptor de IL-1 (IL-1R), que reconhecem PAMPs ou DAMPs. A ativação desses receptores leva a indução de sinalização celular para ativação do fator de transcrição NF-Kb que aumentará os níveis da proteína NLRP3 e interleucina 1β (MATHUR, HAYWARD, e MAN, 2018; CHRISTGEN, PLACE e KANNEGANTI, 2020). Após essa sinalização, um segundo sinal é necessário para o recrutamento da proteína adaptadora *Adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a card* (ASC) recrutará uma pró-caspase-1, que será ativada por autoproteólise a caspase-1, formando o complexo inflamassoma NLRP3 (LECHTENBERG, MACE e RIEDL, 2014). Uma vez que o inflamassoma está montado

e a caspase-1 ativa, há a conversão das pró-formas de IL-1 $\beta$  e IL-18 iniciando a resposta inflamatória.

A inflamação é um dos processos relacionados para o desenvolvimento e progressão do câncer (KARKI *et al.*, 2016), por isso, uma vez que o inflamassoma NLRP3 medeia a secreção de citocinas pró-inflamatórias, pode-se dizer que seu papel na tumorigênese deve-se ser explorado. Segundo Sorrentino e colaboradores (2015), a expressão de NLRP3 está aumentada em células dendríticas tumorais isoladas de amostras de pulmão humano de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas em comparação com sua expressão em indivíduos saudáveis. Miskiewicz e colaboradores (2015) identificaram alta prevalência de polimorfismo no gene rs35829419-*NLRP3* em pacientes com câncer pancreático quando comparado a indivíduos sem tumor. Ainda, Okamoto e colaboradores (2010) encontraram níveis de NLRP3 constitutivamente ativo em células de melanoma humano. Finalmente, o estudo de Guo e colaboradores (2014) constatou que a inibição do inflamassoma NLRP3 diminuiu a inflamação intestinal de camundongos sugerindo que a inibição dessa via contribui para a diminuição do processo inflamatório associado à doenças intestinais e consequentemente, o risco de câncer intestinal. Além disso, a produção de IL-18 mediada por NLRP3 em células de linfoma reduz a apoptose induzida por dexametasona, promovendo assim a proliferação desse tipo de células na fase S, sugerindo um papel carcinogênico de IL-18 mediada por NLRP3 no linfoma (Zhao *et al.*, 2017). Ainda, polimorfismos genéticos envolvidos com inflamassoma NLRP3 também foram associados ao câncer. Por exemplo, um polimorfismo de nucleotídeo único no gene *NLRP3*, *Q705K* (rs35829419), foi correlacionado com menor sobrevida em pacientes com câncer colorretal invasivo (UNGERBÄCK *et al.*, 2012). Yin e colaboradores (2018) investigaram a associação entre a expressão de NLRP3 e os graus de gliomas segundo a classificação da OMS e demonstraram que o inflamassoma NLRP3 pode atuar como promotor de tumor devido à capacidade de ativar a sinalização da Akt e transição epitelial-mesenquimal, contribuindo para o processo de metástase. Wang e colaboradores (2018) avaliaram a expressão de NLRP3 em amostras de pacientes com carcinoma epidermóide oral e compararam com amostras de pacientes sem a doença e os resultados do estudo demonstraram expressão significativamente maior de NLRP3 nas células tumorais, além disso, os autores correlacionaram os níveis de NLRP3 ao tamanho do tumor.

### 1.2.7 Mecanismos de Morte celular

O processo de morte celular é um conjunto de eventos que ocorre naturalmente nas células (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013) e são determinados por processos bioquímicos e morfológicos distintos, permitindo assim, a diferenciação quanto ao tipo de morte celular (YOUNG *et al.*, 2010). Porém, entre as principais habilidades adquiridas pelas células tumorais, durante a progressão do tumor, a resistência à apoptose destaca-se como uma de suas principais características (ADAMS e CORY, 2007). Dentre os modelos clássicos de morte celular existem dois tipos principais denominados apoptose e necrose (WALTON, 2017).

A apoptose é um evento que ocorre normalmente em várias etapas do desenvolvimento tecidual, bem como para a prevenção de danos celulares (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). É caracterizada pelo arredondamento celular, retração de pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear (SPENCER, 2011; SU *et al.*, 2013). Células apoptóticas apresentam pouca ou nenhuma modificação morfológica em organelas citoplasmáticas. Porém, sua membrana plasmática forma vesículas, os denominados corpos apoptóticos, os quais externalizam fosfolipídeos que sinalizarão para macrófagos fagocitarem essa célula, evitando a iniciação de processos inflamatórios (KROEMER *et al.*, 2009). O processo de apoptose é efetuado por caspases que são proteínas da família das cisteíno-proteases, e podem ser divididas em caspases iniciadoras e efetoras. As caspases iniciadoras estão envolvidas na ativação da cascata proteolítica, e as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem de substratos e efetivação do processo de morte (GHOBRIAL *et al.*, 2005).

Os mecanismos que levam a ativação de apoptose têm sido amplamente investigados sendo bem elucidados dois subtipos principais de apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 10) (GALLUZZI *et al.*, 2011). A via extrínseca é iniciada, principalmente, pela ativação de receptores de morte na membrana celular, que pertencem à superfamília TNF (*Tumour Necrosis Factor*) e são denominados: Fas (*Apoptosis Antigen 1*) e TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) (ICLIM e TAIT, 2016; SCHULZE-OSTHOFF, 1998). Tais receptores possuem um domínio de cisteína extracelular, o qual permite que reconheçam seus ligantes, ativando receptores de morte. Uma vez ativos, esses receptores interagem com FADD<sup>++</sup>. Essas moléculas recrutam a

caspase-8 e caspase-10 que ativam as caspases-3, 6 e 7 executando a morte celular por apoptose (PETER, 2011). Alternativamente, receptores de dependência como o UNC5B (*UNC-5 netrin receptor B*) e o DCC (*netrin 1 receptor*) podem estimular a via extrínseca da apoptose através da ativação da caspase-9 ou desfosforilação da DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) após a retirada de seus ligantes (CHIPUK *et al.*, 2006).

Em contraste, a via intrínseca da apoptose envolve a permeabilização da membrana externa mitocondrial com liberação de proteínas como, citocromo *c*, proteína mitocondrial de ligação DIABLO/Smack (*Second mitochondrial derived activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with a Low Pi*) e HTRA-2 (*Serine Peptidase 2*), que se liga à Apaf-1 (*Apoptotic protease activating Factor-1*) e à procaspase-9, para formar o complexo apoptossomo e ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7 (MUKHTAR *et al.*, 2012). A via intrínseca é controlada por proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad e Bid), e anti-apoptóticas da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-xL) que atuam na promoção e inibição da porosidade da membrana mitocondrial (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP), favorecendo ou inibindo a liberação do citocromo *c* para o citosol (BORNER, 2003). Ainda neste contexto, o gene supressor tumoral *TP53* regula a expressão de proteínas da família Bcl-2 (MUKHTAR *et al.*, 2012).

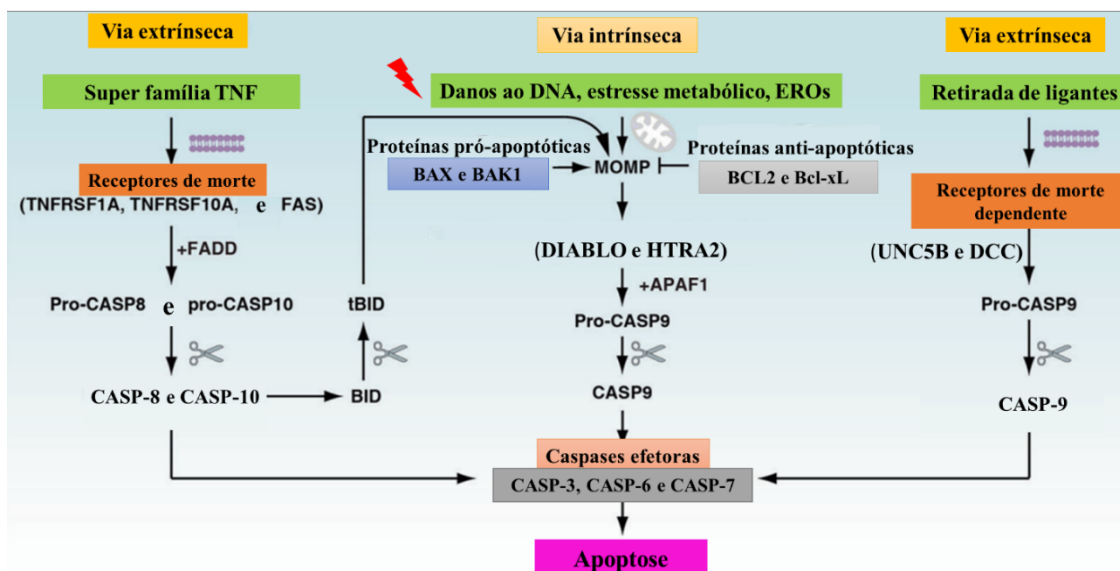
Uma vez ativa, a proteína Bax que está ancorada à membrana externa da mitocôndria, é capaz de interagir com a proteína Bid. Neste caso, a oligomerização da Bax promove abertura de poros na membrana mitocondrial liberando o citocromo *c* para o citoplasma. Esse processo não ocorre em células tumorais, pois a proteína anti-apoptótica Bcl-2 liga-se a Bax, impedindo sua oligomerização e, conseqüentemente, a morte celular (GOGVADE *et al.*, 2010).

O cálcio também contribui para o processo de apoptose. Seu aumento no espaço intermembranas das cristas mitocondriais leva a abertura de poros na membrana externa, permitindo o extravasamento de citocromo *c* (SU *et al.*, 2013). Enquanto o citocromo *c* liga-se a Apaf-1 e ativa diretamente caspase-9, DIABLO/Smac remove proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), NAIP, XIAP, c-IAP1, c-IAP2 e survivina, de sua ligação com as caspases (JENDROSSEK, 2012).

Os eventos finais do processo de morte celular pela via intrínseca ocorrem quando as caspases ativam a maquinaria de degradação do DNA. Ou seja, as caspases clivam a proteína PARP (*Poly (ADP-ribose) polymerase*) que se liga à molécula de DNA após a

detecção de algum dano. Quando a extensão do dano ao DNA é pequena ocorre a reparação e sobrevivência da célula; entretanto, se o sistema de reparo for insuficiente, a célula é encaminhada para morte celular (SODHI *et al.*, 2010) (Figura 12).

Figura 12 – As via extrínseca e intrínseca de apoptose.



Legenda. CASP-8 e CASP-10 iniciam a apoptose extrínseca mediada por receptores de morte, enquanto CASP-9 inicia a apoptose por retirada do ligante de receptor dependente. Danos ao DNA, hipóxia, estresse metabólico e outros fatores podem induzir a apoptose intrínseca, que começa com abertura de MOMP levando à liberação de proteínas mitocondriais no citosol (sendo este, controlado pela família Bcl-2). Apaf-1 recruta a pro-CASP9. A via extrínseca também pode desencadear a via intrínseca através da geração de BID truncado (Tbid) via CASP-8. O Tbid pode ainda translocar para a mitocôndria e causar MOMP através da ativação de Bax e Bak1. CASP-3, CASP-6 e CASP-7 são efetoras comuns tanto para a apoptose extrínseca quanto intrínseca. Fonte: Adaptado de Tang e colaboradores (2019).

A necrose é um tipo de morte celular traumática que pode ou não ser regulada (GALLUZZI *et al.*, 2011). Neste processo, a célula sofre um inchaço citoplasmático e mitocondrial, seguido de ruptura da membrana e liberação do conteúdo para o meio extracelular. Estes eventos ocasionam uma resposta inflamatória em células de tecidos vizinhos (D'ARCY, 2019). Sendo assim, um grande número de células é afetado, ocorrendo alterações irreversíveis no tecido acometido pela necrose (MORGAN e LIU, 2013).

Sabe-se que na carcinogênese o crescimento descontrolado associado a mecanismos de morte celular falhos contribui para a malignidade do tumor (YUE *et al.*, 2017). Um dos mecanismos que ativam a morte celular programada é a proteína p53; no entanto, esta proteína encontra-se mutada em diferentes tipos de cânceres humanos.

Segundo o estudo de Chaparro e colaboradores (2008), as mutações em p53 podem estar presentes em mais de 50% dos casos de CHC.

Outro mecanismo que dificulta a ativação de apoptose em células tumorais é o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas. A proteína Bcl-xL, um membro anti-apoptótico da família Bcl-2, que está envolvida na via mitocondrial de apoptose (YOULE e STRASSER, 2008) é superexpressa em CHC, conferindo uma vantagem de sobrevivência às células tumorais (SHIMIZU *et al.*, 2010). Essas proteínas se ligam a membros pró-apoptóticos incluindo Bax e/ou Bak, necessários para indução da permeabilidade mitocondrial e apoptose (KALE *et al.*, 2018). Como resultado, a homeostase das células tumorais é deslocada para um fenótipo anti-apoptótico dificultando a ativação de vias que estimulem a morte celular.

Em GBMs, foi relatado que níveis elevados de Bcl-xL estão correlacionados com baixa sobrevida de pacientes (LIWAK *et al.*, 2013; FANFONE *et al.*, 2020). Nesse sentido, Hlavac e colaboradores (2019) demonstrou que a inibição combinada de Bcl-2 e Bcl-xL induz a morte celular por apoptose em diferentes linhagens de GBMs, indicando que o direcionamento das proteínas da família Bcl-2 pode representar uma abordagem terapêutica para de morte celular em GBMs.

### **1.2.8 Carcinoma hepatocelular: características gerais e bioquímicas**

O CHC é o câncer hepático primário de maior incidência e a segunda maior causa de mortalidade por câncer de fígado, segundo o levantamento realizado pela *European Association for the Study of the Liver* (2018). Globalmente, o CHC não é apenas o tipo mais comum de tumor no sistema digestivo, mas também a principal causa de morte por doenças do trato gastrointestinal (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2015). A taxa de sobrevida dos indivíduos com CHC permanece baixa devido ao diagnóstico tardio, metástase, recorrência após a ressecção cirúrgica e ausência de um tratamento específico e eficaz (BAHARUDIN *et al.*, 2020; EL-SERAG, 2011).

Os fatores de risco de maior prevalência para o desenvolvimento do CHC são as doenças hepáticas crônicas, associadas principalmente à contaminação do vírus da hepatite C e ingestão indiscriminada de álcool e a cirrose (BALOGH *et al.*, 2016; SINGAL; LAMPERTICO; NAHON, 2020). Uma vez instalado, o CHC pode apresentar-se como um tumor unifocal, multifocal ou difusamente infiltrativo, sendo que todos os

padrões demonstram amplo potencial de invasão vascular, o que facilita metástases intra e extra-hepáticas (KUMAR *et al.*, 2014). Nesses casos, o tempo médio de vida do indivíduo não costuma ultrapassar doze meses, uma vez que o CHC está intimamente associado ao processo de caquexia, hemorragia de varizes esofágicas e insuficiência hepática (SINGAL; LAMPERTICO; NAHON, 2020)

Os principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do CHC têm sido associados a anormalidades em cascatas de sinalização direcionadas, principalmente as vias de sinalização de proteínas cinases, devido à hiperatividade da MAPK/ERK1/2 e PI3K/Akt/mTOR, o que contribui para a proliferação e inibição de morte celular (LIU *et al.*, 2018<sup>a</sup>), e está intimamente associada à agressividade deste tumor (JANKU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017). Além disso, devido à hiperatividade da Akt, o CHC possui alta proliferação celular com extensa formação de redes vasculares anormais, criando áreas hipóxicas no ambiente tumoral. Sabe-se que o HIF-1 $\alpha$  regula a expressão de muitas quimiocinas que estão relacionadas à metástase tumoral. Fei e colaboradores (2018) mostraram que o ambiente de hipóxia promove a migração e invasão de células provenientes do CHC através do eixo HIF-1 $\alpha$ -IL-8-Akt. Nesse sentido, estudos sugerem que a alta expressão de HIF-1 $\alpha$  (ZHANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018<sup>b</sup>) e GLUT-1 (SUN *et al.*, 2016) no CHC são os principais fatores causadores de metástase.

Kenmlina e colaboradores (2017) descreveram que algumas das alterações moleculares mais relevantes nessa neoplasia são mutações nos genes *telomerase reverse transcriptase (TERT)*, gene da proteína p53 (*TP53*) e o gene da cinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*). Ainda, a perda de função da proteína supressora tumoral PTEN é muito frequente em CHC. Os autores concluem que as anormalidades genômicas aliadas ao eixo PI3K/Akt/mTOR (ativo devido à perda de PTEN) são eventos importantes na progressão e agressividade dessa doença. Dada a relevância dessa sinalização, Huang e colaboradores (2018) sugerem a via PI3K/Akt/mTOR como um alvo potencial para a terapia do CHC.

Outra importante via para a busca de novos tratamentos do CHC, baseia-se na proteína p53. Em hepatocarcinomas, a ausência de p53 funcional tem sido proposta como um possível mecanismo para a resistência ao sorafenibe, quimioterápico amplamente utilizado no CHC em estágio avançado (WEI *et al.*, 2015). Embora a prevalência de mutações seja dependente da etiologia do tumor, o gene *TP53* é um dos genes mais



mutados em CHC (REBOUISSOU e NAULT, 2020) sendo relatado uma importante associação entre as mutações de *TP53* e o grau de diferenciação e sobrevida em pacientes com esse carcinoma (LI *et al.*, 2015). Estudos relatam que o mau funcionamento da proteína p53 pode ser observado em até 50% dos casos de CHC (CHAPARRO *et al.*, 2008; REBOUISSOU e NAULT, 2020). Por isso, fármacos que atuem ativando a proteína p53 podem ser promissores; como por exemplo, a cisplatina, que promove a apoptose das células HepG-2 através da regulação positiva de p53 (LI *et al.*, 2015).

Apesar do CHC não configurar entre os tipos de câncer mais prevalentes, a importância das pesquisas por novas terapias para auxiliar no tratamento dessa neoplasia dá-se em virtude da gravidade e da alta taxa de mortalidade, e também pela ausência de terapias seletivas e efetivas para esse tipo de tumor. A alta mortalidade encontrada nesses indivíduos, deve-se principalmente à falta de um fármaco efetivo para o tratamento de CHC (IKEDA *et al.*, 2018). A doxorrubicina e a cisplatina já foram amplamente utilizados para o tratamento de CHC; entretanto, a alta toxicidade e o grande número de recidivas da doença impulsionou a busca por novas estratégias terapêuticas. Atualmente, o sorafenibe é o fármaco de escolha para esses pacientes. Este, é um inibidor de tirosina cinase de múltiplos alvos e exibe efeitos antiangiogênico e antiproliferativo. Tais efeitos prolongam a sobrevida média total em pacientes com CHC avançado (LIU *et al.*, 2018<sup>a</sup>), suprimindo a proliferação das células tumorais a partir da inibição da via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK (WILHELM *et al.*, 2008). Entretanto, grande parte dos pacientes adquire resistência ao medicamento em 6 a 10 meses de uso. Além disso, os efeitos adversos são acentuados, o que ocasiona a interrupção do tratamento (COLAGRANDE *et al.*, 2015; IKEDA *et al.*, 2018).

Dentro do contexto exposto, o presente trabalho buscou investigar o efeito antitumoral de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas em células de carcinoma hepatocelular uma vez que os compostos em estudo apresentam inibição de proteínas envolvidas no processo de carcinogênese do CHC (ALMEIDA *et al.*, 2018).

### **1.2.9 Glioblastoma: características gerais e bioquímicas**

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são formados pelo crescimento de células anormais nos tecidos localizados no cérebro e na medula espinal, sendo que a maior concentração de casos novos ocorre no cérebro (INCA, 2019). Apesar de ser um

tumor predominante em adulto (gliomas), podem ser encontrados em crianças (meduloblastoma e neuroblastoma) (STEWART; WILD, 2014).

Em termos de incidência, o câncer do sistema nervoso central ocupa a décima terceira posição em homens e a décima sexta posição entre as mulheres. Em 2018, foram estimados 162 mil casos novos em homens e 134 mil em mulheres. As maiores taxas de incidência de câncer do SNC estão nos países do Centro-Norte Europeu, em homens, e nos países do Sul da Europa e na América do Norte, em mulheres (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018). No Brasil, ocorreram, em 2017, 4.795 óbitos em homens, e 4.401 óbitos em mulheres (INCA, 2014). Essa doença é causada pelo somatório de alterações adquiridas ao longo do tempo por predisposição genética ou por exposição a agentes externos. Os fatores de risco conhecidos são a exposição à radiação ionizante, exposições ambientais (arsênio, chumbo e mercúrio), exposições ocupacionais (trabalhadores na indústria petroquímica, de borracha, plástico e gráfica) e obesidade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2019).

Tumores do SNC são denominados gliomas e podem ser caracterizados por sua alta capacidade de proliferação e poder invasivo, além de vascularização abundante (VELIZ *et al.*, 2015). Os gliomas são classificados de acordo com sua característica histopatológica: células de origem em astrocitoma (diferenciados de astrócitos), oligodendrogliomas (diferenciados de oligodendrócitos). Os gliomas difusos, sejam astrócitos ou oligodendrogliais, caracterizam-se pelo crescimento difuso e alto poder invasivo, formando agregados de células neoplásicas ao redor de neurônios e vasos sanguíneos (PERRY e WESSELING, 2016). Os astrocitomas difusos são classificados de acordo com sua malignidade como grau II (Astrocitoma difuso), grau III (Astrocitoma anaplásico) e, por fim, grau IV (Glioblastoma, GBM). Os tumores de grau I (Astrocitomas pilocíticos) são lesões com baixo potencial proliferativo e bordas delimitadas, sem potencial infiltrativo do parênquima adjacente, não sendo considerados como astrocitoma difuso (LOUIS *et al.*, 2016; VAN MEIR *et al.*, 2010).

Os astrocitomas difusos de grau IV recebem a denominação de glioblastoma, ou GBM. São os gliomas de maior malignidade, com incidência de aproximadamente 50% entre todos os astrocitomas, representando o tumor cerebral primário mais frequente em humanos (MORGAN *et al.*, 2015). Os GBMs possuem características moleculares que os tornam altamente proliferativos: desregulação do ponto de controle de ciclo celular na

fase G1/S, amplificação de genes como EGFR, Akt, e mutações em PTEN e *TP53* (LE *et al.*, 2019; SAMUELS *et al.*, 2011). Além disso, em GBMs há alta expressão de VEGF, fator pró angiogênico que favorece a formação de novos vasos no tecido tumoral (SZABO *et al.*, 2016), níveis elevados das enzimas COX-2 (QIU; SHI; JIANG, 2017) com extenso processo inflamatório (DECORDOVA *et al.*, 2020). Focos necróticos também são frequentes em GBMs podendo ser encontrado em grandes regiões necróticas na área central do tumor, gerando um ambiente de hipóxia com populações de células resistentes a apoptose (YEE *et al.*, 2020).

O esquema de tratamento padrão para gliomas inclui a temozolomida (TMZ) (LEE, 2016), um produto lipofílico de imidazotetrazina de segunda geração, que é um medicamento quimioterápico de primeira linha para glioblastoma recém-diagnosticado (Chua *et al.*, 2019); no entanto, os benefícios da TMZ são limitados pela quimiorresistência adquirida, o que representa um problema para a terapia do glioblastoma (CHEN *et al.*, 2018; JIAPAER *et al.*, 2018). A TMZ é um agente alquilante absorvido em pH fisiológico e transformado em seu metabólito ativo, 3-metil- (trazenil) imidazol-4-carboxamida (MTIC), que causa danos através da metilação do DNA com subsequente interrupção do ciclo celular (PLETSAS, 2013). Contudo, a maioria dos pacientes obtêm resistência contra este fármaco (MESSAOUDI. CLAVREUL. LAGARCE, 2015). Sua eficácia limitada é em partes devido aos altos níveis de atividade da enzima metilguanina-metiltransferase (MGMT) que repara danos ao DNA causados por metilação. Assim, são removidos os grupos -alquil (-CH<sub>3</sub>) da posição O6 da guanina no DNA, anteriormente danificados pela TMZ (PARK, *et al.*, 2012)

Nesse sentido, o presente trabalho buscou caracterizar o efeito antitumoral de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas em células de glioblastoma resistentes à TMZ, uma vez que os compostos em estudo apresentam inibição de proteínas envolvidas em diferentes vias de proliferação e morte celular (ALMEIDA *et al.*, 2018).

### **1.3 Imidazo[1,2-*a*]piridinas com ação antitumoral promissora**

A imidazopiridina é um anel 5-6 heterocíclico formado pela fusão do imidazol com a piridina, sendo amplamente estudado na química medicinal para tratamento de inúmeras doenças. Dentre os seus derivados, as imidazo[1,2-*a*]piridinas são as de maior importância na área farmacêutica (BAGDI *et al.*, 2015). Pesquisas recentes têm descrito

ações farmacológicas das imidazopiridinas como, por exemplo, bactericida (O'MALLEY *et al.*, 2018), anti-inflamatória (JIANG *et al.*, 2020), antiviral (PAPADAKIS *et al.*, 2020) e antitumoral (HE *et al.*, 2020; HIRAYAMA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020).

O efeito antitumoral das imidazopiridinas tem sido relacionado à citotoxicidade, atividades antiproliferativa e pró-apoptótica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Segundo Lawson e colaboradores (2016), o efeito antitumoral dos derivados de imidazo[1,2-*a*] piridinas podem estar associados à inibição de cinases. Essa conclusão está em acordo com o estudo de Lee e colaboradores (2012) no qual foi demonstrado que o derivado de imidazo[1,2-*a*] piridina HS173 causou a inibição da PI3K, inibindo a ativação da via Akt/mTOR. Essa inibição da sinalização de PI3K pelo composto HS173 resultou na inibição da proliferação celular e angiogênese, bem como na indução de apoptose em células hepáticas (HepG-2, Hep3B e Huh-7) e de mama (SkBr3, T47D e MCF-7). Almeida e colaboradores (2018) estudaram os efeitos antitumorais de duas moléculas imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas frente a células de câncer de mama (MCF-7). Após o tratamento de 72 horas com os compostos estudados, foi constatada alta toxicidade com importante redução da proliferação celular devido a parada do ciclo celular na fase G2 e inibição da fosforilação da Akt. Os autores também verificaram a ocorrência de morte celular por apoptose com aumento na expressão da proteína p53.

Aliwaini e colaboradores (2019) investigaram a atividade antitumoral de três diferentes moléculas de imidazo[1,2-*a*] piridina frente a linhagens celulares de melanoma A375 e WM115, e câncer cervical (HeLa). O estudo demonstrou que os compostos estimularam a via intrínseca de apoptose, aumentando os níveis de Bax e caspase-9 e diminuindo os níveis de Bcl-2, além de parada do ciclo celular em G2/M. O estudo de Harmse e colaboradores (2019) também explora o potencial antitumoral de novas imidazo[1,2-*a*] piridinas contendo complexos de cobre em sua estrutura em células de câncer colorretal (HT-29). Os autores demonstraram aumento expressivo no conteúdo de caspase-9 e perda significativa do potencial de membrana mitocondrial, além disso, foram observados diminuição de Bcl-2 e Bcl-xL e acúmulo de EROs intracelulares que conduziu as células tumorais à apoptose. Finalmente, Yu e colaboradores (2020) investigaram o efeito antitumoral de uma nova série de derivados de imidazo[1,2-*a*] piridinas em dois modelos de xenoenxerto com células HCT116 e HT-29 e obtiveram diminuição dos níveis de PI3K para ambas linhagens, o que acarretou segundo os autores, em diminuição do

crescimento tumoral e melhora na sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento com os novos compostos.

#### **1.4 Compostos organoselênio com ação antitumoral**

O selênio (Se) é um micronutriente essencial que pode apresentar-se tanto na forma orgânica quanto inorgânica, e possui funções relacionadas principalmente ao equilíbrio redox (PAPP *et al.*, 2007). Dentre os calcogênios, o Se tem se destacado por apresentar diversas atividades biológicas quando comparado com os diferentes elementos deste grupo (ALCOLEA *et al.*, 2016). Nesse sentido, Barbosa e colaboradores (2018) avaliaram o efeito antitumoral de novas selenoureas pirimidínicas frente a diferentes células tumorais. Os autores observaram em células de carcinoma de mama (MCF-7) que os compostos causaram danos ao DNA, parada do ciclo celular, efeito antiproliferativo e morte celular por apoptose, além de terem apresentado maior seletividade, quando comparados ao fármaco antitumoral 5-fluoruracil (5-FU).

Compostos de selênio são conhecidos por inibir a proliferação e induzir a morte de células tumorais (ALMEIDA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020 SUZUKI *et al.*, 2010). Tais eventos têm sido relacionados à interferência do selênio no balanço redox (WANG *et al.*, 2012) e apoptose mediada por geração de EROs (CHAKRABORTY *et al.*, 2016). Segundo Fan e colaboradores (2014), a geração de EROs induzida por esses compostos leva ao aumento de danos ao DNA, disfunção mitocondrial e desequilíbrio da expressão das proteínas da família Bcl-2, além da inativação de ERK e Akt em células HepG-2.

Guo e colaboradores (2017) demonstraram que o selênio induziu a apoptose em células HepG-2 através da sinalização para ativação de p53 e inibição da Akt via EROs. A geração de EROs por compostos de selênio em células tumorais resultam em inibição da autofagia, prejuízo na síntese de proteínas, danos ao DNA, conduzindo à parada do ciclo celular, inibição da proliferação e indução da apoptose (BAO *et al.*, 2015; BROZMANOVÁ *et al.*, 2010). Ainda, ensaios realizados com selenoureas heterocíclicas mostraram um potencial antiproliferativo frente a diferentes linhagens tumorais por inibir as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e XIAP e ativar as caspases 3 e 7 promovendo a indução da apoptose (ALCOLEA *et al.*, 2016).

Benassi e colaboradores (2020) avaliaram o efeito de novos selenoésteres derivados de diidropirimidinona em células HepG-2, e obtiveram como resultados a

parada do ciclo celular em G1, danos ao DNA com elevação do conteúdo de  $\gamma$ -H2AX o que induziu as células à apoptose devido ao aumento do conteúdo de Bax e p53. Posteriormente, o mesmo grupo investigou o efeito antiproliferativo *in silico* dos selenoésteres e novamente encontraram importante interação dos compostos com o DNA (BENASSI *et al.*, 2021).

O núcleo imidazo[1,2-*a*]piridina é frequentemente fusionado a diferentes núcleos com ações farmacológicas conhecidas. Entretanto, a fusão de imidazo[1,2-*a*]piridinas com o selênio é inovadora, tendo sido publicada pela primeira vez por Rafique e colaboradores (2016). A investigação do efeito antitumoral destes derivados é de extrema importância uma vez que os mesmos possuem ação antitumoral em diferentes linhagens de células tumorais com importante seletividade para essas células.

## 2. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença que resulta do acúmulo de mutações nas sequências de DNA que desregulam vias celulares críticas, levando ao aumento da sobrevivência e proliferação celular, resistência a morte celular bem como favorecendo a invasão e disseminação dessas células pelo organismo (PARK *et al.*, 2020). É considerado um dos principais problemas de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo ocidental, em parte devido ao envelhecimento e ao crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aqueles associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY *et al.*, 2018).

Dentre os tratamentos disponíveis, além da ressecção cirúrgica, a quimioterapia e radioterapia são modalidades terapêuticas essenciais. Também há o desenvolvimento de imunoterapias, que visam impulsionar e/ou utilizar o sistema imunológico, ou seus constituintes, como ferramenta para combater as células malignas, entretanto, é pouco provável que a imunoterapia, apesar de promissora, seja considerada tratamento universal devido ao custo elevado (HAYES, 2021).

As principais opções de tratamento para o CHC incluem ressecção hepática e transplante de fígado, a quimioterapia é considerada um procedimento de risco para esses pacientes pois o uso de compostos quimioterápicos é complicado pela condição cirrótica preexistente que pode perturbar o metabolismo de fármacos. Além disso, o CHC mostra-se resistente às quimioterapias mais comuns (LLOVET; HERNANDEZ-GEA, 2014). Segundo a PORTARIA Nº 602, publicada pelo Ministério da Saúde (2012) que aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Fígado no Adulto, é possível a utilização de esquemas terapêuticos com doxorubicina, cisplatina, 5- fluorouracila, interferon, epirubicina, capecitabina, gencitabina, oxaliplatina, bevacizumabe, erlotinibe, sunitinibe ou sorafenibe, como agentes únicos ou em associação, com aumento médio de sobrevida de seis a oito meses.

Dentre os diferentes tipos de gliomas, o GBM é considerado o tumor cerebral mais comumente diagnosticado em adultos. É recorrente em quase todos os pacientes e, possui um prognóstico ruim. O atual método terapêutico de primeira linha constitui: ressecção

máxima segura seguida de radioterapia combinada com quimioterapia com TMZ (PREUSSER *et al.*, 2015).

Nesse sentido, esforços são necessários para a busca de novos compostos com potencial terapêutico antitumoral. O grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio (UFSC–CFM) vem dedicando-se ao desenvolvimento de novos compostos de organoselênio como alternativa farmacológica para diferentes doenças. Dentre os novos compostos sintetizados, as imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas vem sendo investigadas pelo Laboratório de Bioquímica Experimental-LABIOEX (UFSC-CCB) devido ao seu potencial efeito antitumoral já demonstrado por Almeida e colaboradores (2018) em células MCF-7.

Dentro do contexto exposto, tendo em vista que o principal medicamento para o tratamento do CHC (sorafenibe) possui um anel piridina em sua estrutura e o principal medicamento para o tratamento de GBMs (TMZ) possui a estrutura de um imidazol quando metabolizada, e tendo em vista os resultados promissores obtidos por Almeida e colaboradores (2018) com as imidazo[1,2-*a*]piridina seleniladas, o presente trabalho buscou investigar os efeitos de dez derivados de imidazo[1,2-*a*]piridina selenidas frente a células de carcinoma hepatocelular e glioblastoma resistente a TMZ.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas (**IP-Se**) *in vitro*, *in vivo* e *in silico* investigando possíveis mecanismos moleculares de ação.

#### 3.2 Objetivos específicos

*In vitro*:

- Avaliar a citotoxicidade e potencial antiproliferativo de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas sobre células HepG-2 (hepatocarcinoma) e A172 (glioblastoma);
- Avaliar a indução do tipo de morte celular (apoptose ou necrose) ocasionada pelas imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas em células HepG-2 e A172;
- Avaliar o efeito das imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas sobre o ciclo celular em células HepG-2 e A172;
- Avaliar os níveis de proteínas envolvidas no dano ou o reparo do DNA, na parada do ciclo celular, nas vias de proliferação e na morte celular induzida pelas imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas;
- Investigar se o tratamento com imidazo[1,2-*a*]piridina selenilada selecionadas altera o conteúdo de proteínas envolvidas na sinalização de ativação no inflamassoma NLRP3;
- Determinar os níveis de EROs em células HepG-2 e A172 tratadas com imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas;
- Avaliar as possíveis alterações no conteúdo de defesas antioxidantes em células HepG-2 e A172 tratadas com imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas.

*In vivo*:

- Avaliar o efeito das imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas sobre o crescimento tumoral e a sobrevivência dos animais implantados com Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE);
- Avaliar a angiogênese de animais implantados com TAE e tratados com imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas;
- Avaliar o perfil glicêmico dos animais implantados com TAE após o tratamento com imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas selecionadas.

*In silico*

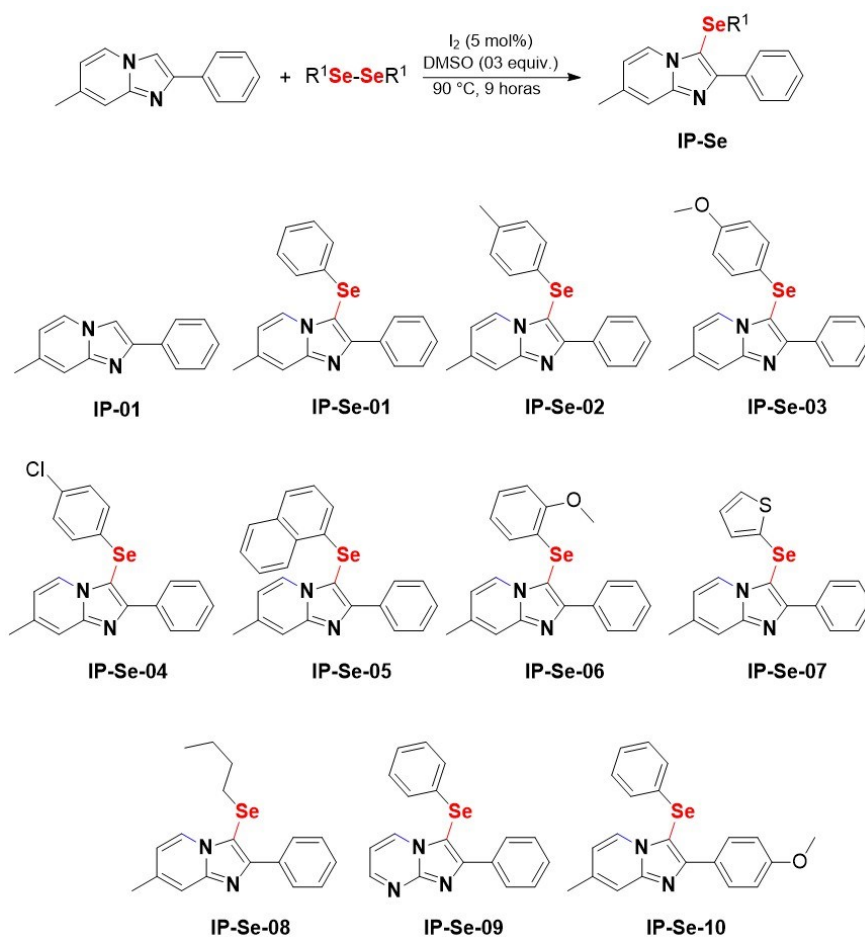
- Investigar os parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos dos compostos com resultados mais promissores.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Imidazopiridinas seleniladas

Para a síntese dos derivados, Rafique e colaboradores (2016) fusionaram o núcleo 7-metil-2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (molécula protótipo sem o selênio) com o difenil disseleneto, formando o núcleo 7-metil-2-fenil-3-(fenilselenil)-imidazo[1,2-*a*]piridina (molécula protótipo com o selênio) (Figura 13). Os onze derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas (dez deles selenilados) foram fornecidos pelo Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio, coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Luiz Braga, vinculado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Figura 13 - Derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas



Legenda: Derivados 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). Fonte: Rafique e colaboradores (2016).

## 4.2 Reagentes e anticorpos

O meio de cultura modificado de Eagle (DMEM) e meio de cultura modificado de Eagle com mix de nutrientes (DMEM F-12), o soro fetal bovino, a tripsina e os antibióticos utilizados na cultura de células foram adquiridos da Gibco (EUA). Os seguintes reagentes foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (EUA): agarose, 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT), *tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate* (TMRE), dimetil-sulfóxido (DMSO), 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB), albumina de soro bovino (BSA), coquetel inibidor de protease, catalase (CAT), glutationa redutase (GR), *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS), dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina fosfato reduzido (NADPH), doxorubicina, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), *tert-Butyl hydroperoxide* (t-BuOOH), *o*-ftaldialdeído (OPT), laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), beta mercaptoetanol, dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina fosfato reduzido (NADPH), *Hanks' balanced salt solution* (HBSS), paraformaldeído e Triton X-100. Os reagentes tetrametilrodamina etil éster (TMRE) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foram adquiridos da Thermo Fischer. O coquetel inibidor de fosfatase e o inibidor seletivo MAPK/ERK (U0126) foram adquiridos da Merck Bioscience. O kit quimioluminescente para detecção das bandas de proteínas (*horseradish peroxidase* – HRP) foi adquirido da Millipore (EUA). Os demais reagentes químicos foram usados com grau de pureza atendendo as normas da *American Chemical Society* (ACS).

Os anticorpos primários e secundários utilizados neste trabalho estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados nos ensaios de imunoeletroforese.

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Tipo</b>	<b>Referência</b>
Anti-Akt	<i>Mouse monoclonal</i>	Cell Signaling (Cat. # 2967)
Anti p-Akt (Ser 473)	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-7985)
Anti-Bcl-xL	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-8392)
Anti-β-Actina	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-47778)
Anti-p53	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-126)

Anti-Ciclina B1	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-752)
Anti-CDK2	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-163)
MAPcinase (ERK1/ERK2)	<i>Rabbit polyclonal</i>	Merck (Cat. M5670)
Anti-GLUT1	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-7903)
Anti-HIF-1 $\alpha$	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-10790)
Anti- $\gamma$ -H2AX	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-101696)
Anti-p38	<i>Rabbit polyclonal</i>	Cell Signaling (Cat. #9212)
Anti-p-p38	<i>Rabbit polyclonal</i>	Cell Signaling (Cat. # 9211)
Anti-NRLP3	<i>Rabbit monoclonal</i>	Cell Signaling (Cat. D4D8T)
Anti-Caspase 1	<i>Rabbit polyclonal</i>	Thermo Fischer Scientific (Cat. #PA5-87536)
Anti-NRF2	<i>Rabbit polyclonal</i>	Sigma-Aldrich (Cat. AV39465)
Anti-mTOR	<i>Mouse monoclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-517464)
Anti-Citocromo <i>c</i>	<i>Rabbit polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology (Cat. sc-7159)
<b>Anticorpos secundários</b>	<b>Tipo</b>	<b>Referência</b>
Anti-mouse IgG	<i>Goat monoclonal</i>	Sigma-Aldrich (Cat. AP181P)
Anti-rabbit IgG	<i>Goat polyclonal</i>	Sigma-Aldrich (Cat. AP132P)

### 4.3 Ensaios biológicos *in vitro*

#### 4.3.1 Cultura de células

As linhagens celulares HepG-2 (hepatocarcinoma humano) e McCoy (fibroblastos de *Mus musculus*) foram fornecidas pelo banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As linhagens celulares HT-22 (neurônio hipocampal) e A172

(glioblastoma humano) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil).

As linhagens de HepG-2 e McCoy foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Já as linhagens A172 e HT-22 foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12. Todas as linhagens foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) com 95% de umidade a 37 °C.

#### 4.3.2 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade ocasionada pelos compostos foi avaliada através do método que utiliza o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT). Células viáveis têm a capacidade de reduzir o sal de tetrazólio pela atividade de enzimas mitocondriais, produzindo derivados de formazan de cor púrpura, cuja intensidade é proporcional ao número de células viáveis da amostra (MOSMANN, 1983).

As células (1.10<sup>4</sup> células por poço) foram semeadas em placas *multiwell* de 96 poços e submetidas a incubação por 24 horas para aderência e confluência. Passado esse período, o meio de cultura foi substituído por outro meio contendo diferentes concentrações dos compostos em estudo (0, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM e 1000 µM), seguindo-se uma nova incubação de 72 horas. Para o controle negativo foi utilizado somente o meio de cultura (200 µL). Os diferentes tratamentos foram testados em triplicata, sendo três experimentos independentes. Passadas as 72 horas de incubação com os compostos e após a adição do MTT, foi realizada a leitura espectrofotométrica em leitor TECAN Infinity M200 a 540 nm, para determinar a intensidade da cor violeta e consequentemente a viabilidade celular.

A partir dos dados obtidos a CI<sub>50</sub> foi calculada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0 (San Diego, EUA) sendo os valores das absorbâncias das amostras comparados aos valores do controle negativo. O valor de CI<sub>50</sub> corresponde à concentração na qual o composto citotóxico é capaz de induzir a morte de 50% das células submetidas ao tratamento sendo calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \text{Abs}_{\text{teste}} \times 100 / \text{Abs}_{\text{Controle}}$$

O índice de seletividade (IS) foi calculado de acordo com Badisa e colaboradores (2009), onde a seletividade do composto foi mensurada através da seguinte fórmula:

$$\text{IS} = \text{CI}_{50} \text{ da linhagem normal} / \text{CI}_{50} \text{ da linhagem tumoral}$$

Sendo um composto considerado seletivo se  $\text{IS} > 2$

### 4.3.3 Ensaio Clonogênico

O efeito antiproliferativo dos compostos mais promissores foi avaliado pelo teste de formação de colônias de acordo com a metodologia proposta por Franken e colaboradores (2006), com modificações. As células HepG-2 foram semeadas (500 células por poço) em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas para aderência. Os compostos mais promissores selecionados a partir do ensaio de viabilidade celular foram **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas concentrações de 0,51  $\mu\text{M}$  e 0,02  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Após o tempo de tratamento, os poços foram lavados e as células foram cultivadas até a formação de colônias (10 dias). Transcorrido este tempo, o meio foi removido e cada poço foi lavado com PBS. Por fim, as células foram fixadas com uma solução de metanol (10%) e cada poço foi corado com cristal violeta (0,5%) durante 5 minutos. Os poços foram lavados com água destilada e as placas foram mantidas abertas para secarem à temperatura ambiente. A contagem das colônias foi realizada com o apoio do software ImageJ<sup>®</sup>.

Para células A172, o composto **IP-Se-06** foi utilizado para investigar o efeito antiproliferativo na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Além disso, para esse ensaio foi utilizado o U0126, um inibidor seletivo da proteína MEK1 e MEK2. Para esse ensaio, após a aderência das células por 24 horas na placa de 6 poços, estas foram expostas ao inibidor U0126 (10  $\mu\text{M}$ ) por 1 hora. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e expostas ao tratamento com o composto **IP-Se-06** por 72 horas. Após o tempo de tratamento, os poços foram lavados e cultivados até a formação de colônias (8 dias). Transcorrido este tempo, o meio foi removido e os poços lavados com PBS. As colônias foram fixadas, coradas e contadas como descrito anteriormente. O efeito anticlonogênico de **IP-Se-06** em células A172 tratadas ou não com U0126 também foi avaliado pela mensuração do corante.

#### **4.3.4 Dano ao DNA**

##### **4.3.4.1 Índice de fragmentação do DNA (Teste Cometa) em células HepG-2**

Os efeitos dos compostos sobre a fragmentação do DNA em células HepG-2 foram avaliados através do teste cometa proposto por Singh e colaboradores (1988). As células foram semeadas ( $0,5 \cdot 10^4$  por poço) em placa de 24 poços, incubadas por 24 horas para aderência e após esse período, foram tratadas com os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas concentrações de  $0,51 \mu\text{M}$  e  $0,02 \mu\text{M}$ , respectivamente. Após o tratamento de 72 horas, as amostras foram lavadas com  $500 \mu\text{L}$  de PBS, tripsinizadas por 3 minutos, centrifugadas ( $1500 \text{ g}$ , 10 minutos) e ressuspendidas em  $50 \mu\text{L}$  de PBS. Aliquotas foram diluídas e homogeneizadas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%) a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 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 ( $2,5 \text{ mM NaCl}$ ,  $100 \text{ mM EDTA}$ , 1% Triton X-100, 10% DMSO,  $10 \text{ mM TRIS}$ , pH 10) a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 dias. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese horizontal com tampão de corrida alcalino ( $\text{NaOH } 300 \text{ mM}$ ;  $\text{EDTA } 1 \text{ mM}$ , pH 13, a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a 25 V e 300 mA por 20 minutos, lavadas com tampão de neutralização ( $\text{TRIS-HCl } 0,4 \text{ M}$ ; pH 7,4) por 5 minutos, fixadas (15% TCA, 5%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 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 ( $0,001 \text{ g/mL AgNO}_3$ ) em agitação orbital por 40 minutos. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução de parada (0,01% ácido acético) por 5 minutos e depois lavadas 3x com água deionizada (NADIN *et al.*, 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).

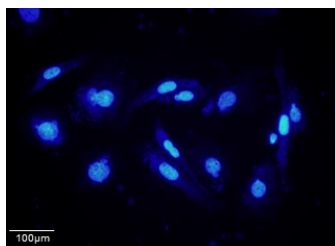
##### **4.3.4.2 Detecção de condensação da cromatina para células A172**

A detecção da condensação da cromatina em células A172 foi realizada conforme protocolo de Gosh e colaboradores (2013) com modificações, o qual permite diferenciar alterações morfológicas nucleares com a sonda fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI). Para tal procedimento, as células A172 foram semeadas ( $0,5 \cdot 10^4$  por poço) em placa de 24 poços, incubadas para aderência por 24 horas e após esse período, foram



tratadas com o composto **IP-Se-06** na concentração de 1  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, as células fixadas foram lavadas três vezes com PBS e coradas com DAPI (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluído em PBS a 37 °C durante 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e a morfologia nuclear foi fotografada utilizando microscópio de fluorescência (Olympus IX83) (Figura 14).

Figura 14 – Condensação da cromatina revelada pelo DAPI.



Legenda. Alterações morfológicas nucleares em células coradas com DAPI.

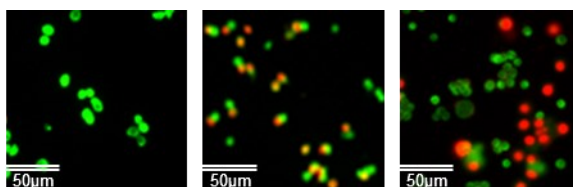
#### 4.3.5 Morte celular

Para a avaliação do tipo de morte celular ocasionado pelos compostos selenilados, foi utilizado o método de coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo (IP/LA), originalmente proposto por McGahon e colaboradores (1995), que permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, tendo como parâmetros alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas.

Células HepG-2 foram semeadas ( $2 \cdot 10^5$  por poço) em placas de 6 poços, incubadas para aderência por 24 horas e tratadas com os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas concentrações de 0,51  $\mu\text{M}$  e 0,02  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Ao término do tratamento, as células foram tripsinizadas por 3 minutos, centrifugadas (1500 g, 10 minutos) e ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Aliquotas das amostras foram transferidas para tubo *eppendorf* e adicionado 10  $\mu\text{L}$  da solução corante de iodeto de propídeo (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 10  $\mu\text{L}$  de solução de laranja de acridina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e, em seguida, após delicada homogeneização, 20  $\mu\text{L}$  da solução foi depositado em uma lâmina de microscopia coberta com lamínula para a leitura no microscópio de fluorescência Olympus BX41. Para cada amostra, 300 células foram contabilizadas e fotografadas na objetiva de 10x. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis, apoptóticas e

necróticas. Para células A172 foi utilizado o mesmo protocolo, alterando apenas a concentração de tratamento do composto **IP-Se-06** para 1  $\mu\text{M}$ .

Figura 15 - Células viáveis, apoptóticas e necróticas, respectivamente, após coloração com iodeto de propídio (IP) e laranja de acridina (AL).



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

#### 4.3.6 Ciclo celular

Para a análise dos efeitos dos compostos selenilados sobre o ciclo celular de células HepG-2 e A172, foi utilizado o *kit PI/RNase solution* (Immunostep), seguindo as instruções do fabricante. As células foram semeadas ( $2 \cdot 10^5$  por poço) em placas 6 poços e incubadas por 24 horas. Transcorrido esse período, os ciclos celulares foram sincronizados com nocodazol (30 ng/mL) por 14 horas e, posteriormente, as células foram tratadas com os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas concentrações de 0,51  $\mu\text{M}$  e 0,02  $\mu\text{M}$ , respectivamente, em células HepG-2. As células A172 foram tratadas com o composto **IP-Se-06** na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Após o tratamento, as células foram tripsinizadas por 3 minutos, centrifugadas (1500 g, 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 com 200  $\mu\text{L}$  de solução contendo iodeto de propídeo e RNase, e protegidas da luz por 15 minutos em temperatura ambiente. A fluorescência (correspondente a quantidade de DNA por núcleo) e o percentual de células em cada fase do ciclo celular foi mensurado no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences) e o conteúdo de DNA por núcleo/área dos picos gerados calculado pelo *Flowing Software 2.5* (NEIRA, 2003). Foram registrados ao menos 30 mil eventos por amostra.

#### 4.3.7 Avaliação do conteúdo de EROs intracelulares em células HepG-2

Para avaliar o efeito dos compostos na produção intracelular de EROs, foi utilizada a sonda fluorescente 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA)

que, ao ser internalizada pelas células e ter seus grupos acetato removidos, emite uma fluorescência verde ao reagir com compostos que possuem um elétron desemparelhado na última camada de valência (KALYANARAMAN *et al.*, 2012).

Células HepG-2 foram semeadas ( $1.10^6$  por poço) em placas de 6 poços, e após 24 horas de aderência, as células foram tratadas por 12 horas com os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas concentrações de 0,51  $\mu\text{M}$  e 0,02  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com HBSS e então incubadas com DCFH-DA na concentração de 1  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes com HBSS, e tripsinizadas por 3 minutos. O conteúdo dos poços foi transferido para tubos *ependorfs* e após centrifugação, este conteúdo foi transferido para tubos de citometria. A intensidade da fluorescência foi analisada em citometria de fluxo no canal FITC (FACSCanto II, BD, EUA), os picos gerados foram calculados utilizando o *Flowing Software 2.5*. Foram registrados ao menos 10.000 eventos por amostra.

#### **4.3.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) em células de A172**

O potencial de membrana mitocondrial foi medido utilizando a sonda fluorescente *tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate* (TMRE). O TMRE é um corante catiônico permeável que se acumula em mitocôndrias ativas, porém mitocôndrias despolarizadas são incapazes de reter o corante. Assim, a intensidade do sinal de fluorescência do corante pode ser usada como um marcador do potencial de membrana mitocondrial (COX *et al.*, 2008).

Para esse ensaio, células A172 foram semeadas em placas de 12 poços ( $4.10^5$  por poço). Após a confluência, as células foram tratadas com o composto **IP-Se-06** na concentração de 1  $\mu\text{M}$  durante o período de 6 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas com uma solução de HBSS contendo TMRE (1  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente as células foram lavadas com HBSS, e transferidas para placa de leitura fluorescente para medição da intensidade de fluorescência (excitação de 549 nm e emissão de 575 nm) utilizando o multileitor de placas (TECAN Infinity M200).

#### **4.3.9 Marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes**

Para a avaliação de marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes, células HepG-2 foram plaqueadas ( $4.10^5$  por poço) em placas de 12 poços. Após 24 horas,

as células foram tratadas com os compostos testados por 6 horas. Após o tempo de tratamento, os poços foram lavados duas vezes com PBS e as células ressuspensas em PBS/Triton 1%, centrifugadas a 5000 g por 5 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para as determinações das defesas antioxidantes e estresse oxidativo. O conteúdo total de proteínas das amostras foi quantificado pelo teste de Bradford utilizando BSA como padrão (BRADFORD, 1976). Para células HepG-2 foram testados os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas concentrações 0,51  $\mu\text{M}$  e 0,02  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para células A172, o composto **IP-Se-06** foi utilizado na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

#### **4.3.9.1 Avaliação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada seguindo o método proposto por Aebi (1984), o qual é baseado na velocidade ( $V_{\text{máx}}$ ) de degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio e quantificada na absorbância de 240 nm. Após a centrifugação, foram utilizados 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra e adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (10 mM) preparada com tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 em placa de 96 poços. Imediatamente, em leitor TECAN Infinity M200 foi realizada uma leitura cinética em 240 nm durante 5 minutos. Os valores foram expressos em  $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg proteína})^{-1}$ .

#### **4.3.9.2 Atividade da Tiorredoxina Redutase (TrxR)**

A atividade da TrxR foi medida acompanhando a oxidação do DTNB dependente de NADPH (ARNÉR *et al.*, 1998). As amostras foram adicionadas a uma solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; EDTA 10 mM; DTNB 5 mM e 0,2 mg/mL de BSA. A mistura foi incubada por 5 minutos para estabilizar a reação dos tióis livres com o DTNB presente no meio. Então, foi adicionado NADPH (0,2 mM) e a reação foi acompanhada à 412 nm por 5 minutos em leitor TECAN Infinity M200. A diferença na velocidade da reação antes e depois da adição do NADPH foi utilizada para expressar a atividade da TrxR ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ).

#### **4.3.9.3 Atividade da Glutathiona redutase (GR)**

A atividade da GR foi medida pela oxidação de NADPH na presença de GSSG (CARLBERG e MANNERVIK, 1985). Em placa de 96 poços foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de sobrenadante da amostra e 200  $\mu\text{L}$  de meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; 1 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. A reação catalisada pela GR foi iniciada

pela adição de 1 mM GSSG, consumindo NADPH ( $340 = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Em seguida, foi realizada uma leitura cinética a 340 nm durante 3 minutos (18 ciclos/20s) em leitor TECAN Infinity M200. Os valores da atividade da enzima GR foram expressos em  $\mu\text{mol} (\text{min} \cdot \text{mg proteína})^{-1}$ .

#### **4.3.9.4 Atividade da Glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi avaliada pelo método proposto por Flohé e Gunzler (1984). A GPx dismuta o tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) gerando uma ponte de dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GSSG), que por sua vez, retorna ao estado reduzido (GSH) pela ação da GR que oxida o NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx presente na amostra.

Em placa de 96 poços foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra, 200  $\mu\text{L}$  de meio de reação e 5  $\mu\text{L}$  de t-BuOOH. Em seguida, foi realizada uma leitura cinética a 340 nm durante 3 minutos (18 ciclos/20s) em leitor TECAN Infinity M200. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol} (\text{min} \cdot \text{mg proteína})^{-1}$ .

#### **4.3.9.5 Conteúdo total de GSH**

O conteúdo total de GSH foi determinado pelo método fluorimétrico proposto por Hissin e Hilf (1976), o qual utiliza o reagente fluorescente *o*-ftaldialdeído (OPT) que é capaz de ligar-se a grupos -SH livres, formando o complexo GS-OPT, que pode ser medido em excitação de 350 nm e emissão de 420 nm.

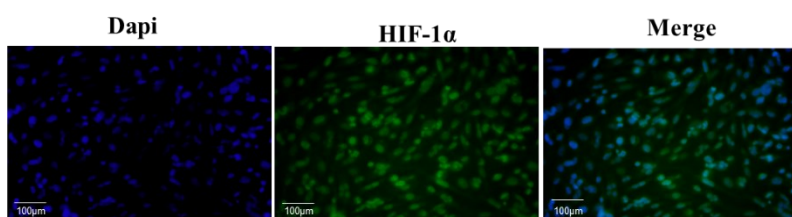
Para tal procedimento, foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, EDTA 0,005 M e TCA 2,5%. Em uma placa de coloração escura (preta) de 96 poços, foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante oriundo da centrifugação da amostra, 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0 e 50  $\mu\text{L}$  de OPT. Além disso, foi construída uma curva padrão de GSH para obtenção da equação da reta utilizada para o cálculo final. O conteúdo total de GSH foi expresso em  $\mu\text{M}$  de GSH/ $\mu\text{g}$  de proteína.

#### **4.3.10 Ensaio de imunocitoquímica para detecção da HIF-1 $\alpha$**

As células A172 foram semeadas ( $4 \cdot 10^5$  por poço) em placas de 12 poços, e após 24 horas de aderência, foram tratadas por 48 horas com o composto **IP-Se-06** na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Após o tempo de tratamento, as células foram gentilmente lavadas e fixadas com paraformaldeído (4%) por 15 minutos, e lavadas três vezes com PBS. Em

seguida, as células foram tratadas com solução de bloqueio (0,5% BSA em PBS contendo 0,3% de Triton X-100) por 1 hora a temperatura ambiente e incubadas com anticorpo HIF-1 $\alpha$  (diluição 1:500), permanecendo *overnight* a 4 °C. Transcorrido esse tempo, as células foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário IgG policlonal (diluição 1:1000) por 1 hora. Os núcleos das células foram corados com DAPI (3  $\mu$ g/mL). Por fim, as imagens das células foram adquiridas a partir de campos escolhidos aleatoriamente para cada condição utilizando um microscópio fluorescente Olympus IX83, conforme figura 16.

Figura 16 - Imunocitoquímica para localização de HIF-1 $\alpha$ .



Legenda. Coloração azul (marcação nuclear com DAPI), coloração verde (marcação de HIF-1 $\alpha$ ).

#### 4.3.11 Ensaios de imunoeletoforese

As células HepG-2 foram semeadas ( $4 \cdot 10^5$  por poço) em placas de 6 poços, incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) por 24 horas e tratadas com os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nas concentrações de 0,51  $\mu$ M e 0,02  $\mu$ M, respectivamente, por um período de 48 horas. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS, 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 1 mM, pH 7,4), suplementado com coquetel de inibidores de proteases (1%) e fosfatases (3%), durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram colhidas com auxílio de rastel e centrifugadas (10.000 g, 15 minutos). A dosagem de proteínas das amostras foi feita seguindo o método de Bradford (1976). 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 (25  $\mu$ g de proteínas) 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 transferência, 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 pelo fabricante. 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, a membrana foi novamente lavada, incubada com a solução reveladora do *kit* quimioluminescente Westar Nova® 2.0 (Bologna, Itália) e por fim inserida no fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

As células A172 foram semeadas ( $4 \cdot 10^5$  por poço) em placas de 6 poços, incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) por 24 horas e tratadas com o composto e **IP-Se-06** na concentração de 1 µM por um período de 48 horas. Após o tempo de tratamento as células foram lavadas com PBS gelado e lisadas utilizando tampão de lise (Tris-HCl 500 mM, 10% de dodecil sulfato de sódio, ácido etilenodiamina tetracético 100 mM, pH 6,8) com auxílio de um rastel. Posteriormente, foi utilizado o tampão Laemmli (Tris-HCl 60 mM, 10% de glicerol, 5% de β-mercaptoetanol, 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8) para desnaturação de proteínas. As amostras foram fervidas por 10 min e as proteínas totais dos lisados foram quantificadas de acordo com Lowry (1951). Após esse processo, a eletroferese e todas as etapas seguintes foram realizadas como descrito acima para células HepG-2.

#### **4.4 Ensaios biológicos *in vivo***

##### **4.4.1 Animais**

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* dos compostos estudados *in vitro*, foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos ( $20 \pm 2$  g), com idade de aproximadamente 60 dias, obtidos da reprodução e manejo controlados no biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Os animais foram divididos em grupos de 10 e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura

de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e aproximadamente 60% de umidade do ar). Os animais receberam ração comercial e água *ad libitum*. Este projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), desta universidade, o qual foi aprovado sob o número PP00784. Ainda, este estudo foi realizado de acordo com as recomendações das diretrizes *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) para o cuidado e uso de animais de laboratório.

#### **4.4.2 Modelo do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) – Protocolo Experimental**

As células do carcinoma de Ehrlich são mantidas no LABIOEX em camundongos submetidos a um transplante sistemático. Estas células foram obtidas junto à Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil). O composto **IP-Se-06** foi testado pela primeira vez *in vivo* neste estudo, por isso fez-se necessária a adequação das concentrações do mesmo. Para isso, foram utilizadas três diferentes concentrações: 1 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg do composto **IP-Se-06**. Células ( $5.10^6$ ) de TAE que foram inoculadas no abdome dos animais para induzir o desenvolvimento do tumor. O dia da inoculação foi considerado dia zero. Após a adequação e definição da melhor concentração a ser usada para as análises, os animais foram divididos em três grupos (n=18):

- a) Grupo controle negativo: tratado veículo (solução salina)
- b) Grupo controle positivo: tratado com doxorrubicina (1 mg/kg)
- c) Grupo tratado com **IP-Se-06** (1 mg/kg ou 5 mg/kg ou 10 mg/kg)

As soluções de tratamento foram preparadas diariamente, e os tratamentos iniciados 24 horas após a inoculação das células do TAE e realizados por via intraperitoneal (i.p). Os tratamentos foram realizados durante 9 dias consecutivos. No décimo dia, seis animais de cada grupo foram submetidos à análise de inibição do crescimento tumoral, angiogênese e glicemia. O restante dos animais foi mantido para a análise de sobrevida conforme proposto por Kaplan e Meier (1958).

#### **4.4.3 Inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevida dos animais**

A inibição do crescimento do tumor foi avaliada levando em consideração a medida da circunferência abdominal, conforme proposto por Kwiecinski e colaboradores (2008). A variação destas medidas foi calculada por subtração dos valores de circunferência (cm) medidos no primeiro e último dia de tratamento. O percentual de



inibição do crescimento do tumor (% ICT) foi determinado a partir da seguinte equação (KVIECINSKI *et al.*, 2011):

$$\text{ICT (\%)} = (\text{variação média da circunferência abdominal do grupo teste} \times 100 / \text{medida média do grupo controle negativo}) - 100$$

#### **4.4.4 Avaliação do efeito antiangiogênico**

Para a avaliação do efeito antiangiogênico do tratamento com **IP-Se-06**, foi realizado a contagem e classificação dos vasos sanguíneos na região subcutânea do peritônio dos animais. Os vasos foram classificados em tipo 1 (vaso mais longo), tipo 2 (vasos secundários derivados do vaso mais longo) e tipo 3 (vasos terciários derivados de vasos secundários) e contados com auxílio do software ImageJ conforme metodologia descrita por Hajra e colaboradores (2018), com modificações.

#### **4.4.5 Avaliação do perfil glicêmico**

Para investigação dos níveis plasmáticos de glicose, foi utilizado o kit de glicose da Labtest®. Para tal procedimento, foram retiradas alíquotas de sangue da veia caudal dos animais e o processo de dosagem de glicemia foi realizado conforme protocolo sugerido pelo fabricante, onde a intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose da amostra.

#### **4.4.6 Análise estatística**

Os resultados foram expressos em termo de Média  $\pm$  Desvio Padrão. Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) *one-way* para células HepG-2 e *two-way* para células A172 e complementado pelo teste post-hoc Tukey-Kramer, utilizando o software *Graphpad Prism* 8.0 (San Diego, EUA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **4.5 Ensaios *in silico***

Para a predição dos parâmetros físico-químicos e perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade do composto que obtiveram os melhores resultados nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, primeiramente foram gerados SMILES (*Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) utilizando o programa Marvin Stech version 17.15

e então foram submetidos a plataformas de bioinformática de livre acesso SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017), ADMETlab (DONG *et al.*, 2018) e ADMETLab 2.0 (XIONG *et al.*, 2021), para obtenção dos valores e scores referentes a propriedades físico químicas, farmacocinéticas, semelhanças estruturais a fármacos pré-existentes, toxicidade, dentre outros parâmetros do composto estudado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Parte I – Efeitos das imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas em células HepG-2

#### 5.1.1 Citotoxicidade e seletividade das imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas

Na tentativa de identificar compostos promissores para o tratamento do carcinoma hepatocelular, o presente trabalho investigou o efeito citotóxico de dez derivados de imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas. A seleção dos compostos mais citotóxicos foi realizada por meio do ensaio do MTT, calculando-se a  $CI_{50}$  para as linhagens celulares HepG-2 e McCoy. O composto **IP-01** (molécula protótipo que não contém selênio na sua estrutura) obteve  $CI_{50}$  de 83,50  $\mu$ M, enquanto os derivados de imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas mostraram resposta citotóxica diversas, variando a  $CI_{50}$  de 0,03  $\mu$ M até >100  $\mu$ M, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Citotoxicidade das imidazo[1,2-*a*] piridinas e índice de seletividade após o tratamento por 72 horas.

Compostos	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)		Índice de Seletividade (IS)
	HepG-2	McCoy	
<b>IP-01</b>	83,5	>100	>1,2
<b>IP-Se-01</b>	>100	>100	>1,0
<b>IP-Se-02</b>	87,7	74,0	0,8
<b>IP-Se-03</b>	80,6	2,0	0,3
<b>IP-Se-04</b>	56,8	>100	>1,8
<b>IP-Se-05</b>	0,85	26,8	31,5
<b>IP-Se-06</b>	0,03	12,0	400,0
<b>IP-Se-07</b>	38,9	34,9	0,9
<b>IP-Se-08</b>	22,0	83,9	3,8
<b>IP-Se-09</b>	28,0	35,7	1,3
<b>IP-Se-10</b>	38,5	46,5	1,2

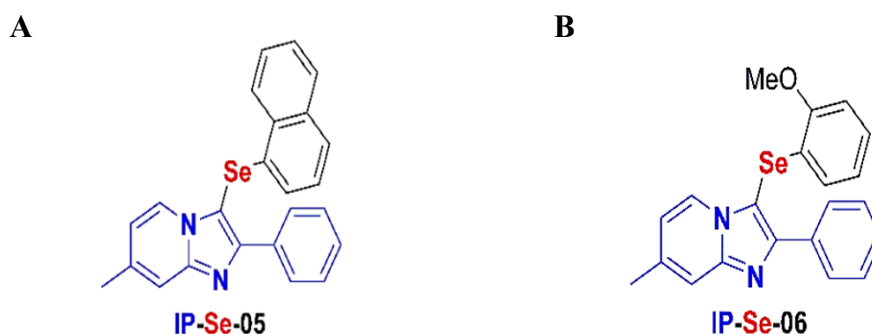
<b>Doxorrubicina</b>	0,12	0,19	1,6
----------------------	------	------	-----

Legenda. Os compostos foram testados na linhagem tumoral HepG-2 e em células não tumorais (McCoy) nas concentrações de 0,1 a 1000  $\mu\text{M}$  durante 72 horas. IS representa o valor  $\text{CI}_{50}$  da linhagem celular normal/ $\text{CI}_{50}$  da linhagem celular tumoral. Os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes ( $n=3$ ) e a  $\text{CI}_{50}$  calculada com auxílio do *software* GraphPad Prisma versão 8.0.

Ao analisar a tabela 2, é possível observar que os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** causaram maior efeito citotóxico apresentando os menores valores de  $\text{CI}_{50}$  (0,85  $\mu\text{M}$  e 0,03  $\mu\text{M}$ , respectivamente), para a linhagem tumoral HepG-2. Além disso, os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** também demonstraram maior seletividade quando comparados com o tratamento na linhagem celular não tumoral.

Os diferentes grupamentos químicos podem ter contribuído para o efeito citotóxico dos compostos em estudo. A presença do radical (2-metoxifenil) selenil na posição C-3 da imidazo[1,2-*a*]piridina no composto **IP-Se-06** (Figura 17) causou um aumento significativo na citotoxicidade e seletividade, levando a uma diminuição na viabilidade das células HepG-2 mesmo quando comparada ao quimioterápico padrão doxorrubicina. O composto **IP-Se-05** por sua vez, apresenta o grupamento naftaleno em sua estrutura, tornando-o mais lipofílico quando comparado ao composto **IP-Se-06**. Segundo Badisa e colaboradores (2009), a seletividade de um composto pode ser mensurada através do índice de seletividade ( $\text{IS} = \text{CI}_{50}$  obtido para a linhagem não tumoral/  $\text{CI}_{50}$  obtido para a linhagem tumoral), sendo um composto considerado seletivo se o IS for maior que 2 (dois). Dessa forma, optou-se por dar continuidade aos estudos com os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, que além de apresentarem os menores valores para  $\text{CI}_{50}$ , apresentaram o maior índice de seletividade (31,5 e 400,0 respectivamente) para a célula tumoral em estudo.

Figura 17 – Estrutura química dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**.



Legenda. Estrutura química dos compostos mais promissores. (A) Estrutura do composto **IP-Se-05** ((7-metil-3-(naftaleno-1-selenil)-2-fenilimidazo [1,2-*a*] piridina). (B) Estrutura do composto **IP-Se-06** (3-(2-metoxifenil)selenil)-7-metil-2-fenilimidazo [1,2-*a*] piridina.

O CHC configura entre as principais causas de morte por câncer no mundo. Uma das razões da alta taxa de mortalidade é que até o momento não há uma terapia completamente efetiva para esse tipo de tumor (ALTEKRUSE *et al.*, 2014; BAHARUDIN *et al.*, 2020). A imidazopiridina é um anel 5-6 heterocíclico formado pela fusão do imidazol com a piridina, sendo amplamente investigado na química medicinal (HE *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020; O'MALLEY *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020). Dentre os seus derivados, as imidazo[1,2-*a*] piridinas são as de maior importância na área farmacêutica (BAGDI *et al.*, 2015), sendo amplamente investigadas para o tratamento de inúmeras doenças, dentre elas o câncer.

A atividade citotóxica de derivados de imidazopiridinas em linhagens tumorais está bastante evidenciada em estudos recentes (GUÇLU *et al.*, 2018; SUNKARI *et al.*, 2019). Basu e colaboradores (2017) avaliaram o efeito antitumoral de imidazopiridinas com núcleo tiazol/tiofeno em células de câncer de pulmão humano (A549), células de carcinoma cervical humano (HeLa) e células de glioma humano (U-87) e demonstraram citotoxicidade para todas as linhagens tumorais avaliadas, indicando que essa classe de compostos é capaz de atuar em diferentes linhagens tumorais.

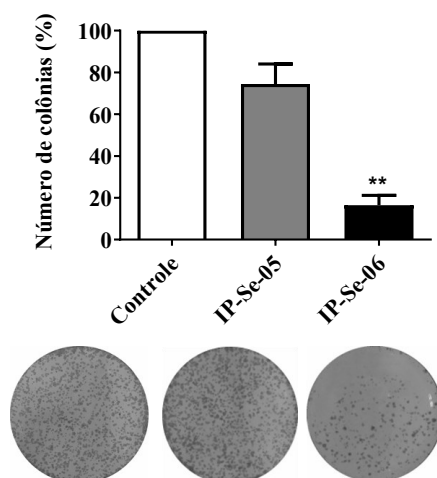
Ainda, sabe-se que compostos contendo selênio podem ser promissores agentes antitumoral. No estudo de Barbosa e colaboradores (2018) foram testados compostos inéditos derivados de diidropirimidinonas contendo selênio em suas estruturas frente as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa e, os autores relataram importante efeito citotóxico na linhagem MCF-7 com valores de  $CI_{50}$  entre 3,9  $\mu$ M e 59,1  $\mu$ M. Almeida e colaboradores (2018) investigaram o efeito citotóxico das imidazopiridinas seleniladas em células MCF-7, HeLa e HRT-18 (câncer colorretal) e obtiveram valores de  $CI_{50}$  que variaram de 12,5  $\mu$ M até > 100  $\mu$ M.

Sendo assim, a partir dos efeitos citotóxicos e seletivos promissores para células HepG-2 (Tabela 2), este estudo buscou investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, nesta linhagem celular.

### 5.1.2 Atividade anticlonogênica e tipo de morte celular induzida em células HepG-2

Com base no resultado obtido através do ensaio de MTT, foi investigado o efeito antiproliferativo dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** por meio do ensaio de formação de colônias. Também foi analisado o tipo de morte celular induzido em células HepG-2, assim como proteínas envolvidas em sua sinalização (Figura 18 e 19).

Figura 18 - Efeito de imidazo [1,2-*a*]piridinas seleniladas (**IP-Se-05** e **IP-Se-06**) sobre a proliferação celular em células HepG-2.



Legenda. Porcentagem de colônias formadas em células não tratadas (controle) e tratadas com os compostos **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M) durante 72 horas. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,01$ .

Conforme apresentado na figura 18, ao analisar as células tratadas com as imidazopiridinas seleniladas em estudo, foi observado um importante efeito antiproliferativo para as células HepG-2 quando tratadas com o composto **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M), diferindo significativamente da amostra do controle ( $p < 0,01$ ). Embora seja possível visualizar diminuição, o composto **IP-Se-05** não obteve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de colônias quando comparado com o controle.

De forma geral, pesquisas conduzidas com derivados de imidazopiridinas apresentam efeito antiproliferativo *in vitro* em linhagens tumorais. O estudo conduzido por Muniyan e colaboradores (2014) avaliou o efeito antiproliferativo de três novos derivados de imidazopiridinas em células LNCaP C-81 (carcinoma de próstata humano)

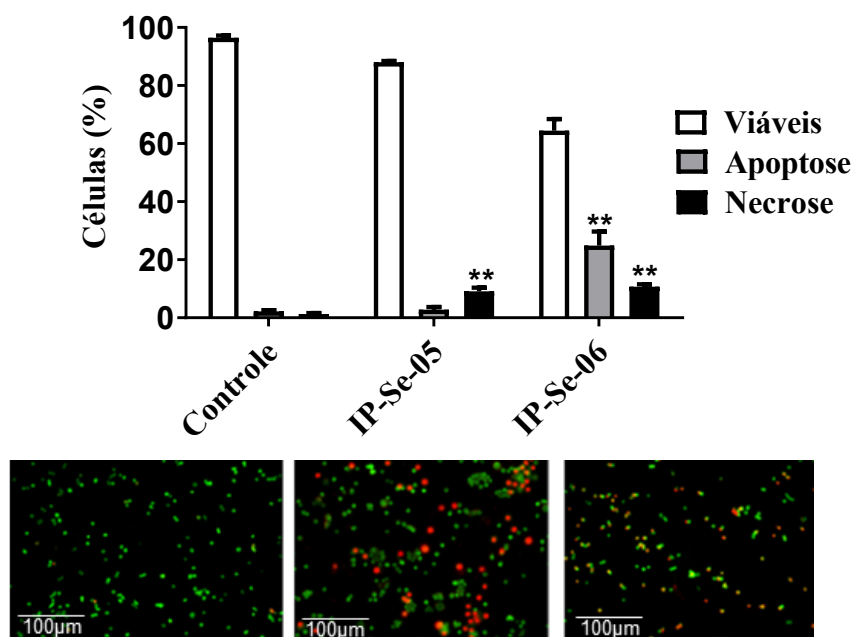
e obtiveram inibição da proliferação celular mediante redução da sinalização da via PI3K/Akt. Já estudo realizado por Sayeed e colaboradores (2017) avaliou o efeito dos derivados de imidazopiridina-propenona sobre a proliferação de quatro linhas celulares de câncer humano: próstata (DU-145), pulmão (A549), cervical (HeLa) e mama (MCF-7), sendo a inibição da proliferação mais pronunciada em células A549.

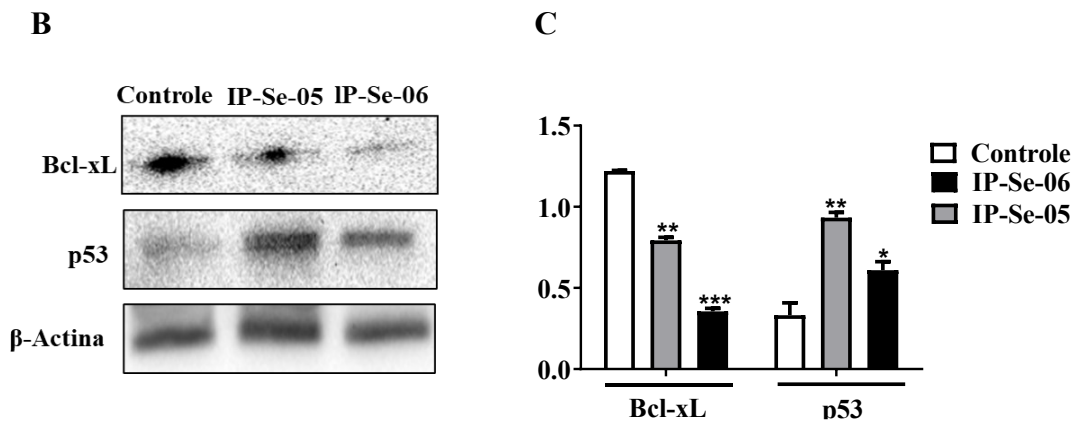
A adição do selênio na estrutura de imidazo[1,2-*a*] piridinas em estudo também pode ter contribuído para o efeito antiproliferativo produzido pelos compostos, especialmente pelo **IP-Se-06**. Barbosa e colaboradores (2018) ao introduzirem o selênio em novas selenoureas observaram uma significativa ação antiproliferativa desses compostos em células MCF-7. Benassi e colaboradores (2020) também demonstraram importante efeito citotóxico em células HepG-2 submetidas a novos selenoésteres derivados de diidropirimidinonas.

Tendo em vista os resultados relativos à citotoxicidade e a inibição da proliferação celular em células HepG-2, foi investigado o tipo de morte celular induzido pelos compostos selenilados, assim como os níveis de proteínas envolvidas na sinalização para a morte celular (Figura 19).

Figura 19 - Tipo de morte induzida em células HepG-2 pelas imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas (**IP-Se-05** e **IP-Se-06**) e conteúdo de proteínas envolvidas na sinalização para a morte celular.

A





Legenda. As células HepG-2 foram expostas aos compostos **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M). (A) Porcentagem do número de células viáveis, apoptóticas e necróticas em células expostas aos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**, após o tratamento de 72 horas. (B) Conteúdo de p53 e Bcl-xL após o tratamento com **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em relação ao controle após o tratamento de 48 horas. (C) O gráfico em barras demonstra os níveis relativos de proteína por análise em *Western blotting*. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. Os dados foram normalizados com o nível de  $\beta$ -actina. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

As células tratadas com **IP-Se-05** apresentaram maior número de células necróticas quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,01$ ), por outro lado não houve diferença estatística na quantidade de células apoptóticas. Ainda, o **IP-Se-05** diminuiu o conteúdo de Bcl-xL ( $p < 0,01$ ) e aumentou os níveis de p53 ( $p < 0,01$ ). Para o tratamento com o **IP-Se-06** foi observado um maior número de células necróticas ( $p < 0,01$ ) e apoptóticas ( $p < 0,01$ ) quando comparadas ao controle, assim como também o tratamento como o composto diminuiu o conteúdo de Bcl-xL ( $p < 0,01$ ) e elevou o conteúdo de p53 ( $p < 0,05$ ). Portanto, tais efeitos, com exceção do conteúdo da proteína p53, parecem ser mais acentuados para o tratamento com **IP-Se-06**.

A ativação de vias de sinalização para a morte celular é um dos principais mecanismos investigados para o desenvolvimento de novos compostos com potencial terapêutico para o tratamento do câncer (YUE *et al.*, 2017). Os mecanismos que levam a ativação de morte celular por apoptose têm sido amplamente investigados, sendo bem elucidados duas principais vias de ativação de apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca (BARAKAT *et al.*, 2019). De forma geral, a via extrínseca é iniciada, principalmente, pela ativação de receptores de morte na membrana celular, que ao serem ativados interagem com o domínio de morte FADD<sup>++</sup>, recrutando as caspases 8 e 10. Estas ativam as caspases-3, 6 e 7 executando a morte celular por apoptose (PETER, 2011). Em contrapartida, a via intrínseca da apoptose envolve a permeabilização da membrana



mitocondrial externa e é controlada por proteínas pró-apoptóticas como Bax, Bak, Bad e Bid, e anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL que atuam na promoção e inibição da porosidade da membrana mitocondrial, favorecendo ou inibindo a liberação do citocromo *c* para o citosol (BORNER, 2003). De acordo com os resultados obtidos, é possível supor que as imidazopiridinas seleniladas em estudo, especialmente o composto **IP-Se-06**, tenham atuado para a ativação da via intrínseca de apoptose, uma vez que houve aumento do número de células apoptóticas e diminuição do conteúdo da proteína Bcl-xL.

A proteína p53 desempenha importante papel na ativação de morte celular, pois é capaz de regular a expressão de genes da família Bcl-2 (MUKHTAR *et al.*, 2012). Ainda, é responsável por manter a integridade da molécula do DNA, evitando a divisão de células que carregam versões mutadas do genoma. Sob estresse, hipóxia ou dano ao DNA, a p53 é translocada do citoplasma para o núcleo, onde ativa genes necessários para a parada do ciclo celular, como por exemplo a proteína p21, que atua inibindo CDKs e conduzindo a parada do ciclo celular na fase G1 para o reparo do dano. Se o dano ao DNA for severo, a p53 induz a expressão de proteínas pró-apoptóticas, desencadeando morte celular por apoptose (WADE *et al.*, 2010). Os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** aumentaram os níveis de p53, que por sua vez pode ter modulado os níveis de Bcl-xL, ocasionando a morte celular por apoptose, conforme apresentado na figura 19 B.

A modulação de p53 ocasionada por derivados de imidazopiridinas torna-se uma característica promissora para o tratamento de CHC, uma vez que mutações em p53 são consideradas assinaturas genéticas no desenvolvimento desse tipo de câncer (REBOUISSOU e NAULT, 2020; SCHULZE *et al.*, 2015). Almeida e colaboradores (2018) avaliaram o efeito antitumoral dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** em células MCF-7 e obtiveram resultados semelhantes aos achados neste estudo, sugerindo que os compostos possuem importante ativação de morte celular via p53 para diferentes linhagens tumorais. Rudolf e colaboradores (2008) demonstraram que os compostos contendo selênio em suas estruturas ativam a proteína p53 e induzem a morte celular independente da expressão de caspases em células neoplásicas. Segundo dados da literatura, p53 regula a expressão de diferentes membros das proteínas da família Bcl-2, podendo desencadear ativação de apoptose por via intrínseca (DASHZEVEG e YOSHIDA, 2015). A regulação positiva de p53 pode levar à inibição de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-xL e diminuição do sinal de sobrevivência, como as proteínas da

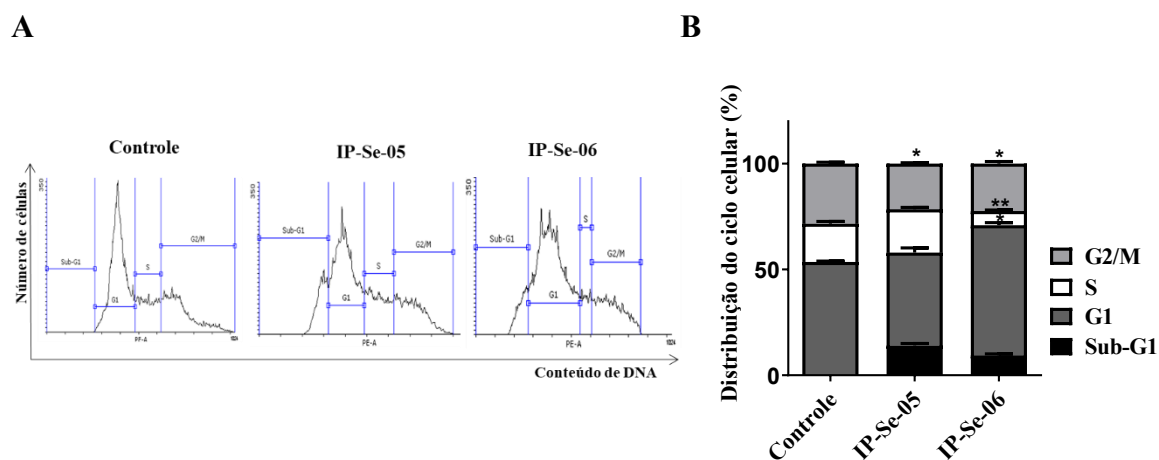
via PI3K/Akt/mTOR (HAUPT *et al.*, 2003). O estudo de Liu e colaboradores (2019) sugeriu que a ativação de p53 conduziu à regulação positiva de Bax e à regulação negativa de Bcl-2, esse desequilíbrio entre Bax/Bcl-2 ocasionou disfunção mitocondrial, a qual induziu a via mitocondrial de apoptose em células HepG-2.

Diferentes estudos demonstram que morte celular por apoptose é o principal mecanismo de ação antitumoral de compostos contendo selênio (FAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016). Segundo Chen e colaboradores (2020), essa característica deve-se a capacidade de compostos de selênio em ativar proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bim. Bidkar e Gosh (2017) avaliaram os efeitos de nanopartículas contendo selênio e o antitumoral paclitaxel e os autores observaram aumento de morte celular por apoptose através de disfunção mitocondrial em células tumorais de pulmão (A549), mama (MCF-7), cervical (HeLa) e cólon (HT29) promovendo o aumento de Bax e a diminuição de Bcl-xL. Benassi e colaboradores (2020) também demonstrou aumento de Bax e p53 em células HepG-2 tratadas com derivados de selenoésteres. Finalmente, Wu e colaboradores (2019) investigaram o efeito antitumoral de selenito de sódio em associação com doxorubicina em um modelo *in vivo* de câncer gástrico e demonstraram indução de morte celular por apoptose via disfunção mitocondrial.

### **5.1.3 Efeito dos compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 sobre o ciclo celular**

A exposição das células HepG-2 aos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** ocasionou morte celular por apoptose com importante aumento do conteúdo da proteína p53. Como descrito anteriormente, essa proteína atua diretamente na progressão do ciclo celular, podendo levar a parada do ciclo através de p21, que inibe CDKs conduzindo a parada do ciclo na fase G1, assim como é capaz de reverter seu bloqueio permitindo sua progressão para a fase S. Sendo assim, foi investigado o efeito dos compostos **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M) na progressão do ciclo celular, por meio de citometria de fluxo, sendo os resultados apresentados na figura 20.

Figura 20 - **IP-Se-05** e **IP-Se-06** modificaram a progressão do ciclo celular e a proliferação de células HepG-2.



Legenda. As células HepG-2 foram tratadas com **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M) durante 72 horas. (A) Alterações no conteúdo de DNA das células no ciclo celular. (B) Porcentagem de distribuição de células em diferentes fases do ciclo celular. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*) e (\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

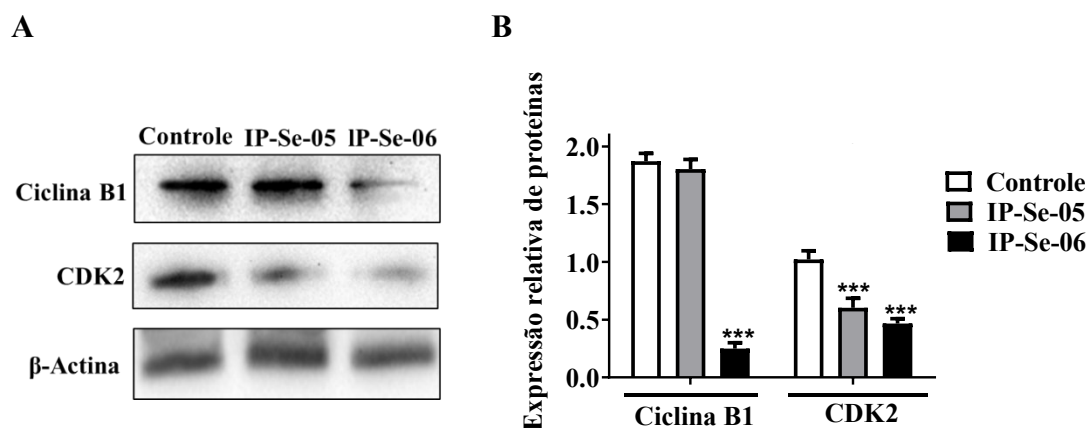
Conforme apresentado na figura 20, o composto **IP-Se-05** diminuiu a quantidade de células na fase G2/M ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle; entretanto não alterou de forma estatisticamente significativa o conteúdo de células nas outras fases do ciclo celular. Todavia, o composto **IP-Se-06** levou a parada do ciclo celular na fase G1 ( $p < 0,05$ ). Também é possível observar importante diminuição de células na fase S ( $p < 0,01$ ), assim como na fase G2/M ( $p < 0,05$ ).

O composto **IP-Se-06** alterou o conteúdo de células em todas as fases do ciclo celular, ocasionando parada em G1. A fase G1 é caracterizada por receber estímulos de vias de sinalização de proliferação celular para a progressão do ciclo (MALUMBRES e BARRACID, 2009). A parada nessa fase ocasionada pelo composto **IP-Se-06** pode indicar possível atuação da p53, uma vez que houve elevação do conteúdo dessa proteína, e esta por sua vez pode ocasionar a parada do ciclo em G1 em caso de dano ao DNA. Ainda, a parada em G1 ocasionada pelo composto **IP-Se-06** contribuiu de forma significativa para a diminuição do conteúdo de células nas fase S, onde ocorre a replicação do DNA, e diminuição do número de células em G2/M. Por outro lado, embora o composto **IP-Se-05** também tenha elevado os níveis de p53, não houve alteração significativa na fase G1 do ciclo. A única alteração ocasionada por esse composto foi a diminuição de células na fase G2/M.

Compostos derivados de imidazopiridinas parecem atuar diretamente no ciclo celular. Sayeed e colaboradores (2017) verificaram que imidazopiridinas conjugadas com triazol foram capazes de inibir a progressão do ciclo celular em G2/M, em células tumorais de próstata (DU-145), pulmão (A549) e câncer de mama (MCF-7). Aliwaini e colaboradores (2019) avaliaram o efeito antitumoral de imidazo[1,2-*a*] piridinas em células de melanoma (A375 e WM 115) e câncer cervical (HeLa), e os resultados indicaram parada do ciclo celular em G2/M com diminuição dos níveis de ciclina B1.

Sabe-se que o ciclo celular é regulado pelas ciclinas e as CDKs (BEHL e ZIEGLER, 2014). Como os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** alteraram o número de células nas diferentes fases do ciclo: S e G2/M, foram investigados os níveis de ciclina B1 e CDK2 em células HepG-2 (Figura 21).

Figura 21 - Efeito dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** nos níveis de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular em células HepG-2.



Legenda. (A) Conteúdo de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, ciclina B1 e CDK2, após exposição aos compostos **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M) após o tratamento de 48 horas. (B) Os diagramas em barras demonstram os níveis relativos das proteínas por análise em *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,001$ .

Foi observada significativa diminuição no conteúdo de ciclina B1 nas células expostas ao composto **IP-Se-06** ( $p < 0,001$ ), diferentemente do composto **IP-Se-05** que não alterou o conteúdo dessa proteína. Ainda, os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** ocasionaram diminuição significativa do conteúdo de CDK2 ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle.

A associação CDK2/ciclina B1 configura como uns dos principais reguladores do ciclo celular durante a progressão da fase G2 para a fase M (SHAO *et al.*, 2017; YU *et*

*al.*, 2018). Possivelmente a diminuição do conteúdo da ciclina B1 ocasionado pelo composto **IP-Se-06** contribuiu para a diminuição de células nesta fase do ciclo celular. Todavia, o composto **IP-Se-05**, embora tenha apresentado redução de células em G2/M, não alterou os níveis da ciclina B1 de forma significativa quando comparado ao controle, o que pode indicar que esse composto não seja capaz de interagir com a ciclina B1 e sim com outras proteínas reguladoras dessa fase do ciclo celular. Por outro lado, ambos os compostos foram capazes de diminuir os níveis de CDK2, proteína que está envolvida na progressão da fase S, na qual ocorre a replicação do DNA (COPELAND *et al.*, 2010). Portanto, é possível sugerir que a diminuição do número de células na fase S ocasionada pelo tratamento com o composto **IP-Se-06** esteja relacionado com a diminuição de CDK2.

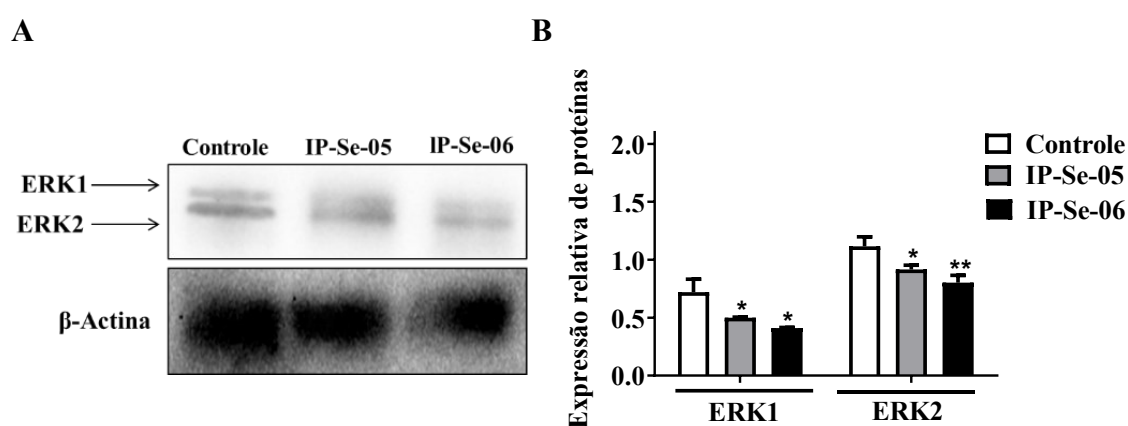
Até o presente momento são poucos os estudos na literatura científica que investigaram o papel de imidazopiridinas na inibição de CDKs e suas parceiras catalíticas, as ciclinas. Almeida e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** na progressão do ciclo celular em células MCF-7. Os autores demonstraram que esses compostos ocasionaram parada do ciclo celular em G2/M com diminuição dos níveis de ciclina A. Martínez-Urbina e colaboradores (2010) avaliaram a progressão do ciclo celular de células de tumorais de mama (MCF-7) e pulmão (SK-LU-1) expostas a derivados de imidazopiridinas. Os autores mostraram que os compostos mais citotóxicos foram capazes de causar parada do ciclo celular na fase G2/M com inibição das atividades da ciclina B/CDK1 e da ciclina A/CDK2. Ingersoll e colaboradores (2015) avaliaram o efeito antiproliferativo de novos derivados de imidazopiridinas frente a células de câncer de próstata (LNCaP C-81 PCa) e observaram que os compostos foram capazes de diminuir os níveis de ciclina B1 e ciclina D1.

De acordo com Fan e colaboradores (2016), a presença do selênio na estrutura de compostos com atividade antitumoral pode potencializar tal atividade por induzir a parada do ciclo celular. Liang e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos de derivados de selenodiazol com benzimidazol em células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB231) e observaram parada do ciclo em G2/M nas células MDA-MB 231, além de aumento da população de células na fase SubG-1 que pode ser indicativo de morte celular por apoptose. Esses resultados, segundo os autores, foram associados a inclusão de selênio na estrutura das moléculas.

### 5.1.4 Compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 alteram vias de proliferação celular

Através do ensaio clonogênico observou-se que o composto **IP-Se-06** foi capaz de inibir a proliferação das células HepG-2 (Figura 18). Além disso, o mesmo composto levou a parada do celular na fase G1 (Figura 20). Nesta fase, ocorre ativação de proteínas envolvidas na proliferação celular. Sendo assim, foi investigada a ação dos compostos sobre importantes proteínas das vias de sinalização para proliferação e sobrevivência celular, MAPK/ERK 1/2 (Figura 22) e PI3K/Akt/mTOR (Figura 23).

Figura 22 – Efeito dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** sobre proteínas da via de sinalização ERK 1/2.



Legenda. (A) Conteúdo de ERK1/2 em relação ao grupo controle após o tratamento com **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M) por 48 horas. (B) Os diagramas em barras demonstram os níveis relativos de proteína por análise de *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*) e (\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente.

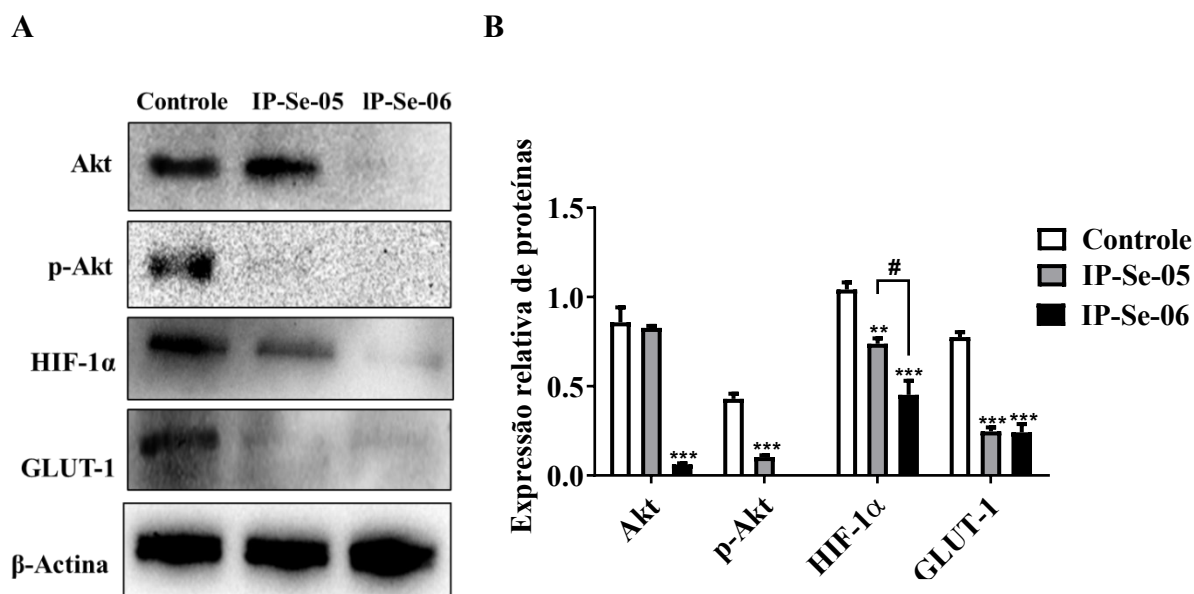
Os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** diminuíram os níveis de ERK1 ( $p < 0,05$ ) e ERK2 ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), conforme mostrado na figura 22A e 22B. A modulação da sinalização da ERK é essencial para reduzir a progressão do tumor, pois quando ativada essa via sinaliza para a proliferação das células neoplásicas (ASIATI, 2016; SU e TANSINONE, 2018). A diminuição dos níveis de ERK1/2 está em acordo com os resultados obtidos no ensaio de parada do ciclo celular em G1 e no ensaio clonogênico, nos quais foi identificado efeito antiproliferativo para o composto **IP-Se-06**. Entretanto, é importante notar que o composto **IP-Se-05** apesar de ter causado diminuição no conteúdo de ERK1/2, não apresentou efeito antiproliferativo quando avaliado pelo ensaio clonogênico em células HepG-2.

Em células em proliferação, a sinalização de ERK1/2 induzida por Ras controla principalmente a transição da fase G1 para a S do ciclo celular. Isso porque ERK1/2 regulam a transcrição genica da ciclina D1 (codificada por *CCND1*), favorecendo a passagem da fase G1 para a fase S (ALBANESE *et al.*, 1995; LAVOIE *et al.*, 2020).

Segundo Lawson e colaboradores (2016), o efeito antitumoral dos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridina pode estar associado à inibição de cinases; entretanto, até o momento, poucos estudos na literatura associam os efeitos de imidazopiridinas na via de sinalização MAPK/ERK. Li e colaboradores (2019) avaliaram o efeito antiproliferativo de novas imidazopiridinas na fosforilação da via de sinalização Ras/MEK/ERK em células de câncer de próstata humano (DU-145) e mostraram que um dos compostos em estudo foi capaz de inibir a fosforilação de MEK e ERK de modo dose dependente. Bao e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de um novo inibidor sintético de HSP90 (chaperona) da classe de compostos imidazopiridina e observaram redução dos conteúdos de Raf/MEK/ERK em linhagens de câncer de mama (Sk-Br-3), pulmão (H1993), gástrico (N87) e glioblastoma (M59K, LN18).

Tendo em vista os resultados obtidos no ensaio antiproliferativo, somado a possível ação de imidazopiridinas em proteínas cinases, foi investigado o efeito dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** na via de sinalização da proteína Akt igualmente envolvida na proliferação e sobrevivência celular, além da progressão tumoral (Figura 23).

Figura 23 – Efeito dos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** sobre proteínas da via de sinalização Akt/mTOR.



Legenda. (A) Imunoelctroforese de proteínas envolvidas na via de sinalização celular Akt, nomeadamente Akt, p-Akt, HIF-1 $\alpha$  e GLUT-1 após exposição de 48 horas aos compostos **IP-Se-05** (0,051 $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M). (B) Os diagramas em barras demonstram os níveis relativos das proteínas por análise com *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. (\*\*) e (\*\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) em  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. (#) representa diferença estatística entre os dois tratamentos com compostos de selênio em  $p < 0,05$ .

Conforme observado na figura 23, o composto **IP-Se-05** não alterou os níveis da proteína Akt, mas foi capaz de diminuir seu conteúdo em sua forma ativa fosforilada (p-Akt) ( $p < 0,001$ ). A redução dos níveis de p-Akt contribuiu para a diminuição dos conteúdos de HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) e GLUT-1 ( $p < 0,001$ ), uma vez que estes são produtos da ativação desta cinase. O composto **IP-Se-06** diminuiu o conteúdo da Akt, antes da mesma ser fosforilada sugerindo uma modulação *up stream* na via PI3K/Akt/mTOR ou mesmo inibição gênica, o que resultou na diminuição do conteúdo de HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0,001$ ) e GLUT-1 ( $p < 0,001$ ).

A hiperativação da via da PI3K/Akt/mTOR é descrita em diferentes tipos de câncer (MAYER e ARTEAGA, 2016), sendo essa via amplamente estudada principalmente por estar associada a proliferação e a sobrevivência de células tumorais. De acordo com Almeida e colaboradores (2018), a classe de compostos imidazopiridinas parecer atuar na via da PI3K/Akt/mTOR contribuindo para a inibição do crescimento de células tumorais. Com resultados semelhantes aos achados no presente estudo Fan e colaboradores (2017) avaliaram o efeito antiproliferativo de imidazo[1,2-*a*]piridina frente



a um painel de células tumorais e identificaram importante inibição da PI3K e p-Akt, indicando essa classe de compostos como promissores na atuação sobre importantes alvos terapêuticos, como a via PI3K/Akt/mTOR.

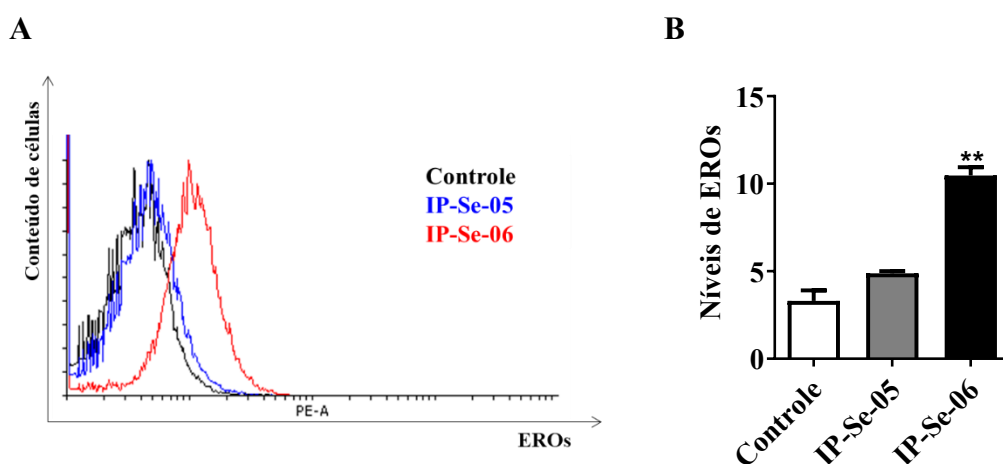
Sob condições de hipóxia, a Akt pode contribuir para estabilização do HIF-1 $\alpha$ . Uma vez ativada, a Akt auxilia na translocação do HIF-1 $\alpha$  para o núcleo da célula, onde será dimerizado com HIF-1 $\beta$ . Essa dimerização favorece a transcrição dos genes de *GLUT* e *VEGF* (DEBEN *et al.*, 2018; MASSARI *et al.*, 2016). Poucos estudos na literatura relatam os efeitos de imidazopiridinas no conteúdo de HIF-1 $\alpha$  em células tumorais. Li e colaboradores (2013) avaliaram o efeito de derivados de imidazopiridinas em células de câncer de mama e encontraram importante redução dos níveis de HIF-1 $\alpha$ . Segundo os autores, esse resultado foi associado a inibição de PI3K e p-Akt causada pelos compostos.

Células em hipóxia tendem a consumir mais glicose para atender às suas necessidades energéticas. O HIF-1 $\alpha$  pode mediar essa conversão metabólica através da indução de enzimas envolvidas na via glicolítica e superexpressão de transportadores GLUT-1, para maior captação de glicose pelas células tumorais (DENKO, 2008; MASSARI *et al.*, 2016). Assim, sugere-se que a inibição do HIF-1 $\alpha$  pelos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** pode ser responsável pela diminuição do conteúdo de GLUT-1. Em acordo com os resultados obtidos com o presente estudo Ambrosetti e colaboradores (2018) observaram que ao inibir HIF-1 $\alpha$ , ocorre diminuição da transcrição de GLUT-1 e hexocinase 2, indicando que a redução dos níveis de HIF-1 $\alpha$  pode contribuir para a diminuição da captação de glicose de células tumorais. Há poucos relatos na literatura científica sobre os efeitos de imidazopiridinas na modulação de HIF-1 $\alpha$ . Fuse e colaboradores (2016) sintetizaram e avaliaram a capacidade de análogos de imidazo[1,5-*a*] piridina em modular a expressão HIF-1 $\alpha$  em células HeLa. Os resultados mostraram que os compostos sintetizados foram capazes de inibir HIF-1 $\alpha$  de forma análoga ao seu conhecido inibidor, YC-1.

### 5.1.5 Efeito de IP-Se-05 e IP-Se-06 nos níveis de EROs intracelulares e fragmentação do DNA em células HepG-2

Segundo Los e colaboradores (2009), a diminuição da captação de glicose pode estimular a produção excessiva de EROs em células tumorais. Sendo assim, uma vez que os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** diminuíram os níveis de GLUT-1, foi investigado o conteúdo intracelular de EROs em células HepG-2 (Figura 24).

Figura 24 - Níveis de EROs em células expostas aos compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06**.



Legenda. As células HepG-2 foram expostas aos compostos **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M) durante 12 horas. (A) Geração de EROs demonstrada no histograma da fluorescência de DCFH-DA. (B) Diagrama em barras demonstra os níveis de EROs induzidos pelos compostos **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. (\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado),  $p<0,01$ .

Na figura 24 pode ser observado um aumento nos níveis de EROs intracelulares em células HepG-2 quando expostas ao composto **IP-Se-06** ( $p<0,01$ ), diferentemente do composto **IP-Se-05** que não exerceu efeito nos níveis de EROs quando comparado ao grupo controle.

Níveis elevados de EROs em células tumorais podem levar ao estresse oxidativo e indução da morte de celular (GAO *et al.*, 2020). Por esta razão, a elevação dos níveis de EROs intracelulares podem ser propostos como um alvo importante na terapia antitumoral. Imidazopiridinas parecem modular os níveis de EROs intracelulares. Estudo conduzido por Sunkari e colaboradores (2019) associou o efeito citotóxico produzido por novos híbridos de bisindol-imidazopiridina aos elevados níveis de EROs produzido pelos

compostos, conduzindo as células tumorais a apoptose. Subba e colaboradores (2016) avaliaram uma série de conjugados de imidazopiridinil-1,3,4-oxadiazol contra diferentes linhagens tumorais e identificaram que um dos compostos testados foi capaz de inibir a topoisomerase II, causando fragmentação do DNA, elevação de EROs e desencadeando a morte celular, de modo semelhante ao mecanismo de ação proposto para a doxorrubicina. Ainda, Song e colaboradores (2014) avaliaram o efeito de um novo derivado de imidazopiridina em diferentes linhagens tumorais e demonstraram que o aumento de EROs foi o principal mecanismo para indução de apoptose em três diferentes linhagens tumorais testadas: fígado (H-7402), mama (MCF-7) e cólon (HT29) com  $CI_{50}$  com valores entre 12,35  $\mu$ M até 29,37  $\mu$ M.

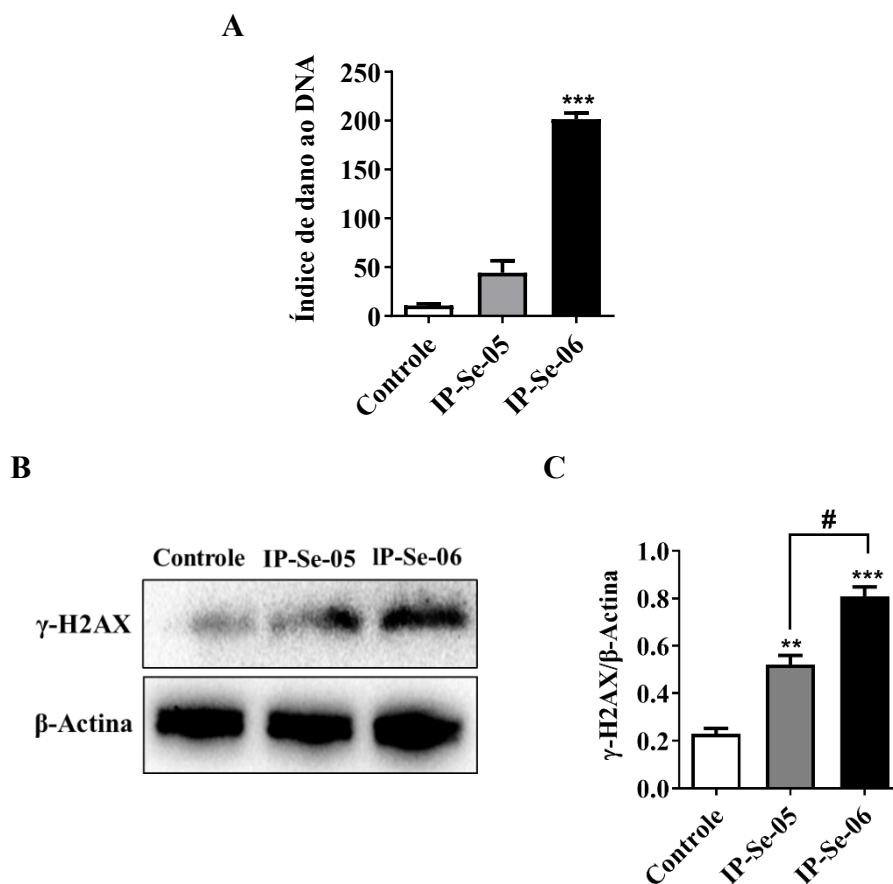
A adição de selênio aos compostos também contribui para a geração de EROs. De acordo com Kieliszek e colaboradores (2017) e Qui e colaboradores (2010), elevados níveis de selênio inorgânico e orgânico induzem um exacerbado estresse oxidativo em células tumorais. Altos níveis de selênio também podem causar danos oxidativos ao DNA e nas mitocôndrias, levando à disfunção mitocondrial e apoptose dependente ou independente de caspases em células tumorais (TAN *et al.*, 2018). Segundo Cheng e colaboradores (2012), células de osteossarcoma (U2OS) quando tratadas com selenito de sódio apresentaram elevados níveis de EROs, ocasionando a morte celular por apoptose devido ao aumento da expressão de p53.

Além disso, alguns estudos indicam que acrescentar o selênio a compostos com propriedades biológicas já descritas, parece promover seletividade celular de modo que os danos oxidativos sejam direcionados às células tumorais, poupando células não tumorais (PANG e CHIN, 2019). Estudo conduzido por Zeng e colaboradores (2014) comparou compostos de platina contendo selênio com o antitumoral cisplatina em células HepG-2. Os autores constataram que os compostos com selênio na estrutura exerceram maior seletividade quando comparado ao antitumoral cisplatina; além disso, os autores associaram a morte celular por apoptose a capacidade do selênio em alterar o balanço redox das células tumorais.

Está bem descrito na literatura que níveis aumentados de EROs podem causar danos ao DNA (LIU e WANG Z, 2015; SRINIVAS *et al.*, 2019). Dessa forma, devido à capacidade do composto **IP-Se-06** de elevar significativamente os níveis de EROs em

células HepG-2, foi investigado se os compostos seriam capazes de causar danos ao DNA (Figura 25).

Figura 25 - Fragmentação do DNA e conteúdo de  $\gamma$ -H2AX em células HepG-2 tratadas com **IP-Se-05** e **IP-Se-06**.



Legenda. As células HepG-2 foram tratadas com **IP-Se-05** (0,51  $\mu$ M) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu$ M). (A) Índice de dano ao DNA analisado pelo ensaio cometa após 72 horas de exposição aos compostos. (B) Imunoeletróforese da proteína usada como marcador de dano ao DNA ( $\gamma$ -H2AX) após 48 horas de exposição aos compostos. (C) Os diagramas em barras demonstram os níveis relativos de proteína analisadas por *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) para  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. (#) indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com os compostos avaliados,  $p < 0,05$ .

O composto **IP-Se-06** ocasionou fragmentação do DNA em células HepG-2 ( $p < 0,001$ ), o que provavelmente resultou no aumento dos níveis da proteína  $\gamma$ -H2AX ( $p < 0,001$ ), importante marcador de dano ao DNA. Por outro lado, o composto **IP-Se-05** embora tenha elevados os níveis de EROs, tais níveis não diferiram estatisticamente do controle, porém, também elevou os níveis da proteína  $\gamma$ -H2AX de forma significativa quando comparado ao controle ( $p < 0,001$ ).

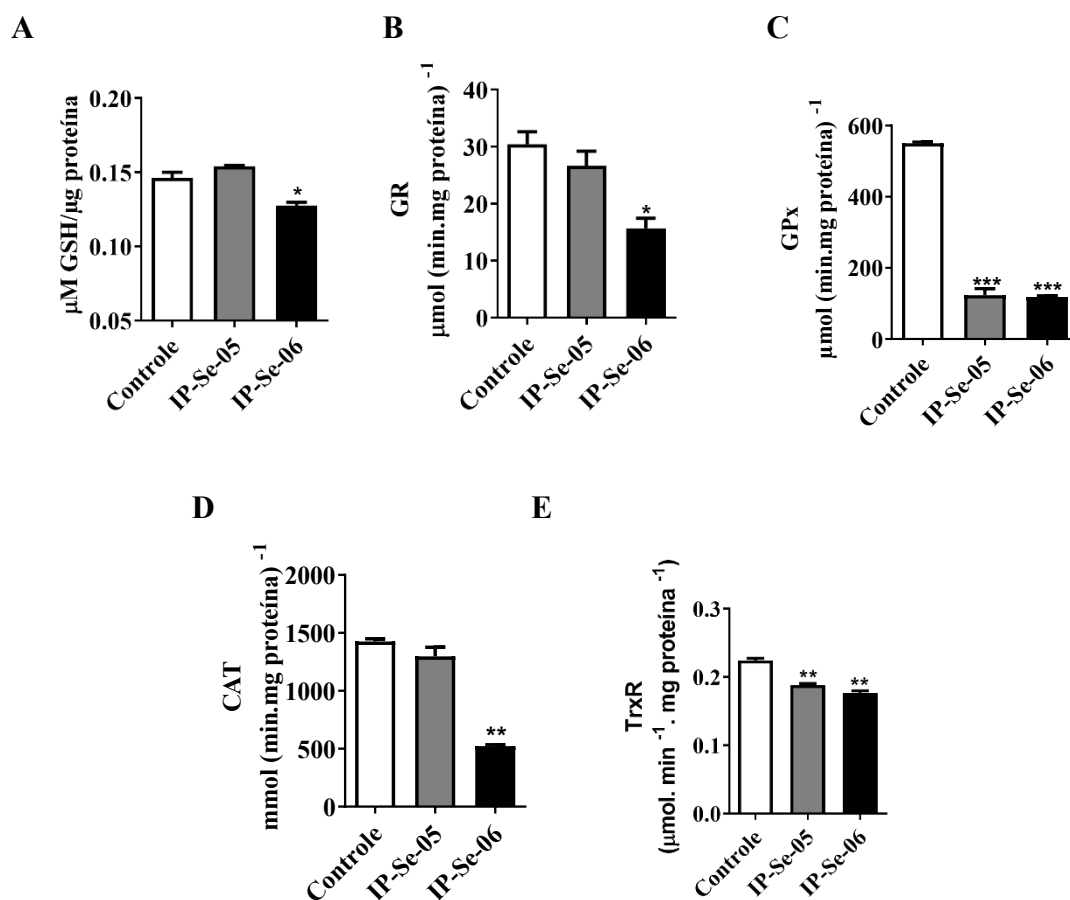
O DNA é um dos principais alvos na terapia do câncer. Tradicionalmente, a indução de danos ao DNA ativa a proteína  $\gamma$ -H2AX, sendo esta um importante marcador de dano à molécula do DNA. A histona H2AX uma vez fosforilada ( $\gamma$ -H2AX) interage com as proteínas ATM e ATR que fosforilam a p53 ativando-a para que esta conduza as células para a parada do ciclo celular e/ou indução de morte por apoptose (HOSOYA e MIYAGAWA, 2014).

Poucos estudos relatam os efeitos de imidazopiridinas sobre a fragmentação do DNA. El-Awady e colaboradores (2016) relataram que um novo derivado de imidazopiridina foi capaz de potencializar os efeitos citotóxicos da doxorrubicina em células de câncer de mama (MCF-7) e de pulmão (A549), ocasionando dano ao DNA das células tumorais de forma seletiva através da inibição da fosforilação da proteína ATR. Guçlu e colaboradores (2018) também demonstraram aumento de dano ao DNA através do ensaio do cometa em células de glioblastoma tratadas com um novo derivado sintético de imidazopiridina. Por fim, Almeida e colaboradores (2018) demonstraram danos ao DNA induzidos pelas mesmas imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas deste estudo, porém em células MCF-7, reforçando que os compostos em estudo interagem diretamente com o DNA das células tumorais.

### **5.1.6 Compostos IP-Se-05 e IP-Se-06 alteram as defesas antioxidantes**

É descrito na literatura que compostos de selênio são capazes de alterar o balanço redox de células tumorais através da modulação de defesas antioxidantes (KURŠVIETIENĖ *et al.*, 2020). Por outro lado, o presente estudo demonstrou que os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** diminuíram os níveis de ERK 1/2 e Akt e estas por sua vez, são proteínas que pertencem a vias de sinalização que podem ser moduladas pelo ambiente redox (MAO *et al.*, 2016; OURIQUE *et al.*, 2016). Nesse sentido, tendo em vista o acúmulo de EROs e diminuição dos níveis de Akt e ERK 1/2, foi investigado a atividade de enzimas antioxidantes e os níveis do tripeptídeo GSH de células HepG-2 expostas a esses compostos (Figura 26).

Figura 26 – Alteração das defesas antioxidantes em células HepG-2 tratadas com **IP-Se-05** e **IP-Se-06**.



Legenda. Efeito dos compostos **IP-Se-05** (0,51  $\mu\text{M}$ ) e **IP-Se-06** (0,02  $\mu\text{M}$ ) nos n\u00edveis de GSH (A) e na atividade de GR (B); GPx (C); CAT(D); TrxR (E) em c\u00e9lulas HepG-2 ap\u00f3s 6 horas de tratamento. Os resultados foram expressos pela M\u00e9dia  $\pm$  Desvio Padr\u00e3o,  $n=3$ , utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferen\u00e7a estatisticamente significativa comparada ao controle (n\u00e3o tratado) para  $p<0,05$ ,  $p<0,01$  e  $p<0,001$ , respectivamente.

**IP-Se-05** foi capaz de diminuir a atividade da GPx ( $p<0,001$ ) e TrxR ( $p<0,01$ ) de forma estatisticamente significativa quando comparado ao controle. Por outro lado, o composto **IP-Se-06** foi capaz de modular todas as defesas antioxidantes diminuindo o cont\u00e9udo de GSH ( $p<0,05$ ), e as atividades das enzimas GR ( $p<0,05$ ), GPx ( $p<0,001$ ), CAT ( $p<0,01$ ) e TrxR ( $p<0,01$ ).

Como j\u00e1 comentado anteriormente, as c\u00e9lulas tumorais possuem n\u00edveis de EROs aumentados quando comparados com c\u00e9lulas n\u00e3o tumorais (MOLONEY E COTTER, 2018). No entanto, os n\u00edveis de EROs podem ser neutralizados por um aumento da atividade das defesas antioxidantes nessas c\u00e9lulas. Esse efeito sugere que estrat\u00e9gias terap\u00eauticas que aumentam a gera\u00e7\u00e3o de EROs e/ou diminuem as defesas antioxidantes

podem levar as células tumorais à ativação de diferentes vias de morte celular via indução de estresse oxidativo.

A GSH é o tiol não proteico de maior prevalência nas células e é considerado um dos principais mecanismos de defesa contra espécies reativas (DONG *et al.*, 2019). Entretanto, em um ambiente tumorigênico, níveis elevados de GSH são capazes de proteger as células tumorais, conferindo resistência a medicamentos quimioterápicos (BANSAL e SIMON, 2018). No presente estudo, o composto **IP-Se-06** foi capaz de diminuir os níveis de GSH quando comparado ao controle. Certamente esse fato está associado ao aumento nos níveis de EROs, encontrados nas células expostas a esse composto. Sabendo que linhagens celulares resistentes a EROs apresentam níveis elevados de GSH (BANSAL e SIMON, 2018; KENNEDY *et al.*, 2020) que dificultam a indução de morte celular, a diminuição de GSH encontrada no presente estudo é de grande valia.

A GR reduz a GSSG a GSH utilizando NADPH como doador de elétrons (LIU *et al.*, 2014). Conforme mostrado na figura 22, o composto **IP-Se-06** foi capaz de diminuir a atividade da GR em células HepG-2. A diminuição da atividade dessa enzima é interessante, pois reduz a reciclagem de GSH, contribuindo para a diminuição dos níveis de GSH. Estudo conduzido por Yan e colaboradores (2019) sustenta a hipótese de que compostos que sejam capazes de diminuir a atividade de enzimas necessárias para a reciclagem da GSH, principalmente a GR, podem ser direcionados para a terapia antitumoral, uma vez que a GSH é um dos principais antioxidantes das células tumorais (HARRIS *et al.*, 2015; KENNEDY *et al.*, 2020; SOBHAKUMARI *et al.*, 2012).

O composto **IP-Se-06** diminuiu de forma significativa os níveis de CAT e GPx, o que pode ter ocasionado o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É provável que esse aumento possa ter contribuído para a morte celular por apoptose em células expostas ao composto **IP-Se-06**, isso porque o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possui capacidade de agir em locais distantes da sua formação inicial fazendo com que ele interaja com diferentes proteínas, como por exemplo, a cinase 1 de regulação de sinal da apoptose (ASK1) que atua como um importante mediador da apoptose induzida por EROs. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao interagir com a ASK-1 leva a sua ativação (SHIIZAKI; NAGURO; ICHIJO, 2013).

Estudo conduzido por Zhao e colaboradores (2019) avaliou os efeitos da GSH e CAT na resistência de células de câncer hepático, cervical e de pulmão frente a níveis de

EROs e observaram que a diminuição dos níveis de CAT sensibilizou as células tumorais encaminhando-as para vias de morte celular. Segundo os autores, a inibição da CAT é tão importante quanto os níveis de GSH, sendo esse um caminho a ser estudado para indução de morte celular em células tumorais.

O sistema TrxR é considerado um dos mecanismos chave para manter a homeostase redox (JASTRZĄB e SKRZYDLEWSKA, 2021). Este sistema contém a proteína Trx como doadora de hidrogênio que é reduzida pela TrxR utilizando NADPH para promover suas atividades. Pesquisas indicam que a atividade de TrxR está elevada em diferentes tipos de câncer, pois ela atua combatendo níveis elevados de EROs em células tumorais para evitar a morte celular (MOHAMMADI *et al.*, 2019). No presente estudo, os compostos **IP-Se-05** e **IP-Se-06** foram capazes de diminuir a atividade de TrxR em células HepG-2, o que pode indicar a indução de morte celular ocasionada pelos compostos. No mesmo sentido, Lei e colaboradores (2018) investigaram o efeito da inibição de TrxR em células HepG-2 e observaram diminuição da proliferação e aumento da morte celular por apoptose via EROs. Ainda, foi relatado que a inibição de TrxR promove apoptose dependente de EROs em células de câncer de pâncreas e pulmão (ARAMBULA *et al.*, 2016; CHENG *et al.*, 2014). Assim, a disfunção da TrxR e/ou a inibição de sua atividade pode representar uma nova e promissora estratégia para a terapia de cânceres humanos (DUAN *et al.*, 2016)

## **5.2 Parte II – Efeitos das imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas em células A172**

### **5.2.1 Citotoxicidade de imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas em células A172**

O presente trabalho também investigou o efeito citotóxico de dez derivados de imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas em células de glioblastoma humano. A seleção dos compostos mais promissores foi realizada por meio do ensaio do MTT, calculando-se a  $CI_{50}$  para as linhagens celulares A172 e HT22. O composto **IP-01** (molécula protótipo que não contém selênio na sua estrutura) apresentou  $CI_{50}$  de 76,30  $\mu$ M, enquanto os derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas mostraram diferentes respostas citotóxicas, variando a  $CI_{50}$  de 1,8  $\mu$ M até 98,8  $\mu$ M, conforme demonstrado na tabela 3.



Tabela 3 – Perfil citotóxico de imidazo[1,2-*a*] piridinas e índice de seletividade em células A172.

Compostos	CI <sub>50</sub> (μM)		Índice de Seletividade (IS)
	A172	HT-22	
<b>IP-01</b>	76,3	153,4	2,0
<b>IP-Se-01</b>	98,8	75,4	0,7
<b>IP-Se-02</b>	73,2	143,5	1,9
<b>IP-Se-03</b>	27,6	3,4	0,1
<b>IP-Se-04</b>	43,6	305,7	7,0
<b>IP-Se-05</b>	20,8	206,2	9,9
<b>IP-Se-06</b>	1,8	65,0	36,5
<b>IP-Se-07</b>	27,9	10,7	0,4
<b>IP-Se-08</b>	20,9	31,2	1,5
<b>IP-Se-09</b>	21,8	6,0	0,3
<b>IP-Se-10</b>	18,8	30,0	1,6

Legenda. Os compostos foram testados na linhagem tumoral A172 e em células não tumorais (HT22) em concentrações entre de 0,1 a 1000 μM durante 72 horas. Os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes (n=3) e a CI<sub>50</sub> calculada com auxílio do *software* GraphPad Prisma versão 8.0.

Analisando a tabela 3 observa-se que apenas quatro compostos apresentam seletividade sobre a linhagem de células não tumorais, são eles **IP-Se-04**, **IP-Se-05**, **IP-Se-06**, além da molécula protótipo **IP-01** com IS que variam entre 2,0 e 36,5. Ainda, de acordo com o IS proposto por Badisa e colaboradores (2009), o **IP-Se-06** demonstrou melhor efeito citotóxico seletivo uma vez que apresentou o menor valor de CI<sub>50</sub> (1,8 μM) e maior IS (36,5).

Recentemente, derivados de imidazopiridina têm atraído considerável atenção devido a seu potencial efeito antitumoral. Dessa forma, seu efeito sobre células de glioblastoma deve ser considerado. Vários estudos têm demonstrado elevada citotoxicidade de derivados de imidazopiridinas sobre diferentes linhagens tumorais: MCF-7, A549 e DU145 (IQBAL *et al.*, 2020) e K562 (MARIE KIRWEN *et al.*, 2017), e a presença do selênio na estrutura de diferentes compostos têm se mostrado importante

para o efeito antitumoral dos mesmos (BENASSI *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2020). No estudo de Cheng e colaboradores (2017) foi introduzido selênio a um novo análogo da TMZ e o composto apresentou citotoxicidade para diferentes linhagens de gliomas humanos, além de efeito antiproliferativo superior à própria temozolomida. No entanto, o efeito de imidazopiridinas seleniladas em células de glioblastoma humano é inovador na literatura científica, o que torna este um trabalho pioneiro.

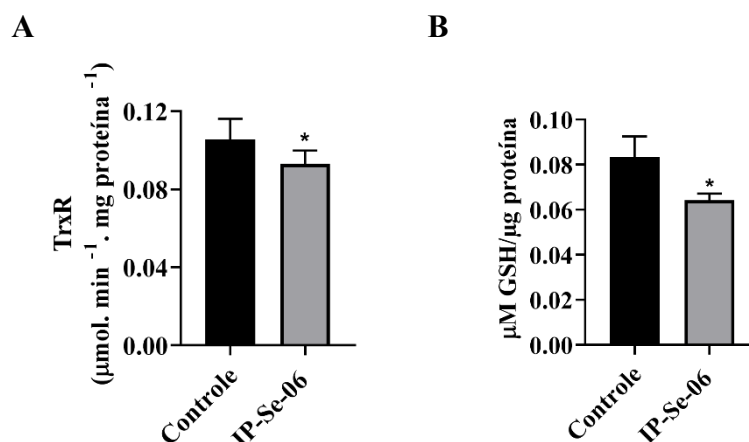
É importante ressaltar que as células investigadas no presente trabalho apresentam resistência a TMZ, principal fármaco disponível para o tratamento de glioblastomas, por isso, a citotoxicidade apresentada pelo composto **IP-Se-06** é de suma importância para dar continuidade à investigação do efeito antitumoral do composto em questão. Em nível de comparação estudos anteriores demonstraram que a concentração de TMZ necessária para inibir de forma significativa a viabilidade celular foi de 14,1  $\mu\text{M}$  e 42,6  $\mu\text{M}$  em células A172 expostas ao fármaco durante 144 horas (KARPEL-MASSLER *et al.*, 2014; PERAZZOLI *et al.*, 2015).

Sendo assim, devido ao efeito antitumoral já apresentado pelo composto **IP-Se-06** sobre as linhagens tumorais MCF-7 (ALMEIDA *et al.*, 2018) e HepG-2 (SANTOS *et al.*, 2020) e considerando o significativo efeito citotóxico com  $\text{IC}_{50}$  de 1, 8  $\mu\text{M}$  e seletividade de 36, 52, optou-se por dar continuidade às investigações do mecanismo de ação desse composto em células A172, utilizando  $\text{CI}_{25}$  (1  $\mu\text{M}$ ) para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade de **IP-Se-06**.

### **5.2.2 Efeito do composto IP-Se-06 no conteúdo de GSH e atividade da TrxR em células A172**

É bem descrito que o status redox alterado em células malignas pode ser considerado uma importante estratégia para impulsionar a atividade de fármacos quimioterápicos (TRACHOOTHAM *et al.*, 2009). Nesse sentido, Santos e colaboradores (2020) associaram o efeito antitumoral do composto **IP-Se-06** ao estado redox em células tumorais, com diminuição de defesas antioxidantes e aumento de EROs intracelular. Sendo assim, foram investigados, a atividade de TrxR e conteúdo de GSH em células A172 (Figura 27).

Figura 27 – Alteração no conteúdo de GSH e atividade da TrxR em células A172 tratadas com **IP-Se-06** (1  $\mu$ M).



Legenda. Efeito do composto **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) após 6 horas de exposição sobre a atividade de TrxR (A); e nos níveis de GSH (B) em células A172. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=3$ , utilizando ANOVA *two-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*) denotam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p<0,05$ .

O composto **IP-Se-06** foi capaz de diminuir a atividade da TrxR ( $p<0,05$ ), assim como os níveis de GSH ( $p<0,05$ ) de forma estatisticamente significativa quando comparado ao controle. As razões para a escolha do sistema TrxR como alvo de compostos antitumorais são os papéis deste na regulação de apoptose e em sua superexpressão em diferentes células tumorais (MOHAMMADI *et al.*, 2019). A inibição do sistema TrxR altera o estado redox intracelular induzindo apoptose por meio do acúmulo de EROs, ativação de ASK1 e inibição da nitrosilação da pró-caspase-3 (MITCHELL *et al.*, 2007; SAITOH *et al.*, 1998). Além disso, o sistema TrxR vem sendo associado a ativação de Akt, devido sua capacidade em inibir a proteína PTEN (ZHANG *et al.*, 2017).

Corroborando com o exposto, o estudo *in vivo* de Ceccarelli e colaboradores (2008) demonstrou que injeções subcutâneas de duas linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano com alta e baixa expressão da proteína TrxR em camundongos imunodeficientes mostraram que a formação de tumores foi proporcional aos níveis de expressão de TrxR das células injetadas. Ainda, o estudo de Welsh e colaboradores (2002) revelou pela primeira vez que a transfecção de TrxR pode causar a superexpressão de HIF-1 $\alpha$  e VEGF em células de câncer de mama, assim como a transfecção de TrxR inativa diminuiu os níveis de HIF-1 $\alpha$  e VEGF. Kemerdere e colaboradores (2013) avaliaram os

níveis de TrxR no sangue e tecidos de 27 pacientes, onde constataram que o nível médio de TrxR em tecidos de gliomas foi notavelmente maior do que em tecidos cerebrais não tumorais, indicando que níveis elevados de TrxR podem estar relacionados a progressão de gliomas. Esen e colaboradores (2015) estudaram a expressão de TrxR em tecidos de astrocitoma de diferentes graus provenientes de 40 pacientes. A intensidade de imunomarcção de TrxR1 no astrocitoma de grau IV foi significativamente maior do que no tecido de pacientes saudáveis, além disso, os níveis de expressão de TrxR foi proporcional a complexidade dos tumores, sendo maior no grau II, quando comparado ao grau I, e maior no grau III quando comparado ao grau II. Recentemente, Yao e colaboradores (2020) investigaram os níveis de TrxR em gliomas e meduloblastomas oriundos de pacientes adultos e pediátricos e constaram que níveis elevados de TrxR estão associados com maior grau de malignidade tumoral para as duas faixas etárias investigadas, sugerindo assim que TrxR pode representar importante alvo terapêutico para o tratamento de gliomas.

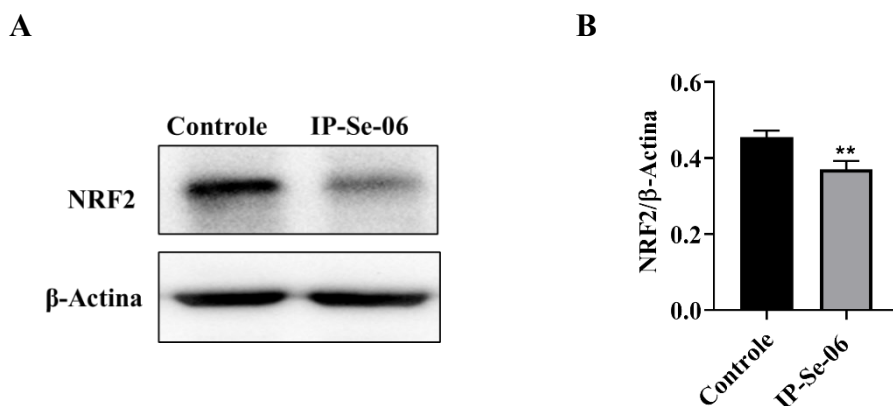
Apesar de seus baixos níveis em tumores cerebrais, a GSH tem sido associada à resistência à quimioterapia em gliomas. Najim e colaboradores (2009) ao estudarem células de meduloblastoma e glioma, observaram aumento do conteúdo de GSH conforme as células adquiriam resistência à TMZ, cisplatina e metotrexato; entretanto a razão para esse aumento da resistência a quimioterápicos não foi elucidada pelos autores. Kohsaka e colaboradores (2013) revelaram que células de glioblastoma resistentes à TMZ tornam-se mais sensíveis ao efeito desse quimioterápico quando a síntese de GSH é inibida por co-tratamento com L-butionina-S, R-sulfoximina (BSO), um inibidor conhecido da glutamato cisteína ligase (GCL) e, conseqüentemente, da síntese de GSH. Assim, a redução do conteúdo de GSH em células tumorais é potencialmente um alvo terapêutico, e vários trabalhos têm mostrado que sua depleção aumenta a sensibilidade das células tumorais cerebrais ao tratamento quimioterápico, enquanto níveis mais elevados estão associados à resistência a terapia convencional.

Nesse sentido, o composto **IP-Se-06** mostrou ser capaz de diminuir a atividade de TrxR e o conteúdo de GSH em células de hepatocarcinoma, sendo esses resultados associados a presença de selênio ao núcleo de imidazopiridina (SANTOS *et al.*, 2020). O estudo de Khandelwal e colaboradores (2018) constatou que a adição de selênio a estrutura dos compostos torna-os mais potentes devido ao efeito seletivo do selênio de

gerar ânion superóxido e outras espécies reativas em células tumorais enquanto demonstram menor citotoxicidade para células não tumorais. O estudo de Santos e colaboradores (2019) demonstrou que altos níveis de cisteína e GSH impactam na resistência à carboplatina no câncer de ovário. Para reverter essa resistência, os autores propuseram que a utilização de inibidores competitivos do transportador xCT (transportador de cistina/glutamato) poderia ser uma alternativa viável, sendo assim, a presença de selênio em compostos com atividade antitumoral poderia auxiliar na redução do conteúdo de GSH.

No caso do aumento de EROs as células são levadas a um ambiente de estresse oxidativo, o NRF2 é liberado da ligação de Keap1 e translocado para o núcleo. Nesse caso, o NRF2 transcreve genes para equilibrar os mediadores oxidativos e manter a homeostase redox celular (ZHANG, 2006). Tendo em vista a diminuição das defesas antioxidantes de células A172 ocasionadas pelo composto **IP-Se-06** e sabendo que o NRF2 é considerado o principal sensor de estresse oxidativo, foi investigado os níveis dessa proteína (Figura 28).

Figura 28 - Efeito do composto **IP-Se-06** sobre o conteúdo do fator de transcrição NRF2.



Legenda. (A) Imunoeletroforese do fator de transcrição NRF2 após a exposição ao composto **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) após o tratamento de 48 horas. (B) O diagrama em barras demonstra os níveis relativos da proteína por análise com *Western blotting*. Os dados foram normalizados com o nível de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *two-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) em  $p < 0,01$ .

A sinalização de NRF2 regula a expressão de enzimas antioxidantes e desintoxicantes de fase II, como GPx,  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS), heme oxigenase-1 (HO-1), NADPH quinona oxidoreductase (NQO-1) e glutathione S-transferase

(GST) (NGUYEN; YANG; PICKETT, 2004). Em condições normais, o NRF2 associa-se ao Keap1 e sofre degradação dependente do proteassoma. Entretanto, em condições de estresse oxidativo, os grupos cisteína sulfidrilas são covalentemente modificados por eletrófilos ou EROs, levando a modificação conformacional de Keap1, resultando na liberação de NRF2, o qual transloca-se para o núcleo, para assim, aumentar a expressão de enzimas antioxidantes (BALOGUN *et al.*, 2003). Na última década, estudos descreveram que a ativação de NRF2 em células tumorais pode promover a progressão do câncer (TAO *et al.*, 2017) e metástase (WANG *et al.*, 2016). Ainda, alguns autores descrevem que a ativação de NRF2 reduz a apoptose, enquanto a inibição genética ou farmacológica de NRF2 aumenta o número de células apoptóticas em resposta a insultos oxidativos (NISO-SANTANO *et al.*, 2010). Nesse sentido, células neoplásicas ativam a sinalização de NRF2 em resposta à radioterapia e ação de alguns quimioterápicos que geram EROs (WANG *et al.*, 2006), tornando-os resistentes à apoptose. Níveis aumentados de expressão de NRF2 estão associados a taxas de sobrevida menores em pacientes com glioma (CHEN *et al.*, 2017). Alguns relatos mostraram que o *knockdown* de NRF2 leva a taxa de proliferação mais baixa *in vitro* e *in vivo* em experimentos de xenoenxerto, como em melanoma (WAS *et al.*, 2006), câncer cervical (MA *et al.*, 2012), câncer de pulmão (HOMA *et al.*, 2009), gliomas (JI *et al.*, 2013) e câncer pancreático (LISTER *et al.*, 2011).

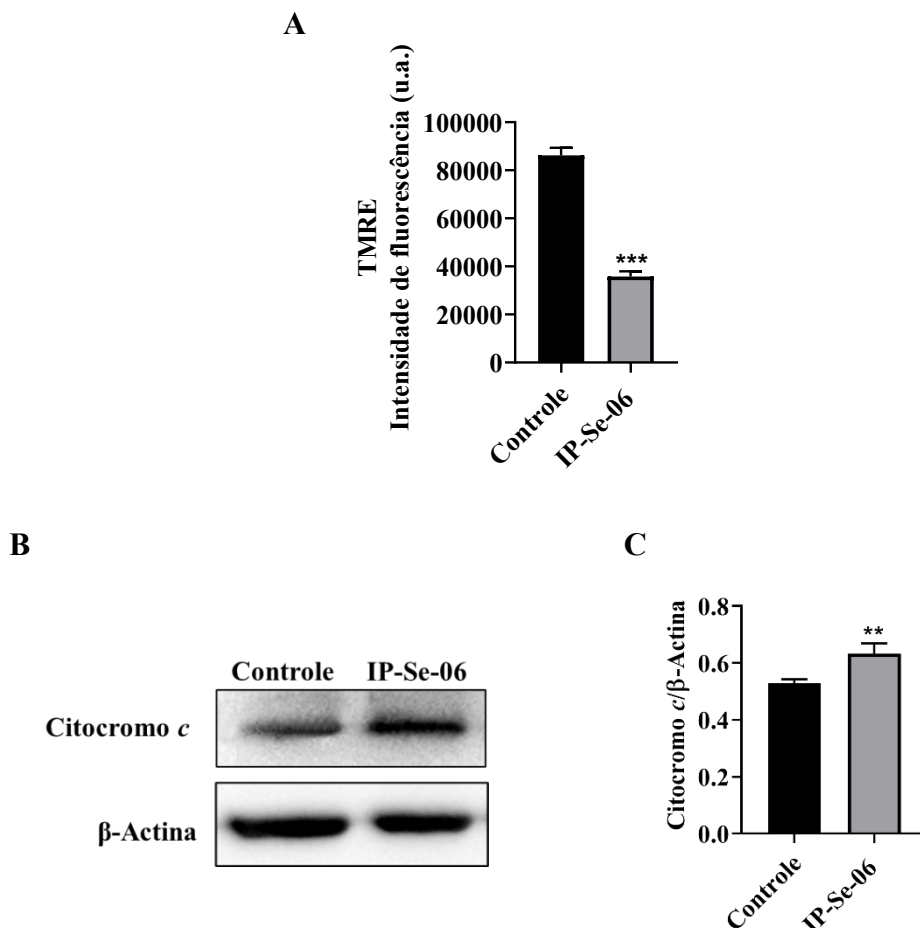
Até o momento, não há estudos que associem compostos de imidazopiridinas a NRF2 e é importante ressaltar que o NRF2 pode ser fosforilado por proteínas cinases como Akt e ERK o que leva a sua translocação para o núcleo (BRYAN *et al.*, 2013; JOO *et al.*, 2016). Sendo assim, é possível deduzir que a diminuição dos níveis de NRF2 causado pelo tratamento com o composto **IP-Se-06** em células A172 esteja associado aos baixos níveis de Akt induzido pelo mesmo composto, como demonstrado por Almeida e colaboradores (2018) em células MCF-7 e por Santos e colaboradores (2020) em células HepG-2.

### **5.2.3 Disfunção mitocondrial, danos ao DNA e morte em células A172 expostas ao composto IP-Se-06**

Com base na baixa viabilidade das células A172 expostas ao composto **IP-Se-06** somados à significativa diminuição no conteúdo de GSH e atividade da TrxR nas células tumorais, foi investigado também o potencial de membrana mitocondrial, uma vez que a

mitocôndria é a principal organela geradora de EROs (Figura 29). Além disso, danos ao DNA e o tipo de morte celular desencadeada por **IP-Se-06** assim como níveis de proteínas envolvidas nessa sinalização, são apresentadas nas figuras 30 e 31.

Figura 29 – Efeito do composto **IP-Se-06** sobre a função mitocondrial de células A172 e conteúdo de citocromo *c*.



Legenda. Efeito do composto **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) sobre a função mitocondrial de células A172. (A) Potencial de membrana mitocondrial analisado pelo corante TMRE em células A172 após 6 horas de tratamento com **IP-Se-06**; (B) Imunoeletroforese do citocromo *c* após exposição ao composto **IP-Se-06** em relação após o tratamento de 48 horas. (C) Os gráficos em barras demonstram os níveis relativos da proteína por análise com *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=3$ , utilizando ANOVA *two-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*\*) e (\*\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p<0,01$ ; e  $p<0,001$  respectivamente.

A figura 29A, demonstra uma significativa redução no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em células A172 ( $p<0,001$ ) após o tratamento com **IP-Se-06** quando comparado ao controle. Também pode-se notar o aumento dos níveis de citocromo *c* nas células A172 ( $p<0,01$ ) quando comparado ao controle (Figura 29B).

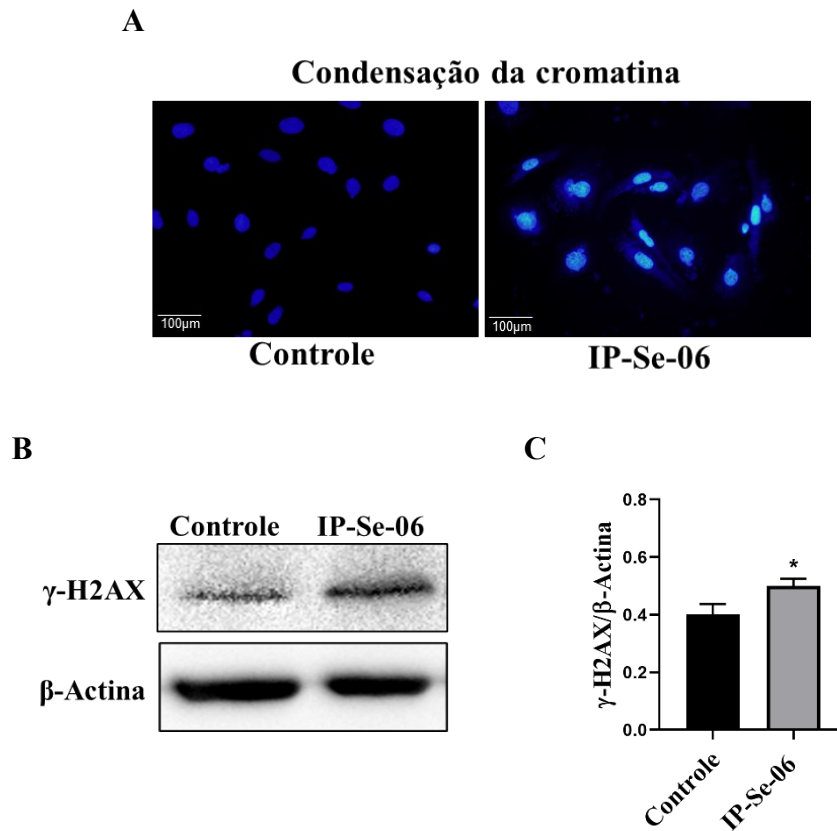
Quando  $\Delta\Psi_m$  é dissipado, as células entram em um processo irreversível de morte celular, por isso parâmetros como  $\Delta\Psi_m$  e liberação de citocromo *c* servem como marcadores bioquímicos para indícios de morte celular por apoptose. A integridade da membrana mitocondrial é regulada pelas proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, que restringem o efluxo de citocromo *c* ligando-se à membrana externa da mitocôndria. Após a estimulação do sinal apoptótico, proteínas como Bax e Bad, formam homo-oligômeros na membrana externa mitocondrial, neutralizando o efeito de Bcl-2 e Bcl-xL, promovendo assim, a liberação do citocromo *c* para ligar-se ao AIF e à caspase-9 para desencadear a apoptose (BHATT *et al.*, 2020).

É descrito na literatura que compostos de selênio podem causar depleção do potencial de membrana mitocondrial via produção excessiva de EROs. Estudo conduzido por Chen e colaboradores (2008) investigou o efeito de novos selenodiazóis contra células MCF-7 e observam diminuição do  $\Delta\Psi_m$  e aumento de EROs causando morte celular via ativação de caspase. Wang e colaboradores (2020) concluíram que o efeito antitumoral de um novo derivado de imidazopiridina ocorreu através da permeabilização da membrana mitocondrial em células HeLa, com liberação de citocromo *c* levando a cascata de sinalização de apoptose via ativação de caspases. Por fim, vale ressaltar que existe uma correlação positiva entre o  $\Delta\Psi_m$  e a produção de EROs pela mitocôndria (KORSHUNOV; SKULACHEV; STARKOV, 1997). Dessa forma, é possível que o tratamento com **IP-Se-06** esteja promovendo maior produção de EROs, o que contribuiria para o aumento da disfunção mitocondrial das células tumorais, ocasionando liberação do citocromo *c* dando início à cascata de sinalização para morte celular via mitocondrial.

Na figura 30 é possível identificar condensação da cromatina e aumento dos níveis da  $\gamma$ -H2AX, indicando que o composto **IP-Se-06** é capaz de causar danos ao DNA de células A172.



Figura 30 – Efeito do composto **IP-Se-06** sobre a condensação da cromatina e conteúdo de  $\gamma$ -H2AX em células A172.



Legenda. Presença de danos ao DNA de células A172. (A) Núcleos das células por microscopia de fluorescência (100  $\mu$ m), apresentando alterações morfológicas de apoptose: condensação da cromatina nas células tratadas com **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) após 72 horas de tratamento. (B) Imunoelctroforese da proteína  $\gamma$ -H2AX após exposição ao composto **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) após o tratamento de 48 horas. (C) O gráfico em barras demonstra os níveis relativos das proteínas por análise com *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. (\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) em  $p < 0,05$ .

Observa-se na figura 30A um aumento na condensação da cromatina, evidenciado pela elevação da fluorescência das células expostas ao tratamento com **IP-Se-06**; ressaltando-se que a condensação da cromatina é um dos passos iniciais para a morte celular por apoptose. Além disso, o tratamento com o composto **IP-Se-06** aumentou de forma estatisticamente significativa os níveis da proteína  $\gamma$ -H2AX ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao controle.

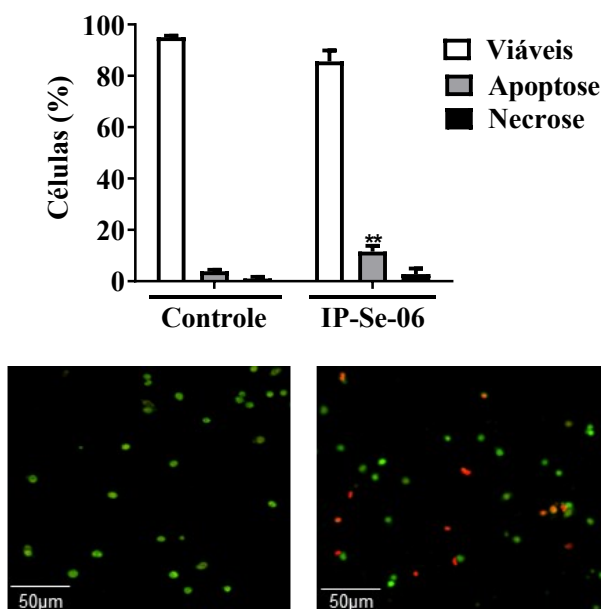
Diferentes quimioterápicos utilizados na clínica possuem como alvo molecular o DNA da célula tumoral. Pode-se citar por exemplo, os agentes alquilantes como a TMZ, que podem inibir a síntese de DNA, ou até mesmo causar inibição da topoisomerase como é o caso da doxorrubicina (ACS, 2016; PARK *et al.*, 2020; PREUSSER *et al.*, 2015).

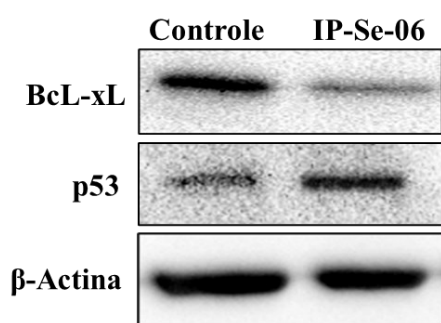
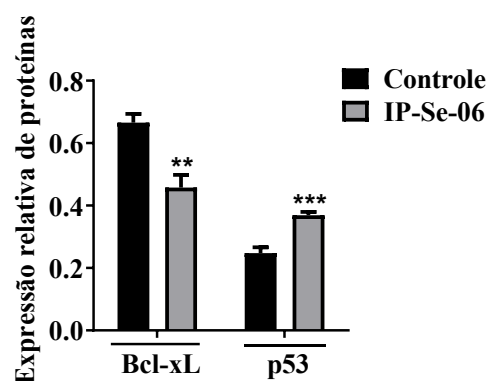
Estudos demonstram que derivados de imidazopiridinas podem causar fragmentação do DNA em diferentes células tumorais, tais como: MCF-7 (ALMEIDA *et al.*, 2018), HepG-2 (SANTOS *et al.*, 2020), A549 (EL AWADY *et al.*, 2016); entretanto, até o presente momento apenas o estudo de Guçlu e colaboradores (2018) demonstrou fragmentação do DNA por derivados de imidazopiridinas em células de glioma (LN-405). Todavia, é importante ressaltar que os valores de  $CI_{50}$  encontrados pelo grupo foram de 10  $\mu$ M e 75  $\mu$ M, valores consideravelmente maiores quando comparado ao valor apresentado pelo composto **IP-Se-06** no presente estudo. Além disso, o tipo de célula estudada também deve ser levado em consideração, pois as células A172 são resistentes ao fármaco TMZ, o que sugere grande potencial antitumoral para o composto **IP-Se-06**.

Uma vez que o aumento dos níveis de citocromo *c* e  $\gamma$ -H2AX além da diminuição do  $\Delta\Psi_m$  são indicadores de agressão ao DNA e de indução de apoptose, pode-se inferir que o composto **IP-Se-06** foi capaz de causar danos ao DNA de células A172, desta forma foi investigado o tipo de morte celular induzida pelo composto **IP-Se-06**, conforme demonstra a figura 31.

Figura 31 – Tipo de morte induzida em células A172 e conteúdo de proteínas envolvidas em sua sinalização após tratamento com **IP-Se-06**.

A



**B****C**

Legenda. Morte celular induzida por **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) em células A172. (A) Porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas expostas 72 horas ao composto **IP-Se-06**. (B) Conteúdo de Bcl-xL e p53 após o tratamento com **IP-Se-06** expostas 48 horas. (C) O gráfico em barras demonstra os níveis relativos de proteínas por análise em *Western blotting*. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *two-way* e teste de Tukey-Kramer. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. (\*\*) e (\*\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  respectivamente.

O tratamento com **IP-Se-06** resultou em um maior número de células apoptóticas quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,01$ ), além disso, não houve diferença estatisticamente significativa no número de células em processo de necrose quando comparado ao controle. Ainda, o composto **IP-Se-06** diminuiu de forma estatisticamente significativa o conteúdo de Bcl-xL ( $p < 0,01$ ) e p53 ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle.

A apoptose é dividida em dois subtipos principais: apoptose extrínseca e intrínseca. A apoptose intrínseca é iniciada pela permeabilização da membrana externa mitocondrial que após um estímulo citotóxico, libera o citocromo *c* no citosol. A liberação do citocromo *c* ativa a caspase-9, que ativa as caspases efetoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7), resultando em apoptose (YANG *et al.*, 2019). A permeabilização da membrana mitocondrial externa é intensificada por proteínas pró-apoptóticas e suprimida por proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) (BOCK e TAIT, 2020; CHIPUK *et al.*, 2012; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019). Não surpreendentemente, as células tumorais frequentemente desregulam as proteínas da família Bcl-2 como um mecanismo de sobrevivência e resistência (CAMPBELL e TAIT, 2018), por isso, é fundamental que compostos com atividade antitumoral sejam capazes de atuar na modulação de membros da família Bcl-2. Assim, um dos principais alvos considerados para a terapia alvo do câncer é a inibição da expressão dos membros dessa família, particularmente a Bcl-xL.

A proteína p53 é um supressor de tumor que induz apoptose, e sua ativação está relacionada à morte celular por fármacos quimioterápicos que induzem danos ao DNA (AUBREY *et al.*, 2018). Em GBMs primários, quase 30% dos pacientes diagnosticados possuem mutação no gene *TP53*, nos secundários essa porcentagem pode chegar a 60%, por isso, compostos capazes de aumentar o conteúdo dessa proteína podem ser considerados promissores (LIU *et al.*, 2016). É descrito na literatura que compostos organoselênios podem ativar p53 via EROs por disfunção mitocondrial (CHANG *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2020), sendo assim, é possível que a presença do selênio na estrutura do anel imidazol do composto **IP-Se-06** tenha contribuído para o aumento significativo de p53 encontrado no presente estudo.

Diferentes estudos apontam os derivados de imidazopiridinas como indutores de morte celular por apoptose. Wang e colaboradores (2020) avaliaram um derivado de imidazopiridina contra células HeLa e descreveram que o mecanismo de citotoxicidade do composto estudado foi associado a significativa diminuição dos níveis de Bcl-xL, induzindo permeabilização da membrana mitocondrial resultando em morte celular por apoptose. Por fim, corroborando com os dados obtidos, Santos e colaboradores (2020) demonstraram morte por apoptose de células HepG-2 tratadas com o composto **IP-Se-06** devido a diminuição dos níveis de Bcl-xL e aumento de p53 via EROs.

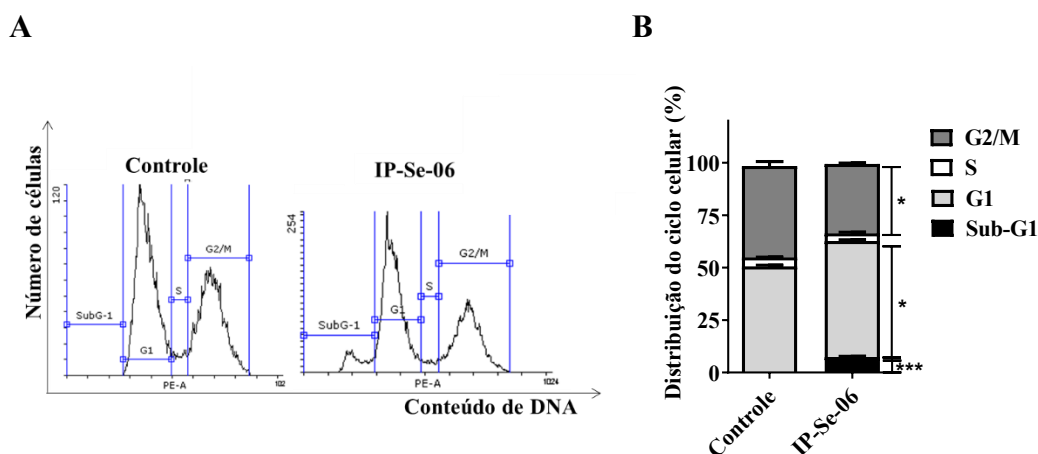
É descrito na literatura que compostos de selênio podem ocasionar morte celular por apoptose em células tumorais (CHEN *et al.*, 2020; KURŠVIETIENĖ *et al.*, 2020). Corroborando com os resultados apresentados no presente estudo, Fan e colaboradores (2017) avaliaram o efeito de selenocisteína em células de glioma humano (U251) e encontraram disfunções morfológicas mitocondriais significativas nas células expostas ao tratamento com selenocisteína, além de importante diminuição dos níveis de Bcl-xL e aumento do conteúdo de Bax, o que levou ao aumento de porosidade da membrana mitocondrial ocasionando morte celular por ativação da via intrínseca.

#### **5.2.4 Alteração nas vias de proliferação celular em células A172 expostas ao composto IP-Se-06**

O presente estudo demonstrou importante efeito citotóxico do composto **IP-Se-06** nas células A172 com  $CI_{50}$  de 1,8  $\mu$ M. Também foi observada diminuição das defesas antioxidantes das células tumorais através da redução da atividade de TrxR e dos

conteúdos de GSH e NRF2 favorecendo um ambiente oxidativo, o que pode ter contribuído para aumento da permeabilização da membrana mitocondrial levando a liberação de citocromo *c* e finalmente, morte celular por apoptose pelo aumento de p53. Contudo, estudos prévios demonstram que o composto **IP-Se-06** atua no ciclo celular e interfere na expressão de proteínas envolvidas em vias de proliferação celular (ALMEIDA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020), sendo assim, foram investigados a progressão do ciclo celular (Figura 32) assim como níveis de proteínas envolvidas em sinalizações para proliferação celular.

Figura 32 – **IP-Se-06** altera a progressão do ciclo celular em A172.



Legenda. As células A172 foram tratadas com **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) durante 72 horas. (A) Alterações no conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo celular. (B) Porcentagem de distribuição de células em diferentes fases do ciclo celular. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *two-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*) e (\*\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

O composto **IP-Se-06** elevou o número de células na fase Sub-G1 ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle. Também se observa parada do ciclo celular na fase G1 ( $p < 0,05$ ), e diminuição do número de células na fase G2/M ( $p < 0,05$ ).

O ciclo celular dos mamíferos é um processo altamente organizado e regulado que garante a duplicação do material genético e a divisão celular. Esta regulação envolve sinais reguladores de crescimento, bem como sinais de proteínas que monitoram a integridade genética para verificar a ausência de qualquer dano ao DNA. A proliferação depende da progressão através de quatro fases distintas do ciclo celular - G0/G1, S, e G2/M - que é regulado por várias CDKs que atuam em conjunto com as ciclinas. O câncer é caracterizado pela atividade aberrante do ciclo celular e isso ocorre como resultado de

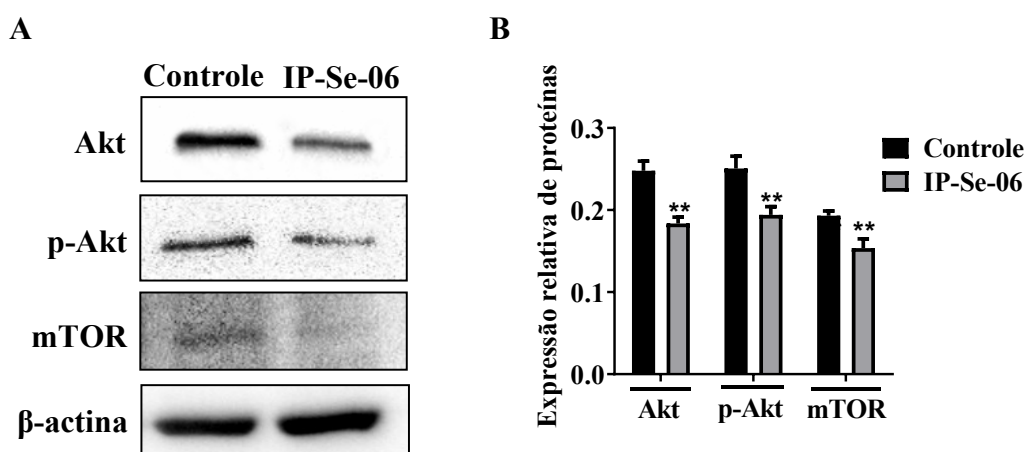
mutações nos genes que codificam proteínas envolvidas nas vias de sinalização para a proliferação celular em genes que codificam proteínas do ciclo celular (PHAN e CROUCHER, 2020). Nesse sentido, diferentes estudos apontam que a parada do ciclo celular pode ser uma estratégia promissora para o tratamento de diferentes tipos de câncer (OTTO e SICINSKI, 2017). A parada do ciclo celular vem sendo amplamente explorada para o tratamento de gliomas devido ao alto grau de proliferação deste tipo de tumor (ZHU e ZHU, 2017). Estudos com inibidores de CDK4 demonstram diminuição do crescimento tumoral em xenoinxerto de glioblastoma (FRY *et al.*, 2004; MICHAUD *et al.*, 2010). Nie e colaboradores (2020) demonstraram que o bloqueio da fase S de células de glioma contribuiu para diminuição da proliferação tumoral através da regulação negativa de CDK2.

Recentemente, alguns estudos veem demonstrando o efeito antiproliferativo de derivados de imidazopiridinas em células de gliomas. Martínez-Urbina e colaboradores (2010) sintetizaram e investigaram uma nova série de imidazopiridinas em uma variedade de células tumorais, incluindo de glioblastoma, entretanto, os melhores resultados foram obtidos com células de câncer de pulmão onde observaram parada do ciclo celular em G2/M. Margiotta e colaboradores (2014) sintetizaram e investigaram a ação de novos compostos metálicos ligados à imidazopiridinas em células de glioma de rato (C6) e de forma semelhante ao estudo de Martínez-Urbina e colaboradores (2010), detectaram parada do ciclo em G2/M. Recentemente, Guçlu e colaboradores (2018) também avaliaram os efeitos de novas imidazopiridinas contendo chumbo em sua estrutura em linhagem de glioblastoma (LN-405), e observaram resultados citotóxicos com os dois compostos mais promissores nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 75  $\mu\text{M}$ , com parada do ciclo na fase G1.

A presença do selênio na estrutura de compostos com atividade antitumoral pode potencializar efeitos sobre o ciclo celular (FAN *et al.*, 2014). No estudo de Wang e colaboradores (2016a) o tratamento de células de glioblastoma humano (U-251 e U-87) com selenocisteína induziu a parada do ciclo celular na fase S através da inibição de ciclina A, proteína esta que juntamente com a CDK2, é responsável pela progressão das células da fase S para G2/M. Santos e colaboradores (2020) também demonstraram parada do ciclo celular em G1 em células HepG-2 através da diminuição dos níveis de CDK2 após tratamento com **IP-Se-06**.

Levando em consideração a parada do ciclo celular em G1 nas células A172 expostas ao composto **IP-Se-06**, foi investigado também os níveis de proteínas envolvidas em vias de proliferação celular. Sabe-se que em glioblastomas, a sinalização promovida pela via da Akt/mTOR contribui para o fenótipo agressivo desse tipo de tumor. Assim, a figura 33 demonstra os níveis dessas proteínas após tratamento com **IP-Se-06**.

Figura 33 – Efeito do composto **IP-Se-06** no conteúdo das proteínas envolvidas na via de sinalização Akt/mTOR.



Legenda. (A) Imunoeletroforese de proteínas envolvidas na via de sinalização celular Akt/mTOR, nomeadamente Akt, p-Akt e mTOR após exposição de 48 horas pelo composto **IP-Se-06** (1  $\mu$ M). (B) O diagrama em barras demonstra os níveis relativos das proteínas por análise com *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. (\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) em  $p < 0,01$ .

O composto **IP-Se-06** diminuiu o conteúdo de Akt ( $p < 0,01$ ) o que provavelmente contribuiu para a diminuição do conteúdo de p-Akt ( $p < 0,01$ ). A sinalização a jusante da Akt está envolvida na ativação da proteína mTOR, sendo assim, a redução de Akt possivelmente contribuiu também para a diminuição do conteúdo de mTOR ( $p < 0,01$ ) observado nas células A172.

Entre as vias de sinalização mais comumente alteradas no câncer, está a de sobrevivência PI3K/Akt/mTOR (ALZHRANI, 2019; NOOROLYAI *et al.*, 2019). A rede de sinalização PI3K/ Akt/mTOR é ativada em quase 90% dos glioblastomas e apesar de sua complexidade, esta via é frequentemente considerado um alvo terapêutico promissor para o tratamento de GBMs (LIEN; DIBBLE; TOKER, 2017). Também existe a relação entre altos níveis de p-Akt e mau prognóstico para pacientes com GBMs

(SUZUKI *et al.*, 2010; XUE *et al.*, 2015). Mutações dominantes nos genes que codificam os membros da família Akt não foram identificadas até o momento em GBMs, portanto, a ativação de Akt parece ser uma consequência da amplificação do sinal de EGFR, que está presente na maioria dos GBMs. Também é possível encontrar mutações na codificação *PIK3CA* e *PIK3RI* para subunidades de PI3K em cerca de 10% de GBMs (SIGNORE *et al.*, 2014). Os outros moduladores positivos da atividade de Akt, PDK1 e mTOR, também são regulados positivamente em GBM, mas as evidências de mutações que ativam PDK1 e mTOR permanecem indefinidas.

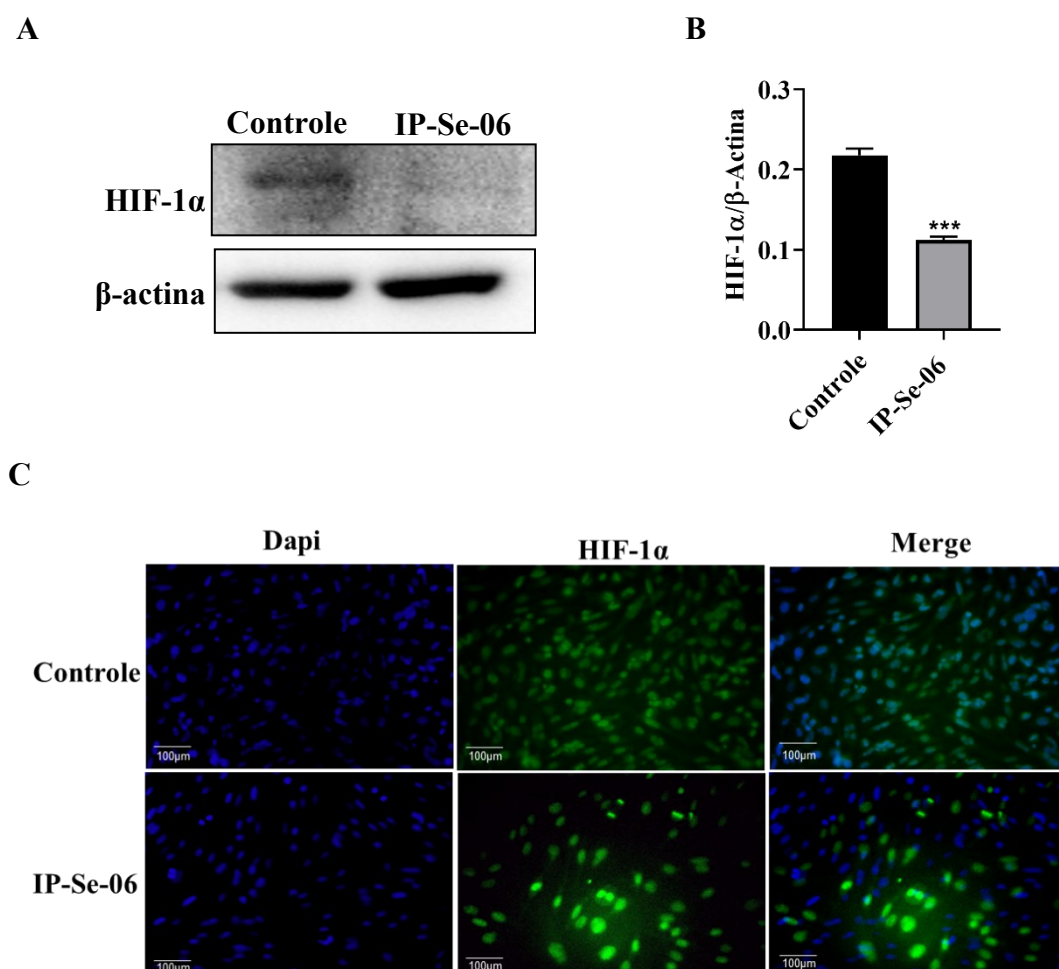
Uma vez ativa, a Akt pode levar a fosforilação de mTOR ativando-a. A mTOR ativa conduz a iniciação de síntese de diferentes proteínas de interesse (HEESOM e DENTON, 1999). Akt também ativa a cinase I $\kappa$ B para desencadear a cascata de sinalização de NF- $\kappa$ B (BAI; UENO; VOGT, 2009) e MDM2 para inibir p53 (OGAWARA *et al.*, 2002). Além disso, Akt também fosforila e inibe Bad, p27, glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) e fatores de transcrição FOXO 1 e 4 (MANNING e CANTLEY, 2017; SONG *et al.*, 2019). A inibição de Bad e p27 suprime a apoptose e promove o ciclo celular (DATTA *et al.*, 1997; SHIN *et al.*, 2002) e a inativação da fosforilação de GSK-3 por Akt desencadeia a sinalização WNT (FANG *et al.*, 2000). Por fim, FOXO1/4 pertence à família de fatores de transcrição com um domínio de ligação de DNA conservado e participa na regulação de apoptose e progressão do ciclo celular (ZHANG *et al.*, 2011).

É possível que a diminuição dos níveis de Akt/mTOR nas células A172 esteja associado a capacidade de indução EROs do composto **IP-Se-06** em células tumorais (SANTOS *et al.*, 2020). Sabe-se que o acúmulo de EROs pode estar implicado em morte seletiva de células tumorais (RAJ *et al.*, 2011), mas uma compreensão clara dos mecanismos subjacentes a esses processos ainda é incerta. A via Akt/mTOR desempenha um papel crucial na regulação da proliferação celular, sobrevivência e metabolismo (MANNING e CANTLEY, 2007). O impacto de EROs em Akt/mTOR é amplamente investigado, alguns estudos relatam à amplificação da atividade de Akt/mTOR por EROs por meio de inativação de PTEN (SHEARN *et al.*, 2011; YALCIN *et al.*, 2010), enquanto outros relatam que aumento de EROs poderia causar efeito inibitório de Akt levando a morte celular de células tumorais (LI *et al.*, 2010; MAKHOV *et al.*, 2014; OURIQUE *et al.*, 2015).



Por fim, sabendo que a sinalização de Akt é crucial para a angiogênese tumoral (WANG *et al.*, 2017), foi investigado os níveis de HIF-1 $\alpha$  em células A172 expostas ao composto **IP-Se-06** (Figura 34).

Figura 34 – Efeito do composto **IP-Se-06** sobre o conteúdo de HIF-1 $\alpha$  em células A172.



Legenda. Efeito de **IP-Se-06** sobre os níveis de HIF-1 $\alpha$  em células A172 após o tratamento de 48 horas. (A) Imunoelctroforese de HIF-1 $\alpha$  após exposição ao composto **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) em relação ao controle. (B) O diagrama em barras demonstra os níveis relativos das proteínas por análise com *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. (\*\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) em  $p < 0,001$ . (C) Imunocitoquímica de HIF-1 $\alpha$  após exposição ao composto **IP-Se-06** (1  $\mu$ M).

Conforme observado na figura 34, o composto **IP-Se-06** diminuiu o conteúdo de HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0,001$ ) em células A172. Com as imagens de fluorescência, nota-se que o HIF-1 $\alpha$  está marcado no núcleo das células quando realizada a fusão das imagens (merge), por

outro lado, as células tratadas com **IP-Se-06** demonstram marcações de HIF-1 $\alpha$  fora do núcleo.

O HIF-1 é um regulador essencial da adaptação celular à hipóxia e é frequentemente superregulado em tumores devido à hipóxia intratumoral ou ativação de vias oncogênicas (MASOUD e LI, 2015). No ambiente tumoral, o HIF-1 ativa diferentes mecanismos promotores de tumor, incluindo adaptação metabólica, angiogênese, sobrevivência celular e invasão (SINGH *et al.*, 2017). O HIF-1 é um heterodímero, que consiste em uma subunidade HIF-1 $\beta$  expressa constitutivamente e uma subunidade HIF-1 $\alpha$  indutível. Além de sua regulação tradicional via degradação proteossomal, outras vias de sinalização, como PI3K/Akt e Ras/ERK1/2, contribuem para o acúmulo de HIF-1 $\alpha$ , via regulação da estabilidade ou indução de síntese (HUANG *et al.*, 2018; ROS *et al.*, 2018).

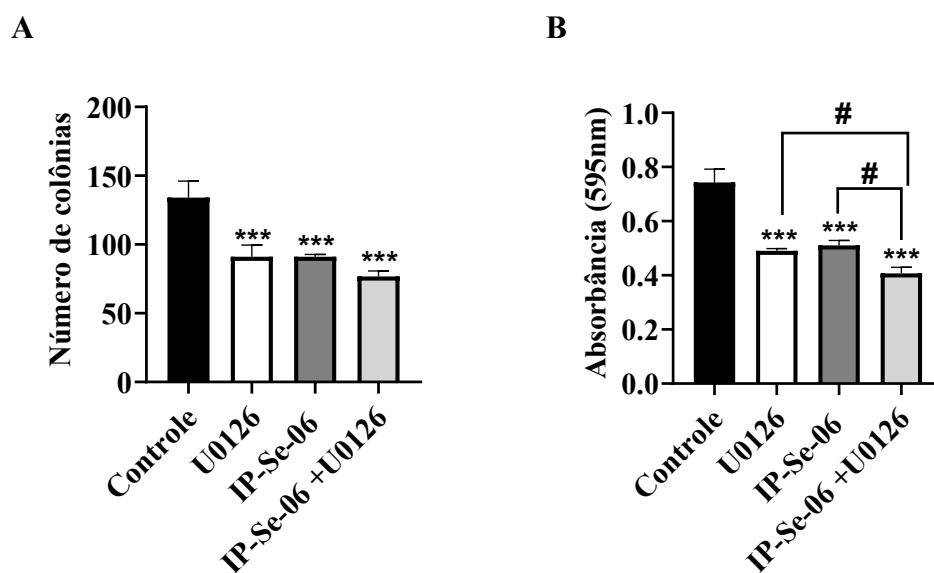
Uma das marcas registradas do GBM é a presença de regiões hipóxicas ao redor do núcleo necrótico do tumor com suprimento vascular aberrante (GAELZER *et al.*, 2017). Essa característica, torna o HIF-1 $\alpha$  frequentemente presente e ativo em GBMs (MAYER *et al.*, 2012; MAYNARD e OHH, 2007). A condição hipóxica nos GBMs ativa HIF-1 $\alpha$  e conseqüentemente VEGF, que promovem fenótipos mais agressivos com presença de angiogênese, migração e metástase (EVANS *et al.*, 2004; MELILLO, 2006). Nesse sentido, estudos apontam o HIF-1 $\alpha$  como alvo terapêutico para diminuição da malignidade de GBMs (LIM *et al.*, 2020). Askovich e colaboradores (2017) demonstraram que a ativação da via PI3K/Akt induz elevação dos níveis de HIF-1 $\alpha$ . Em contraste, os inibidores da via PI3K/Akt, como o LY294002, evitam o acúmulo de HIF-1 $\alpha$  induzido por hipóxia. A rapamicina, um inibidor de mTOR, demonstrou reduzir os níveis de HIF-1 $\alpha$  em linhagens de células tumorais de próstata humana e câncer de mama (FANG *et al.*, 2007). Sendo assim, é possível que a diminuição do conteúdo de HIF-1 $\alpha$  encontrado nas células A172 no presente trabalho esteja associado a diminuição do conteúdo de Akt e mTOR causados pelo composto **IP-Se-06**.

Até o momento, não existem estudos na literatura que apontem o efeito de derivados de imidazopiridinas nos níveis de HIF-1 $\alpha$  em células tumorais de gliomas, entretanto, é possível encontrar na literatura estudos que apontam o papel de derivados de imidazopiridinas sobre os níveis de HIF-1 $\alpha$  em diferentes linhagens de células tumorais. Li e colaboradores (2013) demonstraram o potencial antitumoral de novos

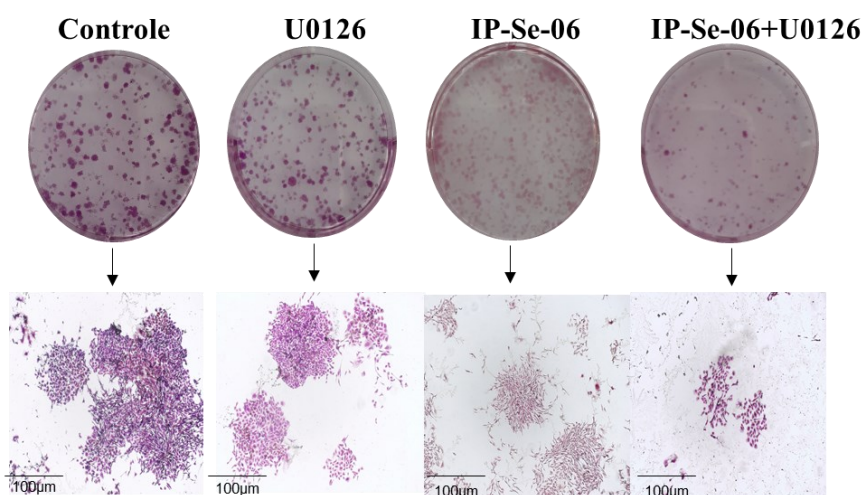
derivados de imidazopiridinas através da diminuição dos níveis de HIF-1 $\alpha$  em células de câncer de mama (TD47 e MCF-7), a partir da inibição da sinalização de Akt e mTOR. Também nesse sentido, Santos e colaboradores (2020) demonstraram diminuição do conteúdo de HIF-1 $\alpha$  em células HepG-2 expostas ao composto **IP-Se-06** a partir da diminuição dos níveis de Akt.

Com os resultados expostos até o momento, percebe-se que o composto **IP-Se-06** foi capaz de alterar a progressão do ciclo celular em células A172 ocasionando parada em G1. Além disso, o composto **IP-Se-06** foi capaz de diminuir o conteúdo de Akt e mTOR, duas importantes proteínas envolvidas na proliferação celular aberrante de células tumorais. Contudo, é importante ressaltar que a via mediada por ERK 1/2 também representa um grande obstáculo para o sucesso da terapia em GBMs, porque sua sinalização é necessária para proliferação de gliomas em diferentes graus (FANG *et al.*, 2021), além disso, a atividade da ERK também está associada à resistência ao tratamento no glioblastoma (BERBERICH *et al.*, 2019) e por isso investigações através do ensaio clonogênico e conteúdo de ERK de células A172 foram realizadas no presente estudo (Figuras 35 e 36).

Figura 35 – Efeito de **IP-Se-06** sobre a proliferação celular em células A172.



C



Legenda. Efeito antiproliferativo de **IP-Se-06** (1  $\mu\text{M}$ ) e U0126 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 72 horas. (A) Contagem do número de colônias. (B) Absorbância das colônias. (C) imagens das colônias obtidas por microscopia. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão,  $n=3$ , utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p<0,001$ . (#) indica diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos,  $p<0,05$ .

Ao analisar as colônias de células A172 tratadas com **IP-Se-06**, sugere-se importante efeito antiproliferativo. Avaliando inicialmente o número de colônias, observa-se diminuição do efeito clonogênico em todos os tratamentos propostos: **IP-Se-06** ( $p<0,001$ ), U0126 ( $p<0,001$ ) e **IP-Se-06+U0126** ( $p<0,001$ ), quando comparados ao controle; entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Quando analisado a absorbância das colônias descoradas, foram observados novamente diminuição do efeito clonogênico dos tratamentos quando comparados ao controle: **IP-Se-06** ( $p<0,001$ ), U0126 ( $p<0,001$ ) e **IP-Se-06 + U0126** ( $p<0,001$ ), todavia, foram encontradas diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos **IP-Se-06** e **IP-Se-06+U0126** ( $p<0,01$ ), assim como U0126 e **IP-Se-06+U0126** ( $p<0,01$ ). Finalmente, as imagens de microscopia demonstram que o tratamento **IP-Se-06+U0126** apresentou melhor efeito antiproliferativo, apresentando diminuição significativa no tamanho das colônias, e sugerindo um efeito sinérgico entre **IP-Se-06** e U0126.

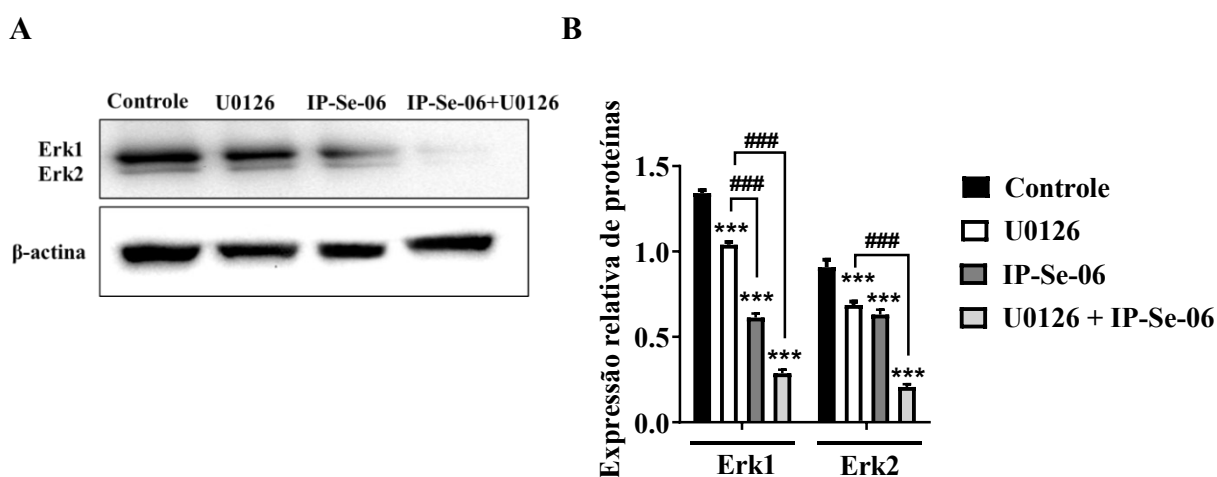
Segundo Chen e colaboradores (2014), a regulação positiva de ERK 1/2 é necessária para a proliferação de células de GBMs, por isso, foi utilizado no ensaio antiproliferativo do presente estudo, um composto inibidor de MERK/ERK, denominado U0126 a fim de comparar com os resultados obtidos pelo composto **IP-Se-06**. O efeito antiproliferativo de **IP-Se-06** foi semelhante ao inibidor U0126, entretanto, quando

utilizados em conjunto, obteve-se um resultado mais significativo, com importante redução no número de células, indicando um possível efeito sinérgico dos compostos.

Já está bem descrito na literatura o efeito antiproliferativo de derivados de imidazopiridinas em células tumorais de diferentes linhagens como MCF-7 (ALMEIDA *et al.*, 2018), T47D (KIM *et al.*, 2011), HepG-2 (SANTOS *et al.*, 2020) e HeLa (WANG *et al.*, 2020). No entanto, até o momento não há estudos na literatura que apontem o efeito antiproliferativo de derivados de imidazopiridinas em células A172. Todavia, Guçlu e colaboradores (2018) foram os primeiros autores a demonstrar efeito antiproliferativo de derivados de imidazopiridinas em uma linhagem de glioblastoma, a LN-405 com resultados satisfatórios.

Os GBMs possuem alto poder proliferativo como uma de suas características básicas, por isso, é considerado um tumor extremamente agressivo e de alto poder infiltrativo (GERBER *et al.*, 2014). A via de sinalização ERK 1/2 possui função importante na proliferação de células tumorais, incluindo GBMs (JIN *et al.*, 2018), isso porque a sinalização de ERK 1/2 atua diretamente na progressão do ciclo celular (KOLB *et al.*, 2012) e sua desregulação contribui para o desenvolvimento de gliomas. Devido aos resultados obtidos no ensaio clonogênico, foram investigados também o conteúdo de ERK 1/2 das células A172 expostas ao composto **IP-Se-06** (Figura 36).

Figura 36 – Conteúdo de ERK 1/2 em células A172 expostas ao composto **IP-Se-06**.



Legenda. (A) Conteúdo de ERK1/2 e inibidor U0126 em relação ao grupo controle após o tratamento com **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) por 48 horas. (B) O diagrama em barras demonstra os níveis relativos de proteínas por análise de *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos pela Média  $\pm$  Desvio Padrão, n=3, utilizando ANOVA *one-way* e teste de Tukey-Kramer. (\*\*\*) indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,001$ , respectivamente. (###) indica diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos,  $p < 0,001$ .

O composto **IP-Se-06** diminuiu os níveis de ERK1 ( $p < 0,001$ ) e ERK2 ( $p < 0,001$ ) respectivamente. O inibidor U0126, como esperado também, diminuiu os níveis de ERK1 ( $p < 0,001$ ) e ERK2 ( $p < 0,001$ ). Além disso, as células tratadas com **IP-Se-06**+U0126 apresentaram o menor conteúdo de ERK1 ( $p < 0,001$ ) e ERK2 ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle, corroborando com o resultado obtido no ensaio clonogênico.

Em processos carcinogênicos, a via de sinalização MAPK/ERK é frequentemente ativada, conduzindo a transformação maligna das células e o crescimento do tumor por meio da promoção do crescimento e proliferação celular e prevenção de apoptose (MAIK-RACHLINE; HACOHEN-LEV-RAN; SEGER, 2019). A ativação da sinalização de ERK está associada a mau prognóstico e é, portanto, um marcador de prognóstico negativo e alvo terapêutico do câncer (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020). A via de sinalização ERK é considerada um alvo para o tratamento de diferentes tipos de câncer. O sorafenib utilizado no tratamento de CHC, tem como alvo a proteína Ras (KANE *et al.*, 2006), trametinib para tratamento de melanoma metastático inibe a proteína MEK (FALCHOOK *et al.*, 2012), dabrafenib, vemurafenib e dabrafenib são usados para o tratamento de melanoma metastático com mutação de *B-Ras V600E* e *B-Ras V600K*, respectivamente (CHAPMAN *et al.*, 2011; HAUSCHILD *et al.*, 2012). Inibidores de MEK e ERK também vem sendo investigados em diferentes estudos clínicos (CATALANOTTI *et al.*, 2013; SULLIVAN *et al.*, 2018); entretanto, estudos apontam que talvez a forma mais efetiva de inibir proteínas cinases seja utilizando a combinação de diferentes agentes para o mesmo alvo ou para diferentes alvos na mesma via para reduzir a resistência medicamentosa (MORICEAU *et al.*, 2015).

Em gliomas malignos, a via Ras/Raf/MEK/ERK é ativada de forma aberrante (PERREAULT *et al.*, 2019). Kim e colaboradores (2009) demonstraram elevados níveis de p-ERK em gliomas de alto grau de crescimento e comportamento invasivo, em comparação com gliomas de baixo grau, por isso a via da ERK é reconhecida como importante alvo terapêutico no tratamento de GBMs (HSU *et al.*, 2019). Lopez-Gines e colaboradores (2008) sugeriram que PD98059 (inibidor da sinalização MEK/ERK) atua diminuindo a proliferação celular das células tumorais e atenua a resposta inflamatória devido a diminuição dos níveis de NF- $\kappa$ B no GBM. Hsu e colaboradores (2020) também demonstraram resultados promissores com inibição de ERK em células U87, com diminuição da proliferação devido a parada do ciclo celular por inibição de ciclina D1.

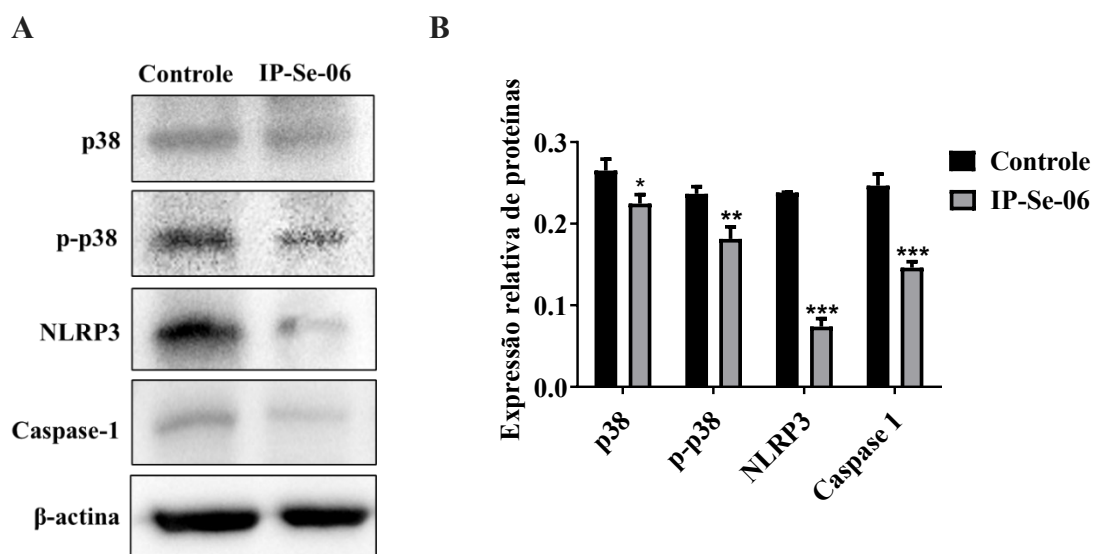
Como descrito anteriormente, é possível que imidazopiridinas estejam envolvidas na inibição de proteínas cinases; entretanto, esse mecanismo ainda precisa ser investigado. Até o momento, não há na literatura estudos que investiguem a inibição de ERK 1/2 em células A172. Todavia, o estudo de Bao e colaboradores (2009) investigou o efeito antitumoral de um novo derivado de imidazopiridina em um modelo de tumor de glioblastoma utilizando células U87 e os resultados demonstraram diminuição do tamanho do tumor com diminuição do conteúdo de Akt, Ras e ERK 1/2 em dose única de 160 mg/kg do composto.

### **5.2.5 Alteração do mecanismo de resposta inflamatória em células A172**

A conexão entre inflamação e câncer é um conceito bem estabelecido sendo considerada um dos marcadores biológicos desta doença (ZHENG e LI, 2020). O microambiente de GBMs é fortemente infiltrado por células inflamatórias que após ativação, liberam uma série de mediadores que promovem a proliferação, sobrevivência, migração e invasão das células tumorais (CHARLES *et al.*, 2011; POON *et al.*, 2017). Estes incluem citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, metaloproteinases, EROs e ERNs (GALVÃO e ZONG, 2013; HAMBARDZUMYAN *et al.*, 2016).

Sabe-se que o estresse oxidativo intracelular é capaz de modular vias de sinalização mediadas por Akt e vias sinalizadas por ERK que podem levar à apoptose de células tumorais (KRYLOVA *et al.*, 2019). Nesse sentido, pode-se sugerir que a modulação redox ocasionada por **IP-Se-06** nas células A172 foi responsável pela diminuição dos níveis de Akt e ERK. Sendo assim, sabendo que o ambiente oxidativo pode alterar a atividade de diferentes proteínas, foram investigados os níveis de p38 assim como proteínas envolvidas em sua cascata de sinalização (Figura 37).

Figura 37 – Conteúdo de proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma NLRP3.



Legenda. (A) Conteúdo de p38, p-p38, NLRP3 e caspase-1 em relação ao controle após o tratamento com **IP-Se-06** (1  $\mu$ M) por 48 horas. (B) O gráfico em barras demonstra os níveis relativos de proteínas por análise de *Western blotting*. Os dados foram normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina. (\*) (\*\*) (\*\*\*) indicam diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) com  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

O composto **IP-Se-06** diminuiu os níveis de p38 ( $p < 0,05$ ) e consequentemente, p-p38 ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao controle. Além disso, houve significativa diminuição de proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma NLRP3 ( $p < 0,001$ ) e caspase-1 ( $p < 0,001$ ).

Citocinas inflamatórias liberadas pelo microambiente tumoral de GBMs ligam-se a receptores de superfície que levam a cascata de fosforilação de p38, importante proteína cinase envolvida na resposta à inflamação e morte celular devida ao estresse (SABIO e DAVIS, 2014). Em um ambiente celular normal, a p38 é ativada em resposta a diferentes estímulos de estresse celular (KYRIAKIS e AVRUCH, 2012) levando a parada do ciclo celular (BARNUM e O'CONNELL, 2014) e ativação de p53 (KISHI *et al.*, 2001). Entretanto, é descrito na literatura que p38 possui função aberrante em diferentes tipos de câncer (WAGNER e NEBREDA, 2008), contribuindo para o microambiente inflamatório uma vez que é capaz de regular a expressão de  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  (SCHIEVEN, 2005; TALWAR *et al.*, 2017). Nesse sentido, diferentes estudos apontam a relação de elevados níveis de p38 em diferentes linhagens de GBMs e um pobre prognóstico para esse tipo de tumor (DEMUTH *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2016). Curiosamente, Yeung e



colaboradores (2012) investigaram o envolvimento de p38 na inflamação e progressão de GBMs utilizando inibidores dessa proteína e concluíram que níveis elevados de p38 é diretamente proporcional aos níveis de citocinas inflamatórias e contribuem de forma expressiva para o desenvolvimento do microambiente inflamatório tumoral.

É possível que a diminuição no conteúdo de p38 encontrada no presente estudo esteja associada a capacidade de derivados de imidazopiridinas modularem vias de proteínas cinases. Entretanto, até o momento, apenas o estudo de Bu e colaboradores (2021) avaliou os níveis de p38 após tratamento com um novo derivado de imidazopiridina em uma linhagem tumoral de linfoma onde os autores encontraram significativa diminuição dos níveis de p38 e ERK 1/2, sugerindo, que a utilização de proteínas cinases como alvo molecular para o tratamento do câncer, deve ser explorado.

O inflamassoma NLRP3 consiste na proteína NLRP3, ASC e caspase-1 (LAMKANFI e DIXIT, 2014). Após a ativação por PAMPs ou DAMPs o inflamassoma NLRP3 é montado e atua como uma plataforma para a maturação das citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$  e IL-18 (HE; HARA; NÚÑEZ, 2016). O mecanismo de ativação e a função do inflamassoma NLRP3 durante as respostas inflamatórias têm sido amplamente investigados. Estudos têm demonstrado que o inflamassoma NLRP3 pode estar associado à progressão de GBMs, contudo, esses mecanismos ainda são pouco elucidados (KENT E BLANDER, 2014; TERLIZZI *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2015). No entanto, Yin e colaboradores (2018) demonstraram uma associação positiva entre NLRP3 e graus elevados de gliomas, conforme classificação da OMS.

Sabendo que p38 é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 (KO *et al.*, 2017), é possível que a diminuição dos níveis de NLRP3 encontrados no presente trabalho esteja associado a diminuição do conteúdo de p38, também demonstrados nesse estudo. Até o momento, não há estudos na literatura científica que demonstrem o potencial efeito de derivados de imidazopiridinas ou compostos de organoselênio na regulação do complexo inflamassoma NLRP3. Entretanto, recentemente, Souza e colaboradores (2019) relataram que um composto de organoselênio exerceu efeitos protetores contra a resposta inflamatória no rim e baço de carpas gramíneas por meio da regulação negativa do inflamassoma NLRP3. Sendo assim, tanto a diminuição do conteúdo de p38 quanto a presença de selênio no composto **IP-Se-06** podem ter contribuído para a diminuição de NLRP3 e caspase-1 em células A172.

### 5.3 Parte III – Efeitos das imidazo[1,2-*a*]piridinas seleniladas *in vivo*

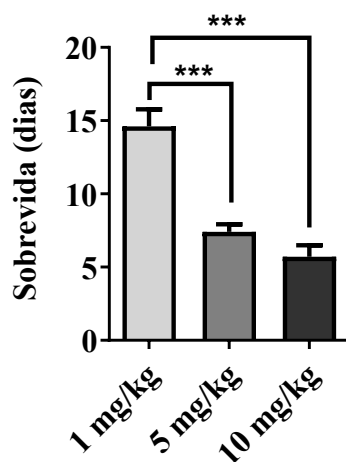
#### 5.3.1 Efeito antitumoral do composto IP-Se-06 em animais transplantados com TAE

O composto **IP-Se-06** exerceu efeito antitumoral promissor *in vitro*, demonstrando citotoxicidade e seletividade para as linhagens tumorais HepG-2 e A172. Além disso, apresentou importante efeito antiproliferativo através da inibição de ERK1/2 levando a parada do ciclo celular. Ainda, esse composto atuou inibindo proteínas relacionadas a via da PI3K/Akt/mTOR, consequentemente inibindo os produtos de sua ativação: HIF-1 $\alpha$  e GLUT-1, importantes mediadores de metástase. Somado a isso, o composto **IP-Se-06**, alterou o balanço redox das células HepG-2 e A172 aumentando os níveis intracelulares de EROs e/ou disfunção mitocondrial, além de modular as defesas antioxidantes dessas células, contribuindo para um ambiente oxidativo suficiente para causar fragmentação do DNA das células tumorais, culminando em morte celular por apoptose.

Segundo Tegaram e colaboradores (2016), compostos com potencial atividade antitumoral devem principalmente induzir a regressão do tumor por meio da inibição de vias de proliferação celular, bem como indução de morte celular por apoptose. Tendo em vista que o composto **IP-Se-06** foi capaz de alterar essas duas vias de sinalização, tornou-se necessário investigar os efeitos deste composto em modelo experimental *in vivo*.

Até o momento não existem trabalhos na literatura que relatem os efeitos antitumorais de imidazo[1,2-*a*] piridinas seleniladas *in vivo*. Por isso, inicialmente foi necessário determinar a dose efetiva do composto para o tratamento dos animais. Para tanto, foi realizado um estudo piloto para identificação da melhor dose do composto para o tratamento dos animais (Figura 38).

Figura 38 - Sobrevida de camundongos Balb-c transplantados com TAE e tratados com diferentes concentrações de **IP-Se-06**.

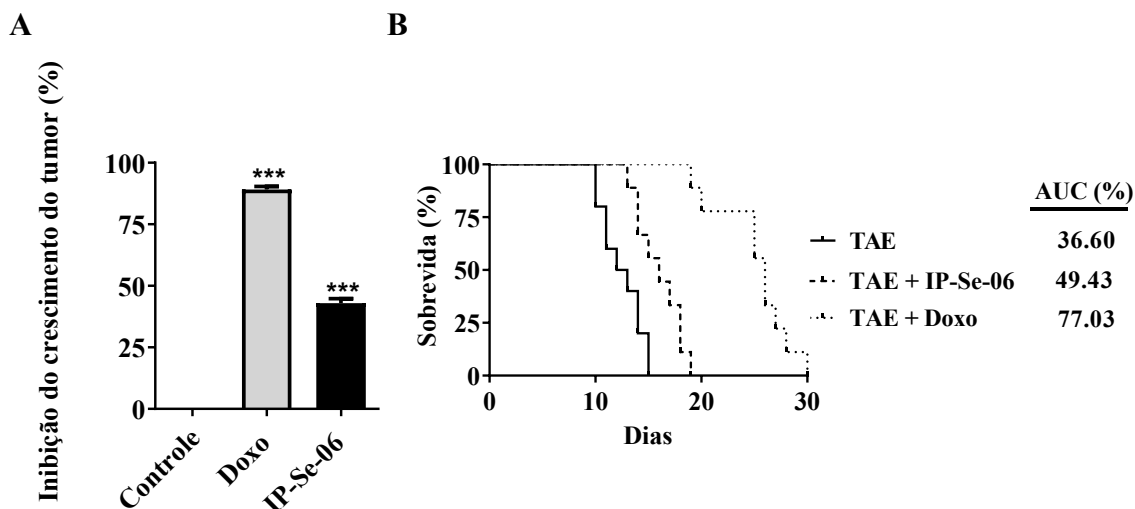


Legenda. Tempo de sobrevivência dos animais em relação à dose diária administrada do composto **IP-Se-06** em diferentes concentrações. Os valores foram expressos como Média ± Desvio, n= 10. (\*\*\*) denota diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado)  $p < 0,001$ .

Como pode-se observar o composto **IP-Se-06** na menor concentração (1 mg/kg), apresentou tempo de sobrevida maior quando comparado aos grupos com concentrações mais elevadas (5 mg/kg e 10 mg/kg). Esses dados sugerem que quanto maior a concentração do composto, menor o tempo de sobrevida dos animais, demonstrando uma possível toxicidade geral intrínseca do composto em concentrações mais elevadas.

Após a escolha da concentração de 1 mg/kg para os ensaios *in vivo*, foi investigada a inibição do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, assim como o tempo de sobrevida dos animais tratados com o composto **IP-Se-06** em comparação com animais tratados com o fármaco antitumoral padrão doxorrubicina (Figura 39).

Figura 39 - Efeito do composto **IP-Se-06** e da doxorrubicina na inibição do crescimento tumoral e sobrevida dos animais transplantados com TAE.



Legenda. Animais portadores de TAE e tratados com o composto **IP-Se-06** (1 mg/kg) e doxorrubicina (1 mg/kg). (A) Inibição do crescimento tumoral pelo composto **IP-Se-06**. (B) Taxa de sobrevivência de camundongos tratados com **IP-Se-06** e doxorrubicina. Os valores foram expressos como Média  $\pm$  Desvio padrão, n= 12. (\*\*\*) denota diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado)  $p < 0,001$ .

Os resultados obtidos indicam inibição do crescimento do tumor no grupo tratado com **IP-Se-06** (1 mg/kg) em comparação com o controle ( $p < 0,001$ ). Como era esperado, a doxorrubicina na concentração de 1 mg/kg apresentou maior inibição do crescimento tumoral (figura 39A). Ainda, foi investigado o efeito do composto **IP-Se-06** na sobrevida dos animais (figura 39B). Constatou-se que este composto aumentou a sobrevida dos animais quando comparado ao grupo controle, porém, como esperado, não foi superior ao tempo de sobrevida dos animais do grupo doxorrubicina.

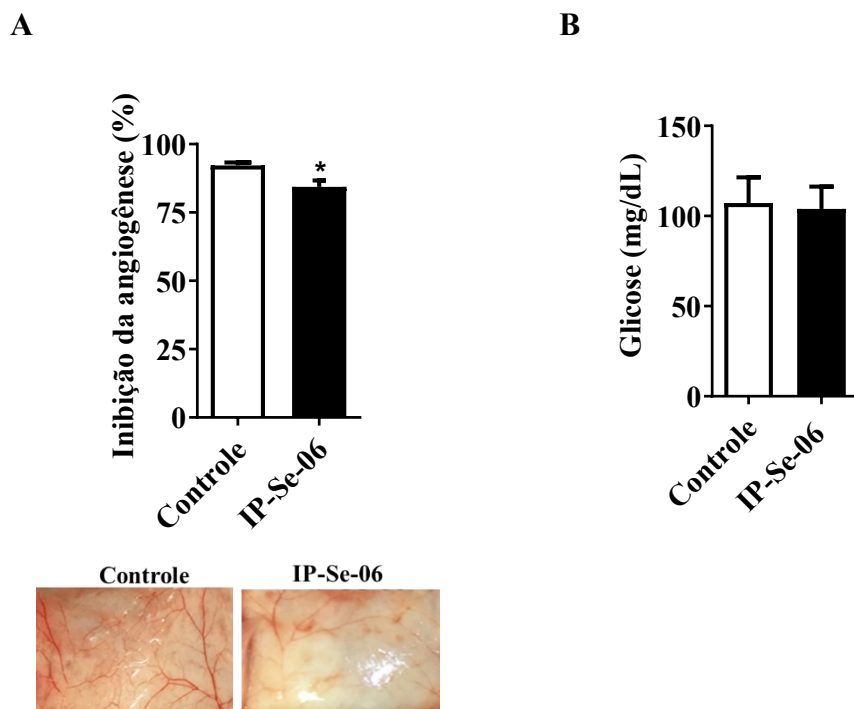
Poucos estudos relatam os efeitos *in vivo* de imidazo[1,2-*a*]piridina. Meenakshisundaram e colaboradores (2019) avaliaram a atividade antitumoral *in vivo* de derivados de imidazo[1,2-*a*]piridina em animais submetidos a um modelo de carcinoma mamário durante 14 dias de tratamento na concentração de 50 mg/kg e obtiveram resultados semelhantes ao fármaco tamoxifeno (20 mg/kg). Morigi e colaboradores (2019) também avaliaram os efeitos antitumorais de novas moléculas com o núcleo imidazol em suas estruturas e observaram redução do crescimento tumoral de células de melanoma e de câncer de mama em concentrações de 7,5 mg/kg e 15 mg/kg em camundongos C57BL/6. Nesse sentido pode-se observar que a concentração utilizada no presente estudo (1 mg/kg) é de menor valor quando comparado a outros estudos *in vivo*

com compostos com o mesmo núcleo imidazol. Esse fato pode estar associado a presença do selênio ao núcleo imidazopiridina que pode ter garantido um melhor efeito antitumoral.

O aumento do tempo de sobrevida dos animais é um dos critérios mais utilizados para avaliação de um composto com possível atividade antitumoral. O grupo dos animais tratados com o composto **IP-Se-06** apresentou uma área sob a curva maior (49,43%) que o grupo controle (36,60%), o que indica seu efeito benéfico na sobrevida dos animais. De fato, o aumento na sobrevida dos animais em geral está associado a inibição do crescimento tumoral ocasionado pelo composto **IP-Se-06**.

Visto que o composto **IP-Se-06** foi capaz de diminuir os níveis de HIF-1 $\alpha$  *in vitro*, foi investigado o efeito antiangiogênico do mesmo composto em animais implantados com TAE. Além disso, foi avaliado também a glicemia desses animais, a fim de identificar possíveis alterações nos níveis plasmáticos de glicose uma vez que os ensaios *in vitro* identificaram uma redução no conteúdo de GLUT-1 (Figura 40).

Figura 40 - Efeito do composto **IP-Se-06** na angiogênese e na glicemia de animais transplantados com TAE.



Legenda. Animais portadores de TAE e tratados com o composto **IP-Se-06** (1 mg/kg). (A) Efeito do composto **IP-Se-06** na inibição de angiogênese (B) Níveis plasmáticos de glicose dos animais comparados

do grupo controle. Os valores foram expressos como Média  $\pm$  Desvio, n=6. (\*\*\*) denota diferença estatisticamente significativa comparada ao controle (não tratado) em  $p < 0,001$ .

Os dados obtidos indicam que o composto **IP-Se-06** exerceu efeito antiangiogênico (figura 40A) quando comparado ao controle ( $p < 0,001$ ). Também é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis glicêmicos dos animais do grupo **IP-Se-06** quando comparado aos animais do grupo controle (figura 40B).

A angiogênese é um processo complexo que envolve migração de células endoteliais, proliferação e formação de tubos capilares e ocorre principalmente devido a expressão de VEGF que é um efetor a jusante do HIF-1 $\alpha$  (RAJABI e MOUSA, 2017). O HIF-1 $\alpha$  é o regulador mestre das vias de sinalização da angiogênese. Em condições de hipóxia, o HIF-1 $\alpha$  forma um heterodímero com o HIF-1 $\beta$  e é translocado para o núcleo, onde se liga ao promotor dos genes responsivos à hipóxia, como o *VEGF*. Finalmente, a ligação do VEGF em seu receptor resulta em proliferação endotelial, migração e vascularização (DEWANGAN *et al.*, 2019). É possível que a diminuição dos níveis de HIF-1 $\alpha$  devido à inibição da fosforilação da Akt ocasionada pelo composto **IP-Se-06**, conforme demonstrado *in vitro*, contribuiu para o efeito antiangiogênico encontrado no presente estudo *in vivo*, uma vez que a via da Akt contribui para a estabilização do HIF-1 $\alpha$  e este por sua vez é responsável pela transcrição de *VEGF*. Li e colaboradores (2013) avaliaram o efeito de derivados de imidazopirina em células de câncer de mama e encontraram importante redução dos níveis de HIF-1 $\alpha$  e conseqüentemente de VEGF, ao inibir a fosforilação da Akt e PI3K. Kim e colaboradores (2011) sintetizaram uma nova série de análogos de imidazo[1,2-*a*]piridinas com inibidores de PI3K/Akt em suas estruturas e avaliaram os níveis de VEGF em células de câncer de mama (T-47D). Os resultados mostraram inibição de VEGF, indicando que inibidores da via da Akt poderiam atuar inibindo o VEGF.

Por fim, a adição de selênio ao núcleo imidazol também pode ter contribuído para o efeito antiangiogênico observado no presente trabalho. Tagarim e colaboradores (2016) demonstraram que um composto de selênio inibiu a angiogênese em tumores mamários de ratos induzidos por 1-metil-1-nitroso ureia por meio da supressão da expressão de VEGF. Sendo assim, é possível sugerir que o selênio tenha agido de modo sinérgico ao imidazol potencializando o efeito antiangiogênico encontrado no presente estudo.

O composto **IP-Se-06** apesar de reduzir os níveis de Akt e GLUT-1, não alterou o perfil glicêmico dos animais. Esse resultado é de grande valia pois vários autores relatam quadros hiperglicêmicos em pacientes participantes de ensaios clínicos com compostos inibidores competitivos e não competitivos da via da Akt (JANSEN *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2015; SAURA *et al.*, 2017) o que limita a sua utilização terapêutica no combate ao câncer.

A proteína Akt possui um *cross talk* com via de sinalização da insulina. A ativação do receptor de insulina desencadeia uma cascata de fosforilação, iniciada pela autofosforilação do receptor e a ativação das proteínas substrato do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), recrutando PI3K que fosforila PIP2 a PIP3. O PIP3 ancorado na membrana ativa a Akt, contribuindo assim para a translocação do transportador do GLUT-1 (KOBAYASHI e ZOCHODNE, 2018). A Akt2 e seus efetores controlam a translocação de GLUT-4 estimulada por insulina para a membrana plasmática. Akt2 é altamente expressa em tecidos responsivos à insulina e também em tecidos tumorais, é um importante regulador do metabolismo da glicose e sua deleção resulta em resistência à insulina, hiperinsulinemia e intolerância à glicose (CHO *et al.*, 2001).

Foram descobertos diferentes compostos inibidores da Akt em modelos *in vitro* e *in vivo*, mas apenas um pequeno número foi submetido a avaliação clínica devido à presença de quadros de hiperglicemia (MUNDI *et al.*, 2016). GSK690693 foi o primeiro inibidor de Akt avaliado clinicamente. Em experimentos pré-clínicos demonstrou inibir as três isoformas da Akt em concentrações nanomolares e inibir significativamente o crescimento de diferentes tumores em modelos *in vivo*. Apesar dos dados pré-clínicos encorajadores, o desenvolvimento clínico do agente foi interrompido devido à hiperglicemia relacionada ao medicamento e resistência periférica à insulina (MATTMAN *et al.*, 2011; PAL *et al.*, 2010).

Outro conhecido inibidor é o AZD5363, um derivado de pirrolopirimidina que inibe todas as isoformas de Akt com afinidade nanomolar e inibe a proliferação de um grande número de linhagens celulares tumorais sólidas e hematológicas, apresentando maior potencial terapêutico em células de câncer de mama (DAVIES *et al.*, 2012). A segurança e tolerabilidade do AZD5363 como monoterapia oral foi avaliada em 90 pacientes com malignidades sólidas avançadas. Porém, os efeitos adversos relatados com mais frequência em todos os esquemas de dosagem foram: diarreia, náuseas, vômitos e

hiperglicemia (BANERJI *et al.*, 2018). O ipatasertib pertence à classe de anéis fundidos de 6-5 heterocíclicos de inibidores competitivos de Akt. Em um estudo de fase I, a segurança e tolerabilidade em pacientes com tumores sólidos foram avaliadas após a administração oral em doses diárias de 25 a 800 mg/kg e, apesar da boa tolerância ao ipatasertib, também foram encontrados nos pacientes quadros hiperglicêmicos (SAURA *et al.*, 2017).

Sendo assim, devido a alterações no perfil glicêmico causados por inibidores da Akt, é de extrema valia o resultado obtido no presente estudo, pois apesar da diminuição dos níveis da Akt e GLUT-1 apresentado pelo composto **IP-Se-06** *in vitro*, este não exerceu efeitos nos níveis de glicose plasmática dos animais.

#### 5.4 Parte IV – Predições dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos do IP-Se-06

##### 5.4.1. Estudos *in silico* com IP-Se-06

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o composto **IP-Se-06** teve o melhor desempenho quanto a atividade antitumoral, tanto para células HepG-2 quanto para células A172, além de importante atividade antitumoral *in vivo* (inibição do crescimento tumoral, elevação da sobrevida e efeito antiangiogênico). Nesse sentido foram realizados ensaios preliminares *in silico* utilizando duas plataformas de bioinformática a SwissADME e ADMETlab, e os resultados obtidos estão representados na tabela 4.

Tabela 4 - Predição das propriedades ADMET para o composto **IP-Se-06**

Propriedades físico-químicas		Semelhança ao fármaco	
Peso molecular (g/mol)	394,06	Lipinski	Sim
Nº de ligações rotacionáveis	4	Ghose	Sim
Nº de aceptores para ligação de H	2 (3)	Veber	Sim
Nº de doadores para ligação de H	0	Egan	Sim
TPSA <sup>1</sup> (Å <sup>2</sup> )	26,53	Muegge	1
		Golden Triangle	Aceito



<b>Lipofilicidade Log P</b>			
iLOGP	0,0	Score de biodisponibilidade	0.55
XLOGP3	5,42		
<b>Quimica Medicinal</b>			
WLOGP	2,97	Alerta PAINS	0
MLOGP	3,37	Alerta Brenk	1
SILICOS-IT	3,52	Semelhança a fármaco	0.499
Consenso	3,06	Acessibilidade sintética	2.733
LogP	5,07		
<b>Toxicidade (%)</b>			
<b>Farmacocinética (probabilidade)</b>		AMES <sup>5</sup>	Cat. 1 (0,75)
Absorção GI <sup>2</sup>	Sim (0,813)	Sensibilidade da pele	Cat. 0 (0,08)
Permeabilidade BHE <sup>3</sup>	Sim (0,917)	DILI <sup>6</sup>	Cat. 1 (0,78)
Inibidor de P-gp <sup>4</sup>	Sim (0,701)	FDAMDD <sup>7</sup>	Cat.0 (0,46)
Substrato de P-gp <sup>4</sup>	Não (0,108)		
Inibidor CYP1A2	Não (0,848)		
Substrato CYP1A2	Sim (0,575)		
Inibidor CYP2C9	Sim (0,683)		
Substrato CYP2C9	Não (0,493)		
Inibidor CYP2C19	Sim (0,837)		
Substrato CYP2C19	Sim (0,579)		
Inibidor CYP2D6	Sim (0,536)		
Substrato CYP2D6	Sim (0,556)		
Inibidor CYP3A4	Sim (0,475)		

---

<sup>1</sup>Área de superfície polar; <sup>2</sup>Gastrointestinal; <sup>3</sup>Barreira hematoencefálica; <sup>4</sup>Glicoproteína-P; <sup>5</sup>Mutagenicidade; <sup>6</sup>Dano hepático induzido por fármaco; <sup>7</sup>Dose diária máxima recomendada.

---

A predição das propriedades farmacocinéticas tem tido um papel central nas fases iniciais da descoberta de novos medicamentos (FERREIRA e ANDRICOPULO, 2019), uma vez que esta pode prever com um certo grau exatidão (aproximadamente 60%) vários parâmetros cinéticos e físico-químicos de novos compostos, tendo como base bancos de estruturas químicas depositadas cujos parâmetros já são estão caracterizadas na literatura científica. Modelos *in silico* para prever o perfil de ADMET (Adsorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) de compostos devem ser incorporados ao desenvolvimento de fármacos para reduzir falhas devido à fraca farmacocinética e toxicidade (GHOSH *et al.*, 2016).

Quanto a lipofilicidade nota-se que **IP-Se-06** possui características predominantemente hidrofóbicas pois apresentou  $\log P > 5$ . Segundo Tsopelas e colaboradores (2017) a lipofilicidade é considerada característica crucial para ação e segurança de novos fármacos, sendo essa uma importante propriedade que permite aos compostos atravessarem membranas biológicas. Nesse sentido, pode-se relacionar a lipofilicidade de **IP-Se-06** com suas propriedades farmacocinéticas. Percebe-se que **IP-Se-06** pode ultrapassar o epitélio intestinal e também a barreira hematoencefálica. Sabe-se que as células endoteliais especializadas da barreira hematoencefálica possuem junções que restringem severamente a permeabilidade celular aos compostos químicos (DA ROS *et al.*, 2018). Portanto, o transporte de moléculas é dificultado e apenas alguns compostos podem chegar ao tecido cerebral. Esta é uma das principais razões pelas quais vários compostos biologicamente promissores mostram eficácia *in vitro* e falham em mostrar atividade *in vivo* (ISLAM, 2020). Sendo assim, tendo em vista a capacidade de **IP-Se-06** em ultrapassar a barreira hematoencefálica somado aos resultados obtidos com células de glioblastoma apresentados no presente estudo, é possível prever que **IP-Se-06** possa vir a ser uma molécula líder para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

Ainda, a tabela 4 demonstra que **IP-Se-06** possui propriedades para atuar como inibidor de glicoproteína-P. A glicoproteína-P é uma bomba de efluxo de moléculas e tem sido amplamente estudada por sua associação com a resistência múltiplas a fármacos

MDR (*Multi Drug Resistance*) devido a sua superexpressão em células tumorais (WAGHRAY e ZHANG, 2018). Por isso, a inibição de glicoproteína-P por **IP-Se-06** pode representar uma estratégia conveniente, principalmente para tumores resistentes a quimioterapia e com superexpressão de glicoproteína-P como ocorre por exemplo, no carcinoma hepatocelular (LI *et al.*, 2018). Por outro lado, a glicoproteína-P também pode representar um obstáculo para o tratamento de glioblastoma, pois por exemplo o fármaco TMZ serve como substrato da glicoproteína-P, o que dificulta sua entrada no sistema nervoso central (GOLDWIRT *et al.*, 2014).

Adicionalmente, **IP-Se-06** é capaz de modular diferentes isoformas de enzimas da família P450, atuando como inibidor de CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 e substrato de CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4. De maneira geral, a inibição das enzimas da família CYP envolve a competição com outra molécula pelo sítio ativo da enzima (MANIKANDAN e NAGINI, 2018). Dessa forma, é importante ressaltar que a inibição das isoformas de CYP podem prejudicar a biotransformação ou eliminação completa de fármacos, entretanto, esse fato não exclui definitivamente **IP-Se-06** de tornar-se um composto líder, uma vez que, modificações estruturais que visem alterações em parâmetros farmacocinéticos como biotransformação pelas enzimas da família P450 poderiam contribuir de forma significativa para resultados mais promissores no futuro.

Quanto as características de semelhança ao fármaco, o SwissADME adota 5 critérios (Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge), cada um com regras próprias, que servem como indicador de comparações com fármacos em relação a biodisponibilidade oral. Conforme mostrado na tabela 4 o SwissADME indicou apenas uma violação para o composto **IP-Se-06** quanto ao critério Muegge que define o valor ideal de  $\text{LogP} \leq 5$  enquanto que **IP-Se-06** apresentou  $\text{LogP}$  5,07. Adicionalmente, na categoria química medicinal foram detectadas apenas violação para alerta Brenk devido à presença do selênio na estrutura de **IP-Se-06**

Finalmente, utilizando o ADMETLab 2.0 foi possível verificar o potencial de toxicidade de **IP-Se-06**. Dentre os indicadores utilizados pela base de dados, foram avaliados sensibilidade para pele (sem violação, categoria 0), alerta estrutural de dor (sem violação, categoria 0), alerta Ames que avalia o potencial de mutagenicidade (categoria 1; probabilidade 0,754) e hepatotoxicidade (categoria 1; probabilidade 0,788). De fato, os resultados preditivos de toxicidade calculados pelo ADMETLab 2.0 são similares aos

observados por Santos e colaboradores (2020), onde foi possível investigar o efeito antitumoral *in vivo* de **IP-Se-06** em modelo de tumor ascítico de Ehrlich, pois os autores observaram melhor tempo de sobrevivência dos animais à medida que a concentração de composto (mg/kg) administrada foi diminuída, podendo este, ser um indicador de toxicidade em doses mais elevadas. Assim, melhorias estruturais a partir de **IP-Se-06** são fortemente encorajadas para que possam impactar positivamente os parâmetros de farmacocinética e toxicidade calculados pelo ADMETLab.

Os resultados apresentados no presente trabalho foram publicados parcialmente no periódico *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* e compreende os resultados obtidos com a linhagem celular HepG-2 e ensaios *in vivo* utilizando o protocolo experimental de tumor de Ehrlich (Anexo I). A segunda fase do estudo foi aceita para publicação no periódico *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, e contempla os resultados obtidos com a linhagem celular A172 e predições de parâmetros físico-químicos calculados pelo SwissADME e ADMETlab (Anexo II).

## 6. CONCLUSÕES

A atividade antitumoral de dez compostos derivados de Imidazo[1,2-*a*]piridina seleniladas foram testadas para linhagem de carcinoma hepatocelular, glioblastoma e tumor ascítico de Ehrlich. Dentre os compostos testados, **IP-Se-06** teve papel de destaque devido seu promissor desempenho em diferentes vias envolvidas na patogênese tumoral como:

- Alteração de defesas antioxidantes com diminuição da atividade da TrxR; e conteúdo de GSH, além da elevação dos níveis de EROs intracelular;
- Dano ao DNA das células tumorais;
- Indução de morte celular por apoptose via aumento do conteúdo de p53 e diminuição de Bcl-xL;
- Parada do ciclo celular na fase G1 e efeito antiproliferativo;
- Diminuição expressiva do conteúdo da proteína Akt e p-Akt em células HepG-2 culminando na diminuição de GLUT-1 e HIF-1 $\alpha$ . A mesma observação foi constatada em células A172, entretanto, de forma menos efetiva quando comparado ao resultado obtido em HepG-2;
- Diminuição do conteúdo de ERK 1/2;
- Alteração nos conteúdos de proteínas envolvidas no complexo do inflamassoma NLRP3: p38, p-p38, NLRP3 e caspase 1 em células A172;
- Elevação do tempo de sobrevivência, diminuição do crescimento tumoral e diminuição de angiogênese em animais transplantados com o TAE

Por fim, os estudos *in silico* demonstraram que o composto **IP-Se-06** pode sofrer absorção gastrointestinal, tem permeabilidade pela barreira hematoencefálica, toxicidade aceitável, porém com violações para os critérios de hepatotoxicidade e mutagenicidade, sugerindo a necessidade de alterações estruturais de **IP-Se-06**.

## 7. PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito inibitório de **IP-Se-06** sobre o conteúdo da proteína Akt a nível gênico;
- Investigar o efeito de **IP-Se-06** sobre o conteúdo de PI3K;
- Investigar o efeito de **IP-Se-06** sobre receptores de membrana (tirosina cinase);
- Investigar o efeito de **IP-Se-06** sobre o conteúdo de VEGF;
- Investigar o efeito de **IP-Se-06** sobre parâmetros inflamatórios (COX2, NFkB, TNF- $\alpha$  e Interleucinas);
- Aprofundar o estudo do efeito de **IP-Se-06** sobre o complexo do inflamassoma NLRP3;

## 8. ANEXOS

### Artigo 1 – Publicado no periódico *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*



Received: 13 September 2020 | Revised: 15 October 2020 | Accepted: 20 October 2020  
DOI: 10.1002/jbmt.22663

WILEY

## Apoptosis oxidative damage-mediated and antiproliferative effect of selenylated imidazo[1,2-*a*]pyridines on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and in vivo

Daniela Coelho dos Santos<sup>1</sup> | Jamal Rafique<sup>2</sup> | Sumbal Saba<sup>3</sup> |  
Gabriela M. Almeida<sup>1</sup> | Tâmara Siminski<sup>1</sup> | Cynthia Pádua<sup>1</sup> |  
Danilo W. Filho<sup>4</sup> | Ariane Zamoner<sup>5</sup> | Antonio L. Braga<sup>6</sup> |  
Rozângela C. Pedrosa<sup>1</sup> | Fabiana Ourique<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Química, Instituto de Química (IQ/U), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Química Orgânica, Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Ecologia e Zoologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica e Situação Celular (LABIOGEC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>6</sup>Departamento de Química, Laboratório de Síntese de Substâncias de Selênio Bioativas (LabiSe), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

**Correspondence:** Fabiana Ourique,  
Universidade Federal de Santa Catarina, CEP,  
Florianópolis, Santa Catarina 88040-900,  
Brazil.  
Email: fabiana.ourique@posgrad.ufsc.br  
or ouriquefabiana@gmail.com

#### Funding information


Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 303224/2015-4, 3052-97/2016-3, 433894/2018-3; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 001; CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

#### Abstract

Imidazo[1,2-*a*]pyridines (IP) and organoselenium compounds have been widely exploited in medicinal chemistry due to their pharmacological activities. Hepatocellular carcinoma (HCC) has few treatment options, and unfortunately, the prognosis is poor. Thus, the development of novel therapeutic drugs is urgent. The present study aimed at evaluating the antitumor mechanism of selenylated IP against HepG2 cells and in vivo. The selenylated IP named IP-Se-06 (3-[(2-methoxyphenyl)ethyl]-7-methyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyridine) showed high cytotoxicity against HepG2 cells (half-maximal inhibitory concentration [IC<sub>50</sub>] = 0.03 μM) and selectivity for this tumor cell line. At nontoxic concentration, IP-Se-06 decreased the protein levels of Bcl-xL and increased the levels of p53, leading to inhibition of cell proliferation and apoptosis. This compound decreased the level of extracellular signal-regulated kinase 1/2 protein and changed the levels of proteins involved in the drive of the cell cycle, tumor growth, and survival (cyclin B1, cyclin-dependent kinase 2). In addition, IP-Se-06 decreased the number of cells in the S phase. In addition, IP-Se-06 led to increased generation of reactive oxygen species, changed antioxidant defenses, and caused DNA fragmentation. Finally, IP-Se-06 significantly inhibited the growth of Ehrlich ascites tumors in mice, increased

## Artigo 2 – Submetido ao periódico *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*

**Your manuscript has been accepted for publication**

De **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**   
Para **fabiana.ourique@uff.edu.br**   
Data **Hoje 07:30**

Dear Dr. Ourique,

I am delighted to inform you that the review of your Research Article 3710449 titled IP-Se-06, a selenylated imidazo[1,2-a]pyridine, modulates intracellular redox state and causes Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  and MAPKs signaling inhibition promoting antiproliferative effect and apoptosis in glioblastoma cells has been completed and your article has been accepted for publication in *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Please visit the manuscript details page to review the editorial notes and any comments from external reviewers. If you have deposited your manuscript on a preprint server, now would be a good time to update it with the accepted version. If you have not deposited your manuscript on a preprint server, you are free to do so.

We will now check that all of your files are complete before passing them over to our production team for processing. We will let you know soon should we require any further information.

As an open access journal, publication of articles in *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* are associated with Article Processing Charges. If applicable, you will receive a separate communication from our Editorial office in relation to this shortly. In regards to payments, we will:



## 9. REFERÊNCIAS

- ANCEY, P.B.; CONTAT, C.; MEYLAN, E. Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. **FEBS J.** v. 285, p. 2926-2943, 2018.
- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene.** v. 26, p.1324-1337, 2007.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** v. 105: p. 121-6, 1984
- AHMAD, F.; DIXIT, D.; SHARMA, V. et al. Nrf2-driven TERT regulates pentose phosphate pathway in glioblastoma. **Cell Death and Disease.** v.7, e2213, 2016.
- AHRONIAN, L.G.; SENNOTT, E.M.; VAN ALLEN, E.M. et al. Clinical Acquired Resistance to RAF Inhibitor Combinations in BRAF-Mutant Colorectal Cancer through MAPK Pathway Alterations. **Cancer Discov.** v.5, p.358-67, 2015.
- AKULA, S.M.; ABRAMS, S.L.; STEELMAN, L.S. et al. RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. **Expert Opin Ther Targets.** v. 23, p. 915-929, 2019.
- ALAM, M.S.; GAIDA, M.M.; BERGMANN, F. et al. Selective inhibition of the p38 alternative activation pathway in infiltrating T cells inhibits pancreatic cancer progression. **Nat Med.** v. 21, p. 1337-43, 2015.
- ALBANESE, C.; JOHNSON, J. WATANABE, G. et al. Transforming p21 ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. **Journal of Biological Chemistry.** v. 270, p. 23589-23597, 1995.
- ALBERTS, B et al. **Biologia molecular da célula.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed 2010.
- ALBERTS, B., et al. **Biologia Molecular da Célula.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALCOLEA, V; PLANO, D.; KARELIA, D.N. 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.
- ALIWAINI, S.; AWADALLAH, A.M.; MORJAN, R.Y. et al. Novel imidazo[1,2-*a*]pyridine inhibits AKT/mTOR pathway and induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma and cervical cancer cells. **Oncology Letters.** v.18, p. 830-837, 2019.
- ALMEIDA, G.M.; RAFIQUE, J.; SABA, S. et al. Novel selenylated imidazo[1,2-*a*]pyridines for breast cancer chemotherapy: Inhibition of cell proliferation by Akt-mediated regulation, DNA cleavage and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 503, p. 1291-1297, 2018.

ALTEKRUSE, S.F.; HENLEY, S.J.; CUCINELLI, J.E. et al. Changing hepatocellular carcinoma incidence and liver cancer mortality rates in the United States. **American Journal of Gastroenterology** v.109, p. 542-553, 2014.

ALZHRANI, A.S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. **Semin Cancer Biol.** v.59, p. 125-132, 2019.

AMBROSETTI, D.; DUFIES, M.; DADONE, B. et al. The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma. **PLoS One.** v. 13, (2):e0193477, 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019.** Atlanta: American Cancer Society, 2019.

ARAMBULA, J.F.; MCCALL, R.; SIDORAN, K.J. et al. Targeting Antioxidant Pathways with Ferrocenylated *N*-Heterocyclic Carbene Supported Gold(I) Complexes in A549 Lung Cancer Cells. **Chemical Science.** v.7, p.1245-1256, 2016.

ARNÉR, E.S.; ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods Enzymol.** v. 300, p. 226-39, 1999

ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 109, p. 314-341, 2016.

ASKOVICH, P.S.; RAMSEY, S.A.; DIERCKS, A.H. et al. Identifying novel transcription factors involved in the inflammatory response by using binding site motif scanning in genomic regions defined by histone acetylation. **PLoS One.** v.12(9):e0184850, 2017.

AUBREY, B.J.; KELLY, G.L.; JANIC, A. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? **Cell Death Differ.** v.25, p. 104-113, 2018.

BADISA, R.B.; DARLING-REED, S.F.; JOSEPH, P. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research.** v. 29, p. 2993-6, 2009.

BAGDI, A. K.; SANTRA, S.; MONIR, K. et al. Synthesis of imidazo[1,2-*a*]pyridines: a decade update. **Chemical Communication,** v. 51, p. 1555–1575, 2015.

BAHARUDIN, R. TIENG, F.Y.F.; LE, R.L et al. Epigenetics of SFRP1: the dual roles in human cancers. **Cancers.** v. 12, p. 445, 2020.

BAI, D.; UENO, L.; VOGT, P.K. Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. **Int J Cancer.** v. 125, p. 2863-70, 2009.

BALAMURUGAN, K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. **International Journal of Cancer.** v. 138, p.1058-1066, 2016.

BALOGH, J.; VICTOR, D.; ASHAM, E.H. et al. Hepatocellular carcinoma: a review. **J Hepatocell Carcinoma**. v.3, p. 41-53, 2016.

BALOGUN, E.; HOQUE, M.; GONG, P. et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochem J**. v. 371, p. 887-95, 2003.

BANERJI, U.; DEAN, E.J.; PÉREZ-FIDALGO, J.A. et al. A Phase I Open-Label Study to Identify a Dosing Regimen of the Pan-AKT Inhibitor AZD5363 for Evaluation in Solid Tumors and in *PIK3CA*-Mutated Breast and Gynecologic Cancers. **Clinical Cancer Research**. v. 24, p. 2050-2059, 2018.

BANSAL, A.; SIMON, M.C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. **J Cell Biol**. v. 217, p. 2291-2298, 2018.

BAO, P.; CHEN, Z.; TAI, R.Z. et al. Selenite-induced toxicity in cancer cells is mediated by metabolic generation of endogenous selenium nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 14, p. 1127-1136, 2015.

BAO, R.; LAI, C.J.; QU, H. et al. CUDC-305, a novel synthetic HSP90 inhibitor with unique pharmacologic properties for cancer therapy. **Clinical Cancer Research**. v.15, p. 4046-4057, 2009.

BARAKAT, A.; ISLAM, M.S.; GHAWAS, H.M, et al. Design and synthesis of new substituted spirooxindoles as potential inhibitors of the MDM2-p53 interaction. **Bioorganic Chemistry**. v. 86, p. 598-608, 2019.

BARBOSA, F.A.R.; SIMINSKI, T.; CANTO, F.S. R et al. Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.155, p. 503-515, 2018.

BARLEV, N.A.; LIU, L.; CHEHAB, N.H. et al. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. **Molecular Cell**. v. 8, p. 1243–1254, 2001.

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

BASU, A.; BHATTACHARJEE, A.; BARAL, R. et al. Vanadium(III)-l-cysteine enhances the sensitivity of murine breast adenocarcinoma cells to cyclophosphamide by promoting apoptosis and blocking angiogenesis. **Tumor Biology**. v.39(5):1010428317705759, 2017.

BASU, A.K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **Int J Mol Sci**. v.19, p.970, 2018.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2010.

BEHL, C.; ZIEGLER, C. Cell Cycle: The Life Cycle of a Cell. In: (Ed.). **Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p.9-19, 2014.

BERBERICH, A.; SCHMITT, L.M.; PUSCH, S. et al. cMyc and ERK activity are associated with resistance to ALK inhibitory treatment in glioblastoma. **J Neurooncol.** v. 146, p. 9-23, 2020.

BERTOUT J.A.; PATEL S.A.; SIMON M.C. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. **Nature Review Cancer.** v.8, p. 967-975, 2008.

BENASSI, J.C.; BARBOSA, F.A.R.; GRINEVICIUS, V.M.A.S. et al. Novel Dihydropyrimidinone-Derived Selenoesters as Potential Cytotoxic Agents to Human Hepatocellular Carcinoma: Molecular Docking and DNA Fragmentation. **Anticancer Agents Med Chem.** v. 21, p. 703-715, 2020.

BENASSI, J.C.; BARBOSA, F.A.R.; CANDIOTTO, G. et al. Docking and molecular dynamics predicted B-DNA and dihydropyrimidinone selenoesters interactions elucidating antiproliferative effects on breast adenocarcinoma cells. **J Biomol Struct Dyn.** v. 13, p. 1-14, 2021.

BERNSTEIN, K.A et al. The Shu complex regulates Rad52 localization during rDNA repair. **DNA Repair (Amst).** v. 12, p. 786-90, 2013.

BHATT, S.; PIOSO, M.S.; OLESINSKI, E.A. et al. Reduced Mitochondrial Apoptotic Priming Drives Resistance to BH3 Mimetics in Acute Myeloid Leukemia. **Cancer Cell.** v. 38, p. 872-890.e6, 2020.

BIDKAR, A.P.; SANPUI, P. GHOSH S.S. Efficient induction of apoptosis in cancer cells by paclitaxel-loaded selenium nanoparticles. **Nanomedicine (Lond).** v.12, p. 2641-2651, 2017.

BIEGING, K.T; MELLO, S.S.; ATTARDI LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nat Rev Cancer.** v. 4, p. 359-70, 2014.

BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. **Antioxidants & Redox Signaling.** v. 18, p. 1557–1593, 2013.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESSEN, C. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal.** v. 5, p. 9-19, 2012.

BLAKE, J.F.; BURKARD, M.; CHAN, J. et al. Discovery of (S)-1-(1-(4-Chloro-3-fluorophenyl)-2-hydroxyethyl)-4-(2-((1-methyl-1H-pyrazol-5-yl)amino)pyrimidin-4-yl)pyridin-2(1H)-one (GDC-0994), an Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) Inhibitor in Early Clinical Development. **J Med Chem.** v. 59, p. 5650-60, 2016.

BOCK, F.J.; TAIT, S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 21, p. 85-100, 2020.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**. v. 39, p. 615-647, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. v. 72, p. 248-54, 1976

BRANDES, R.P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. et al. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. **Radical Free Biology and Medicine**. v. 76, p. 208–226, 2014.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken**, v. 68, p. 394-424, 2018.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, p. 3289–303, 2013.

BROZMANOVÁ, J.; MÁNIKOVÁ, D.; VLČKOVÁ, V. et al. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 919-938, 2010.

BRYAN, H.K.; OLAYANJU, A.; GOLDRING, C.E. et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. **Biochemical Pharmacology**. v. 85, p. 705-717, 2013.

BU, H.; YUAN, X.; WU, H. et al. Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridazine derivatives containing isoquinoline group as potent MNK1/2 inhibitors. **Bioorg Med Chem**. v. 40:116186, 2021.

CAMPBELL, K.J.; TAIT, S.W.G. Visando a apoptose regulada por Bcl-2 no câncer. **Open Biol**. v.8:180002, 2018.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**. v. 113, p. 484-90, 1985

CANOVAS, B.; NEBREDA, A.R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v. 22, p. 346-366, 2021.

CANTOR, J. R.; SABATINI, D. M. Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces. **Cancer Discovery**. v. 2, p. 881–898, 2012.

CARGNELLO, M.; ROUX, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.75, p. 50-83, 2011.

CARLINO, M.S.; TODD, J.R.; GOWRISHANKAR, K. et al. Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma. **Mol Oncol**. v. 8, p. 544-54, 2014.

CARNERO, A.; BLANCO-APARICIO, C.; RENNER, O. et al. The PTEN/PI3K/Akt signalling pathway in cancer, therapeutic implications. **Current Cancer Drug Targets.** v.8, p.187-198, 2008.

CARNEIRO, B.A.; EL-DEIRY, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nat Rev Clin Oncol.** v. 17, p. 395-417, 2020.

CATALANOTTI, F.; SOLIT, D.B.; PULITZER, M.P. et al. Phase II trial of MEK inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with BRAFV600E/K-mutated melanoma. **Clin Cancer Res.** v. 19, p. 2257-64, 2013.

CAZZANIGA, M.; BONANNI B. Relationship between metabolic reprogramming and mitochondrial activity in cancer cells. Understanding the anticancer effect of metformin and its clinical implications. **Anticancer Research.** v.35, p.5789–5796, 2015.

CECCARELLI, J.; DELFINO, L.; ZAPPIA, E. et al. The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants. **Int J Cancer.** v. 123, p. 1770-8, 2008.

CHAKRABORTY, P.; ROY, S.S.; BASU A. et al. Sensitization of cancer cells to cyclophosphamide therapy by an organoselenium compound through ROS-mediated apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 84, p. 1992-1999, 2016.

CHANDEL, N. S.; TUVESON D. A. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. **New England Journal of Medicine** v. 371, p. 177–178, 2014.

CHANG, Y.; HE, L.; LI, Z. et al. Designing Core-Shell Gold and Selenium Nanocomposites for Cancer Radiochemotherapy. **ACS Nano.** V. 11, p. 4848-4858, 2017.

CHARLES, N.A.; HOLLAND, E.C.; GILBERTSON, R. et al. The brain tumor microenvironment. **Glia.** v. 59, p. 1169-80, 2011.

CHAPARRO, M.; GONZÁLEZ MORENO, L.; TRAPERO-MARUGÁN, M. et al. Review article: Pharmacological therapy for hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics.** v. 28, p. 1269–1277. 2008.

CHAPMAN, P.B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N Engl J Med.** v. 364, p. 2507-16, 2011.

CHEN, D.; RAUH, M.; BUCHFELDER, M. et al. The oxido-metabolic driver ATF4 enhances temozolamide chemo-resistance in human gliomas. **Oncotarget.** v. 8, p. 51164-51176, 2017.

CHEN, D.; ZUO, D.; LUAN, C. et al. Glioma cell proliferation controlled by ERK activity-dependent surface expression of PDGFRA. **PLoS One.** v. 9(1):e87281, 2014.

- CHEN, T.; ZHENG, W.; WONG, Y.S. et al. Mitochondria-mediated apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells induced by a novel selenadiazole derivative. **Biomed Pharmacother.** v. 62, p. 77-84, 2008.
- CHEN, T.; WONG, Y.S.; ZHENG, W. et al. Caspase- and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative. *Chem Biol Interact.*v.180, p. 54-60. 2009.
- CHEN, Z.; LAI, H.; HOU, L. et al. Rational design and action mechanisms of chemically innovative organoselenium in cancer therapy. **Chem. Commun.** v. 56, p.179-196, 2020.
- CHENG, X.; HOLENYA, P.; CAN, S. et al. A TrxR inhibiting gold(I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells. **Molecular Cancer.** v. 13, 221, 2014.
- CHEN, X.; ZHANG, M.; GAN, H. ET AL. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. **Nat Commun.** v. 9(1):2949, 2018.
- CHENG, Y.; SK, U.H.; ZHANG, 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, e35104, 2017.
- CHEUNG, E. C.; LEE, P.; CETECI, F. et al. Opposing effects of TIGAR- and RAC1-derived ROS on Wnt-driven proliferation in the mouse intestine. **Genes & Development.** v. 30, p. 52–63, 2016.
- CHI, Y.; WELCKER, M.; HIZLI, A.A. et al. Identification of CDK2 substrates in human cell lysates. **Genome Biol.** v. 9, p.R149, 2008.
- CHIPUK, J. E.; BOUCHIER-HAYES, L.; GREEN, D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. **Cell Death Differ.** v. 13, p. 1396–1402, 2006.
- CHIPUK, J.E.; MCSTAY, G.P.; BHARTI, A. et al. Sphingolipid metabolism cooperates with Bak and Bax to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. **Cell.** v. 48, p. 988-1000, 2012.
- CHO, H.; UM, J.; KIM, J.K. et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). **Science.** v. 292, p. 1728-1731, 2001.
- CHOWDURY, D.; KEOGH, M.C.; ISHII, H. et al.  $\gamma$ H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. **Molecular Cell.** v. 20, p. 801-809, 2005.
- CHRISTGEN, S.; PLACE, D.E.; KANNEGANTI, T.D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. **Cell Res.** v. 30, p. 315-327, 2020.
- CHUA, J.; NAFZIGER, E.; LEUNG, D. Evidence-Based Practice: Temozolomide Beyond Glioblastoma. **Curr Oncol Rep.** v. 21, p. 30, 2019.

COLAGRANDE, S.; REGINI, F.; TALIANI, G.G. et al. Advanced hepatocellular carcinoma and sorafenib: Diagnosis, indications, clinical and radiological follow-up. **World Journal of Gastroenterology**. v.7, p. 1041-1053, 2015.

COPELAND, N.A; SERCOMBE, H.E.; AINSCOUGH, J.F. et al. Ciz 1cooperates with cyclin-A-CDK2 to activate mammalian DNA replication in vitro. **Journal of Cell Science**. v. 123, p. 1108-1115, 2010.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, p. 860-7, 2002.

COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 95, p. 27–42, 2016.

COX, A. G. et al. The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. **Biochemical Pharmacology**. v. 76, n. 9, p. 1097–1109, 2008.

CSIBI, A.; LEE, G.; YOON, S.O. et al. The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc translation. **Curr Biol**. v. 24, p. 2274-80, 2014.

CUENDA, A.; SANZ-EZQUERRO, J.J. p38 $\gamma$  and p38 $\delta$ : From Spectators to Key Physiological Players. **Trends Biochem Sci**. v. 42, p. 431-442, 2017.

DA ROS, M.; DE GREGORIO, V.; IORIO, A.L. et al. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. **Int J Mol Sci**. v. 19(10):2879, 2018

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 42717-42730, 2017.

D'ARCY, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**. v. 43, p. 582-592, 2019.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D. et al. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 883–898, 2007.

DASKALOW, K., ROHWER, N., RASKOPF, E. et al. Role of hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  for progression and chemosensitivity of murine hepatocellular carcinoma. **Journal of Molecular Medicine**. v. 88, p. 817–827, 2010.

DASHZEVEG, N.; YOSHIDA, K. Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane. **Cancer Letters**. v. 367, p. 108-112, 2015.

DATTA, S.R.; DUDEK, H.; TAO, X. et al. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**. v. 91, p. 231-41, 1997.



DAVIES, B.R.; GREENWOOD, H.; DUDLEY, P. et al. Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. **Molecular Cancer Therapeutics**. v. 11, p. 873-87, 2012.

DE FALCO, M.; DE LUCA, A. Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. **Curr Pharm Des**. v.16, p.1417-1426, 2010.

DEBEN, C.; DESCHOOLMEESTER, V.; DE WAELE, J. et al. Hypoxia-Induced Cisplatin Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Is Mediated by HIF-1 $\alpha$  and Mutant p53 and Can Be Overcome by Induction of Oxidative Stress. **Cancers (Basel)**. v.10, p.126, 2018.

DEBERARDINIS, R.J.; CHANDEL, N.S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**. 2(5): e1600200, 2016.

DECORDOVA, S.; SHASTRI, A.; TSOLAKI, A. et al. Yasmin H, Klein L, Singh SK, Kishore U. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. **Front Immunol**. v.11:1402, 2020.

DEGIRMENCI, U.; WANG, M.; HU, J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. **Cells**. v. 9, p.198, 2020.

DEMUTH, T.; REAVIE, L.B.; RENNERT, J.L. et al. MAP-ing glioma invasion: mitogen-activated protein kinase kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival. **Mol Cancer Ther**. v. 6, p. 1212-22, 2007.

DENICOLA, G. M.; CHEN, P.H.; MULLARKY, E. et al. NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. **Nature Genetics**. v. 47, p. 1475–1481, 2015.

DENKO, N.C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. **Nature Review Cancer**. v. 8, p. 705-713, 2008.

DESCHÊNES-SIMARD, X.; KOTTAKIS, F.; MELOCHE, S. et al. ERKs in cancer: friends or foes? **Cancer Research**. v. 74, p. 412-419, 2014.

DEWANGAN, J.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, S. et al. Salinomycin inhibits breast cancer progression via targeting HIF-1 $\alpha$ /VEGF mediated tumor angiogenesis in vitro and in vivo. **Biochemical Pharmacology**. v. 164, p. 326-335, 2019.

DIAKOS, C.I.; CHARLES, K.A.; MCMILLAN, D.C. et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **Lancet Oncol**. v. 15:e493-503, 2014.

DIAZ-MORALLI, S. TARRADO-CASTELLARNAU, M.; MIRANDA, A. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**. v.138, p.255-271, 2013.

DIETLEIN, F.; THELEN, L.; REINHARDT, H. C. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. **Trends in Genetics**. v. 30, p. 326-339, 2014.

- DONG, J.; WANG, N.N.; YAO, Z.J. et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **J Cheminform.** v. 10(1):29, 2018.
- DONG, Z.; FENG, L.; CHAO, Y. et al. Amplification of Tumor Oxidative Stresses with Liposomal Fenton Catalyst and Glutathione Inhibitor for Enhanced Cancer Chemotherapy and Radiotherapy. **Nano Letters.** v. 19, p. 805-815, 2019.
- DRAGAN, Y.P. **Chemically-induced hepatocarcinogenesis. Hepatocell,** Springer, Carcinoma. p. 65-92, 2016.
- DU, X.; FU, X.; YAO, K. et al. Bcl-2 delays cell cycle through mitochondrial ATP and ROS. **Cell Cycle.** v.16, p. 707–713, 2017.
- DUAN, D.; ZHANG, J.; YAO, J. et al. Targeting Thioredoxin Reductase by Parthenolide Contributes to Inducing Apoptosis of HeLa Cells. **Journal of Biological Chemistry.** v. 291, p. 10021-10031, 2016.
- EDIRIWEERA, M.K.; TENNEKOON, K.H.; SAMARAKOON, SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. **Seminars in Cancer Biology.** v.59, p.147-160, 2019.
- EL-AWADY, R.A.; SEMREEN, M.H.; SABER-AYAD, M.M. 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 (Amst).** v. 37, p.1-11, 2016.
- EL-SERAG, H.B. Hepatocellular Carcinoma. **N. Engl. J. Med.** v. 365, p.1118–1127, 2011.
- ELSTROM, R. L. BAUER, D.E.; BUZZAI, M. et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. **Cancer Research.** v. 64, p. 3892–3899 2004.
- ESEN, H.; ERDI, F.; KAYA, B. et al. Tissue thioredoxin reductase-1 expression in astrocytomas of different grades. **J Neurooncol.** v. 121, p. 451-8, 2015.
- EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology.** v.69, p. 182-236, 2018.
- EVANS, S.M.; JUDY, K.D.; DUNPHY, I. et al. Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. **Clin Cancer Res.** v. 10, p. 8177-84, 2004.
- FALCHOOK, G.S.; LEWIS, K.D.; INFANTE, J.R. et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet Oncol.** v.13, p. 782-9, 2012.
- FAN, C.; ZHENG, W.; FU, X. et al. Strategy to enhance the therapeutic effect of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma by selenocystine, a synergistic agent that regulates the ROS-mediated signaling. **Oncotarget,** v.5, p. 2853-2863, 2014.

- FAN, C.D.; FU, X.Y.; ZHANG, Z.Y. et al. Selenocysteine induces apoptosis in human glioma cells: evidence for TrxR1-targeted inhibition and signaling crosstalk. **Scientific Reports**. v.7, p. 6465, 2017.
- FAN, Y.H.; LI, W.; LIU, D.D. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 3-substituted imidazo[1,2-a]pyridine and quinazolin-4(3H)-one derivatives as PI3K $\alpha$  inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 139, p. 95-106, 2017.
- FANFONE, D.; IDBAIH, A.; MAMMI, J. et al. Profiling Anti-Apoptotic BCL-xL Protein Expression in Glioblastoma Tumorspheres. **Cancers (Basel)**. v. 12, p. 2853, 2020.
- FANG, J.; DING, M.; YANG, L. et al. PI3K/PTEN/Akt signaling regulates prostate tumor angiogenesis. **Cell Signal**. v. 19, p. 2487-97, 2007.
- FANG, X.; YU, S.X.; LU, Y. et al. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 97, p. 11960-5, 2000.
- FANTIN, V. R.; ST-PIERRE, J.; LEDER, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. **Cancer Cell**. v. 9, p. 425–434, 2006.
- FEI, M.; GUAN, J.; XUE, T. et al. Hypoxia promotes the migration and invasion of human hepatocarcinoma cells through the HIF-1 $\alpha$ -IL-8-Akt axis. **Cellular and Molecular Biology Letters**. v. 20, p. 23:46, 2018.
- FELIPE, K.B.; KVIECINSKI, M.R.; DA SILVA, F.O et al. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **J Ethnopharmacol**. v.155, p. 1492-9, 2014.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**. 2015.
- FERLAY, J. et al. (ed.). *Cancer today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2018.
- FERREIRA, L.L.G.; ANDRICOPULO, AD. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug Discov Today**. V. 24, p. 1157-1165, 2019
- FLOHÉ, L.; GUNZLER W. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 114-121, 1984.
- FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H.M.; STAP, J. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature Protocols**. v. 1, p. 2315–2319, 2006.
- FREZZA, C.; GOTTLIEB, E. Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. **Seminars in Cancer Biology**. v. 19, p. 4–11, 2009.

FRY, D.W.; HARVEY, P.J.; KELLER, P.R. et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. **Mol Cancer Ther.** v. 3, p. 1427-382004.

FUKUDA, M.; GOTOH, Y.; NISHIDA, E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. **The Embo Journal.** v. 16, p. 901-1908, 1997.

FUSE, S.; OHUCHI, T.; ASAWA, Y. et al. Development of 1-aryl-3-furanyl/thienyl-imidazopyridine templates for inhibitors against hypoxia inducible factor (HIF)-1 transcriptional activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 26, p. 5887-5890, 2016.

GAELZER, M.M.; SANTOS, M.S.D.; COELHO, B.P. et al. Hypoxic and Reoxygenated Microenvironment: Stemness and Differentiation State in Glioblastoma. **Mol Neurobiol.** v. 54, p. 6261-6272, 2017.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis. **Cell Research.** v. 21, p.1383-1385, 2011.

GALVÃO, R.P.; ZONG, H. Inflammation and Gliomagenesis: Bi-Directional Communication at Early and Late Stages of Tumor Progression. **Curr Pathobiol Rep.** v. 1, p. 19-28, 2013.

GAO, J.L.; CHEN, Y.G. Natural Compounds Regulate Glycolysis in Hypoxic Tumor Microenvironment. **BioMed Research International.** v. 2015, p. 1–8, 2015.

GAO, L.; LOVELESS, J.; SHAY, C. et al. Targeting ROS-Mediated Crosstalk Between Autophagy and Apoptosis in Cancer. **Adv Exp Med Biol.** v.1260, p. 1-12, 2020.

GASPARRI, M.L.; BARDHI, E. RUSCITO, I. et al. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Ovarian Cancer Treatment: Are We on the Right Track? **Geburtshilfe Frauenheilkd.** v.77, p.1095-1103, 2017.

GE, B.C.; FENG, H.F.; CHENG, Y.F. et al. Design, synthesis and biological evaluation of substituted aminopyridazin-3(2H)-ones as G0/G1-phase arresting agents with apoptosis-inducing activities. **Eur J Med Chem.** v. 141, p. 440-445, 2017.

GERBER, N.K.; GOENKA, A.; TURCAN, S. et al. Transcriptional diversity of long-term glioblastoma survivors. **Neuro Oncol.** v. 16, p. 1186-95, 2014.

GIORGI, C.; BONORA, M.; SORRENTINO, G. et al. p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 112, p. 1779–1784, 2015.

GHOBRAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer Journal for Clinicians.** v.55, p. 178-194, 2005.

GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. **Molecular Aspects of Medicine.** v. 31, p. 60-74, 2010.

- GOLDWIRT, L.; BECCARIA, K.; CARPENTIER, A. et al. Irinotecan and temozolomide brain distribution: a focus on ABCB1. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 74, p. 185-93, 2014.
- GONG, D.; POMERENING, J.R.; MYERS, J.W. et al. Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. **Current Biology.** v. 17, p. 85-91, 2007.
- GHOSH, J.; LAWLESS, M.S.; WALDMAN, M. et al. Modeling ADMET. **Methods Mol Biol.** v. 1425:p. 63-83, 2016.
- GHOSH, S.; BISHAYEE, K.; PAUL, A. et al. Homeopathic mother tincture of *Phytolacca decandra* induces apoptosis in skin melanoma cells by activating caspase-mediated signaling via reactive oxygen species elevation. **J Integr Med.** v.11, p.116-24, 2013
- GREER, E.L.; BRUNET, A. FOXO transcription factors in ageing and cancer. **Acta Physiol (Oxf).** v.192, p. 19-28, 2008.
- GRETEN, F.R.; GRIVENNIKOV, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity.** v.51, p. 27-41, 2019.
- GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell.** v. 140, p. 883-99, 2010.
- GUÇLU, D.; ZUKU, B.; TOZLU, I. et al., Synthesis of novel imidazopyridines and their biological evaluation as potent anticancer agents: A promising candidate for glioblastoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 28, p. 2647-2651, 2018.
- GUO, M.; LI, Y.; LIN, Z. et al. Surface decoration of selenium nanoparticles with curcumin induced HepG2 cell apoptosis through ROS mediated p53 and Akt signaling pathways. **RSC Advances,** v. 7, p. 52456, 2017.
- GUO, W.; SUN, Y.; LIU, W. et al. Small molecule-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer. **Autophagy.** v. 10, p. 972-85, 2014.
- GUO, Y.J.; PAN, W.W.; LIU, S.B. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. **Exp Ther Med.** v. 19, p. 1997-2007, 2020.
- GUPTA, J.; DEL BARCO BARRANTES, I.; IGEA, A. et al. Dual function of p38 $\alpha$  MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival. **Cancer Cell.** v. 25, p. 484-500, 2014.
- GURPINAR, E.; VOUSDEN, K.H. Hitting cancer's weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation. **Trends in Cell Biology.** v. 8, p. 486-495, 2015.
- GURUNG, P.; LUKENS, J. R.; KANNEGANTI, T. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. **Trends in molecular medicine,** v. 21, p. 193-201, 2015.

HAJRA, S.; PATRA, A.R.; BASU, A. et al. Indole-3-Carbinol (I3C) enhances the sensitivity of murine breast adenocarcinoma cells to doxorubicin (DOX) through inhibition of NF- $\kappa$ B, blocking angiogenesis and regulation of mitochondrial apoptotic pathway. **Chemico-Biological Interactions**. v. 25, p.19-36, 2018.

HAMAĬ, A.; CAÑEQUE, T.; MÜLLER, S. et al. An iron hand over cancer stem cells. **Autophagy**. v.13, p. 1465-1466, 2017.

HAMBARDZUMYAN, D.; GUTMANN, D.H.; KETTENMANN, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. **Nat Neurosci**. v. 19, p. 20-27, 2016.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The next generation. **Cell**. 144, p. 646-674, 2011.

HAO, W.; YUAN, X. YU, L. et al. Licochalcone A-induced human gastric cancer BGC-823 cells apoptosis by regulating ROS-mediated MAPKs and PI3K/Akt signaling pathways. **Scientific Reports**. v.5:10336, 2015.

HARMSE, L.; GANGAT, N.; MARTINS-FURNESS, C. et al. Copper-imidazo[1,2a]pyridines induce intrinsic apoptosis and modulate the expression of mutated p53, haem-oxygenase-1 and apoptotic inhibitory proteins in HT-29 colorectal cancer cells. **Apoptosis**. v. 24, p. 623-643, 2019.

HARRIS, I.S.; TRELOAR, A.E.; INOUE, S. et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. **Cancer Cell**. v. 27, p. 211-222, 2015.

HATZIVASSILIOU, G.; LIU, B.; O'BRIEN, C. et al. ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors. **Mol Cancer Ther**. v. 11, p. 1143-54, 2012.

HAUSCHILD, A.; GROB, J.J.; DEMIDOV, L.V. et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. **Lancet**. v. 380, p. 358-65, 2012.

HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z. et al. Apoptosis - the p53 network. **J Cell Sci**. v. 116, n. 20, p. 4077-4085, 2003.

HAYES, C. Cellular immunotherapies for cancer. **Ir J Med Sci**. v. 190, p. 41-57, 2021.

HE, L.J.; YANG, D.L.; CHEN, H.Y. et al. A Novel Imidazopyridine Derivative Exhibits Anticancer Activity in Breast Cancer by Inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling. **Oncotargets Ther**. v. 13, p. 10111-10121, 2020.

HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends Biochem Sci**. v.41, p. 1012-1021, 2016.

HEESOM, K.J.; DENTON, R.M. Dissociation of the eukaryotic initiation factor-4E/4E-BP1 complex involves phosphorylation of 4E-BP1 by an mTOR-associated kinase. **FEBS Lett**. v. 457, p. 489-93, 1999.

HERRERO-RUIZ, J. et al.  $\beta$ TrCP controls the lysosome-mediated degradation on CDK1, whose accumulation correlates with tumor malignancy. **Oncotarget**, v.5, p. 7563-7574, 2014.

HIRAYAMA, T.; OKANIWA, M.; BANNO, H. 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[1,2a]pyridine derivatives as anti-tumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 8036-8053, 2015.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem**. v. 74, p. 214-26, 1976

HLAVAC, M.; DWUCET, A.; KAST, R.E. et al. Combined inhibition of RAC1 and Bcl-2/Bcl-xL synergistically induces glioblastoma cell death through down-regulation of the Usp9X/Mcl-1 axis. **Cell Oncol (Dordr)**. v. 42, p. 287-301, 2019.

HOBBS, G.A.; DER, C.J.; ROSSMAN, K.L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. **J Cell Sci**. v. 129, p. 1287-92, 2016.

HOFFMAN, D. L.; BROOKES, P. S. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, p. 16236–45, 2009.

HOMMA, S.; ISHII, Y.; MORISHIMA, Y.; YAMADORI, T. et al. M. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. **Clin Cancer Res**. v. 15, p. 3423-32, 2009.

HORNSVELD, M.; DANSEN, T.B.; DERKSEN, P.W, BURGERING BMT. Re-evaluating the role of FOXOs in cancer. **Semin Cancer Biol**. v. 50, p. 90-100, 2018.

HOSOYA, N.; MIYAGAWA, K. Targeting DNA damage response in cancer therapy. **Cancer Sci**. v.105, p. 370-388, 2014.

HOXHAI, G.; MANNING, B.D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nat Rev Cancer**. v.20, p.74-88, 2020.

HSU, F.T.; CHIANG, I.T.; KUO, Y.C. et al. Amentoflavone Effectively Blocked the Tumor Progression of Glioblastoma via Suppression of ERK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. **Am J Chin Med**. v. 47, p. 913-931, 2019.

HSU, F.T.; CHIANG, I.T.; WANG, W.S. Induction of apoptosis through extrinsic/intrinsic pathways and suppression of ERK/NF- $\kappa$ B signalling participate in anti-glioblastoma of imipramine. **J Cell Mol Med**. v.24, p. 3982-4000, 2020.

HUANG, J.L.; CAO, S.W.; OU, Q.S. et al. The long non-coding RNA PTTG3P promotes cell growth and metastasis via up-regulating PTTG1 and activating PI3K/Akt signaling in hepatocellular carcinoma. **Mol Cancer**. v.17, p. 93, 2018.

HWANG, Y.P.; YUN, H.J.; KIM, H.G. et al. Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC $\alpha$ /ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. **Toxicol Lett**. v.203, p.9-19, 2011.

- ICLIM G, TAIT, S.W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nat Rev Cancer**. v. 16, p.539-548, 2016.
- IKEDA, M.; MORIZANE, C.; UENO, M. et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. **Jpn J Clin Oncol**. v. 48, p. 103-114, 2018.
- INGERSOLL, M.A.; LYONS, A.S.; MUNIYAN, S. et al. Novel Imidazopyridine Derivatives Possess Anti-Tumor Effect on Human Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. **PLoS One**. v.10, n.6, e0131811, 2015.
- IQBAL, M.A.; HUSAIN, A.; ALAM, O. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of imidazopyridine-linked thiazolidinone as potential anticancer agents. **Arch Pharm (Weinheim)**. v.353(10):e2000071, 2020.
- ISLAM, S.U.; SHEHZAD, A.; AHMED, M.B. et al. Intranasal Delivery of Nanoformulations: A Potential Way of Treatment for Neurological Disorders. **Molecules**. v. 25(8):1929, 2020.
- ISMAIL, T.; KIM, Y.; LEE, H. et al. Interplay Between Mitochondrial Peroxiredoxins and ROS in Cancer Development and Progression. **Int J Mol Sci**. v.20(18):4407, 2019.
- JACOBS, D.; GLOSSIP, D.; XING, H. et al. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. **Genes Dev**. v.13, n.2, p. 163-175, 1999.
- JANKU, F.; KASEB, A. O.; TSIMBERIDOU, A. M. et al., Identification of novel therapeutic targets in the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma using targeted next generation sequencing. **Oncotarget** v.5, p.3012, 2014.
- JANSEN, V.M.; MAYER, I.A.; ARTEAGA, C.L. Is There a Future for AKT Inhibitors in the Treatment of Cancer? **Clin Cancer Res**. v.22, p.2599-2601, 2016.
- JARAMILLO M. C.; ZHANG, D. D. The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. **Genes Dev**. v. 27, p. 2179–2191, 2013.
- JASTRZĄB, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors. **J Enzyme Inhib Med Chem**. v.36, p. 362-371, 2021.
- JENDROSSEK, V. The Intrinsic Apoptosis Pathways as a Target in Anticancer Therapy. **Curr Pharm Biotechnol.**, v.13, p. 1426-1438, 2012.
- Jl, X.J.; CHEN, S.H.; ZHU, L. et al. Knockdown of NF-E2-related factor 2 inhibits the proliferation and growth of U251MG human glioma cells in a mouse xenograft model. **Oncol Rep**. v. 30, p. 157-64, 2013.
- JIANG, P.; DU, W.; WANG, X. et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Nat Cell Biol**. v. 13, p. 310-316, 2011.



JIANG, Y.; YANG, L.; YANG, X. et al. The imidazopyridine derivative X22 prevents diabetic kidney dysfunction through inactivating NF- $\kappa$ B signaling. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 525, p. 877-882, 2020.

JIAPAER, S.; FURUTA, T.; TANAKA, S. et al. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. **Neurol Med Chir (Tokyo).** v. 58, p. 405-421, 2018.

JIN, L.; CAO, Y.; ZHANG, T. et al. Effects of ERK1/2 S-nitrosylation on ERK1/2 phosphorylation and cell survival in glioma cells. **Int J Mol Med.** v. 41, p. 1339-1348, 2018.

JO, P. G.; CHOI, Y. K.; CHOI, C. Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 147, p. 460–469, 2008.

JOO, M.S.; KIM, W.D.; LEE, K.Y. et al. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. **Mol Cell Biol.** v.36, p.1931-1942., 2016.

KALE, J.; OSTERLUND, E.J.; ANDREWS, D.W. Bcl-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. **Cell Death Differ.** v. 25, p. 65–80, 2018.

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K.J. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radic Biol Med.** v. 52, p. 1-6, 2012.

KANE, R.C.; FARRELL, A.T.; SABER, H. et al. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res.** v. 12, p. 7271-8, 2006.

KANG, X.; WANG, H.; LI, Y. et al. Alantolactone induces apoptosis through ROS-mediated Akt pathway and inhibition of PINK1-mediated mitophagy in human HepG-2 cells. **Artif Cells Nanomed Biotechnol.** v.47, p.1961-1970, 2019.

KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. **Journal of the American Statistical Association**, 53, 457-481, 1958

KARANIKI, S.; TARANTANOS, T.; LI, L. et al., DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. **Oncogene.** v. 34, p. 2815 – 2822, 2015.

KARKI, R.; MAN, S.M.; MALIREDDI, R.K.S. et al. NLRC3 is an inhibitory sensor of PI3K-mTOR pathways in cancer. *Nature.* v. 540, p. 583-587, 2016.

KARPEL-MASSLER, G.; WESTHOFF, M.A.; KAST, R.E. et al. Artesunate enhances the antiproliferative effect of temozolomide on U87MG and A172 glioblastoma cell lines. **Anticancer Agents Med Chem.** v. 14, p. 313-8, 2014.

- KEMERDERE, R.; KACIRA, T.; HANIMOGLU, H. et al. Tissue and plasma thioredoxin reductase expressions in patients with glioblastoma multiforme. **J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg.** v.74, p. 234-8, 2013.
- KENNEDY, L.; SANDHU, J.K.; HARPER, M.E. et al. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. **Biomolecules.** v.10:1429, 2020.
- KENT, A.; BLANDER, J.M. Nod-like receptors: key molecular switches in the conundrum of cancer. **Front Immunol.** v.5:185, 2014.
- KHEMLINA, G.; IKEDA, S.; KURZROCK, R. The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. **Mol Cancer.** v. 16, 149, 2017.
- KHAN, K. H.; YAP, T.A.; YAN, L. et al. Targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling network in cancer. **Chinese J. Cancer.** v. 32, p. 253-265, 2013b.
- KHAN, M.; LI, T.; AHMAD KHAN, M.K et al. Alantolactone induces apoptosis in HepG2 cells through GSH depletion, inhibition of STAT3 activation, and mitochondrial dysfunction. **BioMed Res Int.** 2013a.
- KHANDELWAL, S.; BOYLAN, M.; SPALLHOLZ, J.E. et al. Cytotoxicity of Selenium Immunoconjugates against Triple Negative Breast Cancer Cells. **Int J Mol Sci.** v. 19 :3352, 2018.
- KIZAKA-KONDOH, S.; TANAKA, S.; HARADA, H. et al., The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for cancer therapy. **Adv. Drug Deliv. Rev.,** v. 61, p. 623–632, 2009.
- KIELISZEK, M.; LIPINSKI, B.; BŁAŻEJAK, S. Application of Sodium Selenite in the Prevention and Treatment of Cancers. **Cells.** v.6, n.4, 39, 2017.
- KIM, J.Y.; KIM, Y.J.; LEE, S. et al. Park JH. The critical role of ERK in death resistance and invasiveness of hypoxia-selected glioblastoma cells. **BMC Cancer.** v. 23, p. 9:27, 2009.
- KIM, O.; JEONG, Y.; LEE, H. et al. Design and synthesis of imidazopyridine analogues as inhibitors of phosphoinositide 3-kinase signaling and angiogenesis. **J Med Chem.** v.54, p.2455-2466, 2011.
- KISHI, H.; NAKAGAWA, K.; MATSUMOTO, M. et al. Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. **J Biol Chem.** v. 276, p. 39115-22, 2001.
- KO, J.H.; YOON, S.O.; LEE, H.J. et al. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NFκB pathways in autophagy- and p62-dependent manners. **Oncotarget.** v. 8, p. 40817-40831, 2017.
- KOBAYASHI, M.; ZOCHODNE, DW. Diabetic neuropathy and the sensory neuron: New aspects of pathogenesis and their treatment implications. **J Diabetes Investig.** v.9, p.1239-1254, 2018.

- KOHSAKA, S.; TAKAHASHI, K.; WANG, L. et al. Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma. **Cancer Lett.** v. 331, p. 68-75, 2013.
- KOLB, R.H.; GREER, P.M.; CAO, P.T. et al. ERK1/2 signaling plays an important role in topoisomerase II poison-induced G2/M checkpoint activation. **PLoS One.** v. 7(11):e50281, 2012.
- KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. **Physiol Rev.** v. 92, p.689-737, 2012.
- KRYLOVA, N.G.; DROBYSH, M.S.; SEMENKOVA, G.N. et al. Kulahava TA, Pinchuk SV, Shadyro OI. Cytotoxic and antiproliferative effects of thymoquinone on rat C6 glioma cells depend on oxidative stress. **Mol Cell Biochem.** v. 462, p. 195-206, 2019.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ.** v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.
- KUMAR V.; ABBAS AK.; ASTER JC. **Pathologic Basis of Diseases.** editors. Robbins & Conran. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
- KURŠVIETIENĖ, L.; MONGIRDIENĖ, A.; BERNATONIENĖ, J. et al. Selenium Anticancer Properties and Impact on Cellular Redox Status. **Antioxidants (Basel).** v. 9(1):80, 2020.
- LAMKANFI, M.; DIXIT, V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell.** v. 157, p. 1013-22., 2014.
- LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 10, p. 607-632, 2020.
- LAVOIE, H.; THERRIEN, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.16, p. 281-298, 2015.
- LAWSON, M.; RODRIGO, J.; BARATTE, B. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modelling studies of imidazo[1,2-*a*]pyridines derivatives as protein kinase inhibitors. **Eur J Med Chem.** v. 123, p. 105–114, 2016.
- LE, A. COOPER, C.R.; GOUW, A.M. et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** v. 107, p. 2037–2042, 2010.
- LE, R.E.; PREUSSER, M, ROTH, P. et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. **Cancer Treat Rev.** v.80:101896, 2019.
- LECHTENBERG, B. C.; MACE, P. D.; RIEDL, S. J. Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling. **Current opinion in structural biology,** v. 29, p. 17-25, 2014.

- LEE, H.; JUNG, K.H.; JEONG, Y. et al. a novel phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor, has anti-tumor activity through promoting apoptosis and inhibiting angiogenesis. **Cancer Lett.** v. 328, p. 152–159, 2012.
- LEE, S.; RAUCH, J.; KOLCH, W. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. **Int J Mol Sci.** v.21:1102, 2020.
- LEE, S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes Dis.** v. 3, p. 198-210, 2016.
- LEE, Y.J.; KIM, W.I.; BAE, J.H. et al. = Overexpression of Nrf2 promotes colon cancer progression via ERK and AKT signaling pathways. **Ann Surg Treat Res.** v. 98, p. 159-167, 2020.
- LEI, H.; WANG, G.; ZHANG, J. et al. Inhibiting TrxR suppresses liver cancer by inducing apoptosis and eliciting potent antitumor immunity. **Oncol Rep.** v.40, p.3447-3457, 2018.
- LEI, J.C.; YU, J.Q.; YIN, Y. et al. Alantolactone induces activation of apoptosis in human hepatoma cells. **Food Chem Toxicol.** v.50, p. 3313–3319, 2012.
- LI, B.; QIU, B.; LEE, D.S.M. et al. Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression. **Nature.** v. 513, p. 251–255, 2014.
- LI, G.Y.; JUNG, K.H.; LEE, H. et al. A novel imidazopyridine derivative, HS-106, induces apoptosis of breast cancer cells and represses angiogenesis by targeting the PI3K/mTOR pathway. **Cancer Lett.** v.329, p.59-67, 2013.
- LI, M.; ZHAO, L.; LIU, J. et al. Multi-mechanisms are involved in reactive oxygen species regulation of mTORC1 signaling. **Cell Signal.** v. 22, p. 1469-76, 2010.
- LI, S.; GAO, M.; LI, Z. et al. p53 and P-glycoprotein influence chemoresistance in hepatocellular carcinoma. **Front Biosci.** v. 10:p. 461-468, 2018.
- LI, X.; HUANG, J.M.; WANG, J.N. et al. Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53. **Chem Biol Interact.** v. 232, p. 12–20, 2015.
- LI, Y.; HUANG, J.H.; WANG, J.L. et al. Diversity-Oriented Synthesis of Imidazo-Dipyridines with Anticancer Activity via the Groebke-Blackburn-Bienaymé and TBAB-Mediated Cascade Reaction in One Pot. **J Org Chem.** v.84, p.12632-12638, 2019.
- LIANG, Y.; ZHOU, Y.; DENG, S. et al. Microwave-Assisted Syntheses of Benzimidazole-Containing Selenadiazole Derivatives that induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by activation of the ROS/Akt Pathway. **Chem Med Chem.** v.11, p. 2339-2346, 2016.
- LIDDELL, J. R. DRINGEN, R.; CRACK, P.J. et al. Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. **GLIA,** v. 54, p. 873–879, 2006.

- LIEN, E.C.; DIBBLE, C.C.; TOKER, A. PI3K signaling in cancer: beyond Akt. **Curr Opin Cell Biol.** v. 45, p. 62-71, 2017.
- LIM, J.H.; JUNG, K.H.; KIM, M.S. et al. SB365 induces apoptosis and suppresses proliferation of glioblastoma cells. **Indian J Pharmacol.** v. 52, p. 102-107, 2020.
- LISTER, A.; NEDJADI, T.; KITTERINGHAM, N.R. et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. **Mol Cancer.** v. 13, p. 10:37, 2011.
- LIU, A.; HOU, C.; CHEN, H. et al. Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. **Front Oncol.** v. 6:16, 2016.
- LIU, F.; YANG, X.; GENG, M. et al. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. **Acta Pharm Sin B.** v. 8, p. 552-562, 2018<sup>a</sup>.
- LIU J.; WANG Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. **Oxid Med Cell Longev.** 2015:294303, 2015.
- LIU, Y.; HYDE, A.S.; SIMPSON, M.A. et al. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. **Adv Cancer Res.** v. 122, p. 69-101, 2014.
- LIU, Y.; SHAO, E.; ZHANG, Z. et al. A Novel Indolizine Derivative Induces Apoptosis Through the Mitochondria p53 Pathway in HepG-2 Cells. **Front Pharmacol.** v.10, p.762, 2019.
- LIU, Y.; ZHANG, X.; YANG, B. et al. Demethylation-Induced Overexpression of Shc3 Drives c-Raf-Independent Activation of MEK/ERK in HCC. **Cancer Res.** v. 78, p. 2219-2232, 2018.
- LIU, Z.; WANG, Y.; DOU, C. et al. Hypoxia-induced up-regulation of VASP promotes invasiveness and metastasis of hepatocellular carcinoma. **Theranostics.** v.8, p. 4649-4663. 2018<sup>b</sup>
- LIWAK, U.; JORDAN, L.E.; VON-HOLT, S.D. et al. Loss of PDCD4 contributes to enhanced chemoresistance in Glioblastoma multiforme through de-repression of Bcl-xL translation. **Oncotarget.** v. 4, p. 1365-72, 2013.
- LLOVET J.M.; HERNANDEZ-GEA, V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. **Clin Cancer Res.** v. 20 p. 2072–2079, 2014.
- LOBODA, A.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. **Mol Cells.** v. 29, p. 435-442, 2010.
- LOPEZ-GINES, C.; GIL-BENSO, R.; BENITO, R. et al. activation of ERK1/2 MAP kinases in glioblastoma pathobiology and its relationship with EGFR amplification. **Neuropathology.** v.28, p. 507-15, 2008.
- LOS, M.; MADDIKA, S.; ERB, B. et al. Switching Akt: from survival signaling to deadly response. **Bioessays.** v. 31, p.492-495, 2009.

- LOUGHERY, J.; COX, M.; SMITH, L. M. et al. Critical role for p53-serine15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. **Nucl Acids Res.** v 42, p. 7666–7680, 2014.
- LOUIS, D.N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol.** v.131, p. 803-20, 2016.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, AL. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 193, p265-75, 1951
- MA, B.B.; GOH, B.C.; LIM, W.T. et al. Multicenter phase II study of the Akt inhibitor MK-2206 in recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma from patients in the mayo phase II consortium and the cancer therapeutics research group (MC1079). **Invest New Drugs.** v.33, p.985-991, 2015.
- MA, X.; ZHANG, J.; LIU, S. et al. Huang Y, Chen B, Wang D. Nrf2 knockdown by shRNA inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy in cervical cancer. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 69, p. 485-94, 2012.
- MAIK-RACHLINE, G.; HACOHEN-LEV-RAN, A.; SEGER, R. Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer. **Int J Mol Sci.** v.20(5):1194, 2019.
- MAKAREVIC, J. RUTZ, J.; JUENGEL E. et al. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth *in vitro* by diminishing cyclin A and CKD2. **PLoS One**, v.9, p. e105590, 2014.
- MAKHOV, P.; GOLOVINE, K.; TEPER, E. et al. Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death. **Br J Cancer.** v.110, p. 899-907, 2014.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer.** v. 9, p. 153-166, 2009.
- MALUMBRES, M.; CARNERO, A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. **Prog Cell Cycle Res.** v.5, p.5-18, 2003.
- MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Curr Drug Targets.** v. 19, p. 38-54, 2018.
- MANNING, B.D.; CANTLEY, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell.** v. 129, p. 1261-74, 2017.
- MAO, W.; SUN, Y.; ZHANG, H. et al. A combined modality of carboplatin and photodynamic therapy suppresses epithelial-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)/MMP-9 expression in HEp-2 human laryngeal cancer cells via ROS-mediated inhibition of MEK/ERK signalling pathway. **Lasers Med Sci.** v. 31, p. 1697-1705, 2016.
- MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** v. 5, p. 1-17, 2013.

- MARGIOTTA, N.; DENORA, N.; PICCINONNA, S. et al. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of new coordination complexes of platinum(II) and rhenium(I) with a ligand targeting the translocator protein (TSPO). **Dalton Trans.** v.43, p. 16252-64, 2014.
- MARIE KIRWEN, E.; BATRA, T.; KARTHIKEYAN, C. et al. 2,3-Diaryl-3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives as potential anticancer and anti-inflammatory agents. **Acta Pharm Sin B.** v. 7, p. 73-79, 2017.
- MARTÍNEZ-URBINA, M.A.; ZENTELLA, A.; VILCHIS-REYES, M.A. et al. 6-Substituted 2-(*N*-trifluoroacetylamino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line. **Eur J Med Chem.** v.45, p.1211-1219, 2010.
- MASOUD, G.N.; LI, W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. **Acta Pharm Sin B.** v. 5, p. 378-89, 2015.
- MASSARI, F.; CICCARESE, C.; SANTONI, M. et al. Metabolic phenotype of bladder cancer. **Cancer Treat Rev.** v. 45, p. 46-57, 2016.
- MATHUR, A.; HAYWARD, J.A.; MAN, S.M. Molecular mechanisms of inflammasome signaling. **J Leukoc Biol.** v. 103, p. 233-257, 2018.
- MATTMANN, M.E.; STOOPS, S.L.; LINDSLEY, C.W. Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape. **Expert Opin Ther Pat.** v.21, p.1309-1338, 2011.
- MAULIK, N.; DAS, D. K. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.** v.1780(11), p.1368-1382, 2008.
- MAYER, A.; SCHNEIDER, F.; VAUPEL, P. et al. Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. **Int J Oncol.** v. 41, p. 1260-70, 2012.
- MAYER, I.A.; ARTEAGA, C.L. The PI3K/Akt pathway as a target for cancer treatment. **Annu Rev Med.** v.67, p. 11-28, 2016.
- MAYNARD, M.A.; OHH, M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. **Cell Mol Life Sci.** v. 64, p. 2170-80, 2007.
- MCGAHON, A.J.; MARTIN, S.J.; BISSONNETTE, R.P. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol.** v. 46, p. 153-85, 1995.
- MEENAKSHISUNDARAM, S.; MANICKAM, M.; PILLAIYAR, T. Exploration of imidazole and imidazopyridine dimers as anticancer agents: Design, synthesis, and structure-activity relationship study. **Arch Pharm (Weinheim).** 352(12):e1900011, 2019.
- MELILLO, G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. **Mol Cancer Res.** v. 4, p. 601-5, 2006.

- MERCHANT, M.; MOFFAT, J.; SCHAEFER, G. et al. Combined MEK and ERK inhibition overcomes therapy-mediated pathway reactivation in RAS mutant tumors. **PLoS One**. v. 12(10):e0185862, 2017.
- MESSAOUDI, K.; CLAVREUL, A.; LAGARCE, F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. **Drug Discov Today**. V. 20, p. 899-905, 2015.
- MICHAUD, K.; SOLOMON, D.A.; OERMANN, E. et al. inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. **Cancer Res**. v. 70, p. 3228-38, 2010.
- MISKIEWICZ, A.; SZPARECKI, G.; DURLIK, M. et al. The Q705K and F359L Single-Nucleotide Polymorphisms of NOD-Like Receptor Signaling Pathway: Association with Chronic Pancreatitis, Pancreatic Cancer, and Periodontitis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. v. 63, p. 485-94, 2015.
- MITCHELL, D.A.; MORTON, S.U.; FERNHOFF, N.B. et al. Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 104, p. 11609-14, 2007.
- MOHAMMADI, F.; SOLTANI, A.; GHAHREMANLOO, A. et al. The thioredoxin system and cancer therapy: a review. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 84, p. 925-935, 2019.
- MOLONEY, J.N.; COTTER, T.G. ROS signalling in the biology of cancer. **Semin Cell Dev Biol**. v. 80, p. 50-64, 2018.
- MORGAN, M.J.; LIU, Z. Programmed cell death with a necrotic-like phenotype. **Biomol Concepts**, v. 4, p. 259-275, 2013.
- MORGAN, L.L. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. **Neuro Oncol**. v. 17, P. 623-4, 2015.
- MORICEAU, G.; HUGO, W.; HONG, A. et al. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. **Cancer Cell**. v. 27, p. 240-56, 2015.
- MORIGI, R.; LOCATELLI, A.; LEONI, A. et al. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation of substituted 3-(5-imidazo[2,1-b]thiazolylmethylene)-2-indolinones as new potent anticancer agents. **Eur J Med Chem**. v.166, p. 514-530, 2019.
- MORLAND, C. et al. Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. **Nat. Commun.**, v. 8, 15557, 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUKHTAR, E.; ADHAMI, V.M.; KHAN, N. et al. Apoptosis and Autophagy Induction as Mechanism of Cancer Prevention by Naturally Occurring Dietary Agents. **Curr Drug Targets**, v.13, p. 1831-1841, 2012.



- MUMBENEGEWI, D. R.; LI, Q.; LI, C. et al. Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes. **Molecular and cellular biology**, v. 28, p. 3700–12, 2008.
- MUNDI, P.S.; SACHDEV, J.; MCCOURT, C. et al. Kalinsky K. Akt in cancer: new molecular insights and advances in drug development. **Br J Clin Pharmacol**. v.82, p.943-956, 2016.
- MUNIYAN, S.; CHOU, Y.W.; INGERSOLL, M.A. et al. Antiproliferative activity of novel imidazopyridine derivatives on castration-resistant human prostate cancer cells. **Cancer Lett**. v. 353, p. 59-67, 2014.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 1-13, 2009.
- MURRAY, A.W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. **Cell**, v. 116, p. 221-234, 2004.
- NAJIM, N.; PODMORE, I.D.; MCGOWN, A. et al. Methionine restriction reduces the chemosensitivity of central nervous system tumour cell lines. **Anticancer Res**. v. 29, p. 3103-8. 2009.
- NGUYEN, T.; YANG, C.S.; PICKETT, C.B. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. **Free Radic Biol Med**. v. 37, p. 433-41, 2004.
- NIE, W.; ZAN, X; YU, T. et al. Synergetic therapy of glioma mediated by a dual delivery system loading  $\alpha$ -mangostin and doxorubicin through cell cycle arrest and apoptotic pathways. **Cell Death Dis** 11. v. 928, 2020.
- NIKOLETOPOULOU, V. MARKAKI, M.; PALIKARAS, K. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, p. 3448-3459, 2013.
- NISO-SANTANO, M.; GONZÁLEZ-POLO, R.A.; BRAVO-SAN PEDRO, J.M. et al. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: modulation by the Nrf2/Trx axis. **Free Radic Biol Med**. v. 48, p. 1370-81, 2010.
- NOOROLYAI, S.; SHAJARI, N.; BAGHBANI, E. et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. **Gene**. v, 698, p. 120-128, 2019.
- OGAWARA, Y.; KISHISHITA, S.; OBATA, T. et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. **J Biol Chem**. v. 277, p. 21843-50, 2002.
- OKAMOTO, M.; LIU, W.; LUO, Y. et al. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. **J Biol Chem**. v. 285, p. 6477-88, 2010.
- O'MALLEY, T.; ALLING, T.; EARLY, J.V. et al. Imidazopyridine Compounds Inhibit Mycobacterial Growth by Depleting ATP Levels. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 62:e02439-17, 2019.

- ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. v. 12, p. 1-13, 2000.
- OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. v.17, p. 93-115, 2017.
- OURIQUE, F.; KVIECINSKI, M.R.; FELIPE, K.B. et al. DNA damage and inhibition of akt pathway in mcf-7 cells and ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. **Oxid Med Cell Longev**. V. 2015:495305, 2015.
- OURIQUE, F.; KVIECINSKI, M.R.; ZIRBEL, G. 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, p. 640-646, 2016.
- OYEWOLE, A.O.; BIRCH-MACHIN, M.A. Mitochondria-targeted antioxidants. **FASEB J**. v. 29, p. 4766-71, 2015.
- OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. **Cancers**, v. 3, p. 994-1013, 2011.
- QIU, J.; SHI, Z.; JIANG, J. Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. **Drug Discov Today**. v. 22, p. 148-156, 2017.
- PAL, S.K.; RECKAMP, K.; YU, H. et al. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. **Expert Opin Investig Drugs**. v.19, p.1355-66, 2010.
- PALANIVEL, K.; KANIMOZHI, V.; KADALMANI, B. et al. Verrucaric acid induces apoptosis through ROS-mediated EGFR/MAPK/Akt signaling pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. **J Cell Biochem**. v.115, p.2022-2032, 2014.
- PANDEY, V.; BHASKARA, V.K.; BABU, PP. Implications of mitogen-activated protein kinase signaling in glioma. **J Neurosci Res**. v. 94, p. 114-27, 2016.
- PANG, K.L.; CHIN, K.Y. Emerging Anticancer Potentials of Selenium on Osteosarcoma. **Int J Mol Sci**. v. 20, p.5318, 2019.
- PAPADAKIS, G.; GERASI, M.; SNOECK, R. et al. Synthesis of New Imidazopyridine Nucleoside Derivatives Designed as Maribavir Analogues. **Molecules**. v. 25, p. 4531, 2020.
- PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A. et al. From selenium to selenoproteins: Synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 9, p. 775–806, 2007.
- PARK, J.H.; PYUN, W.Y.; PARK, HW. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells**. v. 9(10):2308, 2020.
- PASSAIA, G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. **Plant Science**, v. 234, p. 22–26, 2015.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metab.** v. 23, p. 27–47, 2016.

PENG, G.; LIU, Y. Hypoxia-inducible factors in cancer stem cells and inflammation. **Trends Pharmacol Sci.** v.36, p.74-83, 2015.

PERAZZOLI, G.; PRADOS, J.; ORTIZ, R. et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. **PLoS One.** v. 10(10):e0140131, 2015.

PEREIRA, R.M.; FERREIRA-SILVA, G.Á.; PIVATTO, M. et al. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. **Toxicol in vitro.** v.31, p.86-92, 2016.

PERREAULT, S.; LAROUCHE, V.; TABORI, U. et al. A phase 2 study of trametinib for patients with pediatric glioma or plexiform neurofibroma with refractory tumor and activation of the MAPK/ERK pathway: TRAM-01. **BMC Cancer.** v. 19(1):1250, 2019.

PERRI, F.; PISCONTI, S.; SCARPATI, G.D.V. p53 mutations and cancer: a tight linkage. **Ann Transl Med.** v.4(24):522, 2016.

PERRY, A.; WESSELING, P. Histologic classification of gliomas. **Handb Clin Neurol.** v.134, p. 71-95, 2016.

PETER, M.E. Programmed cell death. Apoptosis meets necrosis. **Nature,** v. 471, p. 310-312, 2011.

PFEIFER, G.P. Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes. **Genome Med.** v. 2, p. 54, 2010.

PHAN, L.M.; YEUNG, S.C.J.; LEE, M.H. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. **Cancer Biol Med.** v.11, p.01–19, 2014.

PHAN, T.G.; CROUCHER, P.I. The dormant cancer cell life cycle. **Nat Rev Cancer.** v. 20, p. 398-411, 2020.

PLETSAS, D.; GARELNABI, E.A.; LI, L. et al. Synthesis and quantitative structure-activity relationship of imidazotetrazine prodrugs with activity independent of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, DNA mismatch repair, and p53. **J Med Chem.** v. 56, p. 7120-32, 2013.

PODHORECKA, M. SKLADANOWSKI, A.; BOZKO, P. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. **J Nucleic Acids,** v.3(2010):920161, 2010.

POON, C.C.; SARKAR, S.; YONG, V.W. et al. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. **Brain.** v.140, p. 1548-1560. 2017.

PORTARIA Nº 602, DE 26 DE JUNHO DE 2012. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Fígado no Adulto. **Secretaria de Atenção à Saúde**, Ministério da Saúde, 2012.

PREUSSER, M.; LIM, M.; HAFNER, D.A. et al. Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. **Nat Rev Neurol**. v. 11, p. 504-14, 2015.

QI, Y.; SCHOENE, N.W.; LARTEY, F.M. et al. Selenium compounds activate ATM-dependent DNA damage response via the mismatch repair protein hMLH1 in colorectal cancer cells. **J Biol Chem**. v. 285, n.43, p. 33010-33017, 2010.

RAFIQUE, J.; SABA, S.; ROSÁRIO, A.R. et al., Regioselective, Solvent- and Metal-Free Chalcogenation of Imidazo[1,2-*a*]pyridines by Employing I<sub>2</sub> /DMSO as the Catalytic Oxidation System. **Chemistry**. v. 22, p.11854-11862, 2016.

RAJ, L.; IDE, T.; GURKAR, A.U. et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**. v. 475, p. 231-4, 2011.

RAJABI, M.; MOUSA, S.A. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines**. v.5(2):34, 2017.

REBOUISSOU, S.; NAULT, J.C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**. v. 72, p. 215-229, 2020.

RINCÓN, M.; DAVIS, R.J. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. **Immunol Rev**. v. 228, p. 212-24, 2009.

ROBEY, R. B.; HAY, N. Is Akt the “Warburg kinase”? Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. **Semin. Cancer Biol**. v. 19, p. 25–31 2009.

RODRIGUEZ, M.S.; DESTERRO, J.M.; LAIN, S. et al. Multiple Cterminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. **Mol Cell Biol**. v. 20: p.8458–8467, 2000.

ROSS, G.M.; MCMILLAN, T.J.; WILCOX, P. et al. Collins AR. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, **Institute of Cancer Research**, v. 337, p. 57-60, 1994.

RUDOLF, E.; RUDOLF, K.; CERVINKA, M. Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. **Cell Biol Toxicol**. v.24, n.2, p.123-41, 2008.

SABIO, G.; DAVIS, R.J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Semin Immunol**. v.26, p. 237-45, 2014.

SAITO, Y.; CHAPPLE, R. H.; LIN, A. et al. AMPK protects leukemia-initiating cells in myeloid leukemias from metabolic stress in the bone marrow. **Cell Stem Cell** v. 17, p. 585–596, 2015.

SAKAGUCHI, K.; HERRERA, J.E.; SAITO, S.I.; et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation acetylation cascade. **Genes Dev**. v 12, p.2831–2841, 1998.

SAMUELS, Y.; BARDELLI, A.; LÓPEZ-OTÍN, C. The Cancer Genome. in: devita jr, v.t.; lawrence, t.s.; rosenberg s.a. (eds). *Cancer, Principles & Practice of Oncology, Primer of the Molecular Biology of Cancer*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, p.2, 2011.

SANTOS, D.C.; RAFIQUE, J.; SABA, S. et al. Apoptosis oxidative damage-mediated and antiproliferative effect of selenylated imidazo[1,2-a]pyridines on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and in vivo. **J Biochem Mol Toxicol.** v. 35(3):e22663, 2020

SANTOS, I.; RAMOS, C.; MENDES, C. et al. Targeting Glutathione and Cystathionine  $\beta$ -Synthase in Ovarian Cancer Treatment by Selenium-Chrysin Polyurea Dendrimer Nanoformulation. **Nutrients.** v.11: 2523, 2019.

SAURA, C.; RODA, D.; ROSELLÓ, S. et al. A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive Akt Inhibitor Ipatasertib demonstrates robust and safe targeting of Akt in Patients with Solid Tumors. **Cancer Discov.** v.7, p.102-113, 2017.

SAYEED, I.B.; LAKSHMA, NAYAK, V.; SHAREEF, M.A. et al. Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine-propenone conjugates as potent tubulin inhibitors. **Medchemcomm.** v. 8, p. 1000-1006, 2017.

SCHIEVEN, G.L. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. **Curr Top Med Chem.** v. 5, p. 921-8, 2005.

SCHNERCH, D.; YALCINTEPE, J.; SCHMIDTS, A. et al. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. **Am. J. Cancer Res.**, v. 2, p. 508-528, 2012.

SCHRODER, K.; ZHOU, R.; TSCHOPP, J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? **Science.** v. 327, p. 296-300, 2010.

SCHULZE, K.; IMBEAUD, S.; LETOUZÉ, E. et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. **Nat Genet.** v.47, p. 505-511, 2015.

SEMENZA, G. L.; ARTEMOV D.; BEDI A. et al. 'The metabolism of tumours': 70 years later. **Novartis Found. Symp.** v. 240, p. 251–260, 2003.

SEMENZA, G. L. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. **Physiology**, v. 2, p. 97-106, 2008.

SHANG, W.; XIE, Z.; LU, F. et al. Increased Thioredoxin-1 Expression Promotes Cancer Progression and Predicts Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. **Oxid Med Cell Longev.** v. 2019:9291683, 2019.

SHAO, D.; MA, J.; ZHOU, C. et al. STAT3 down-regulation induces mitochondria-dependent G2/M cell cycle arrest and apoptosis in oesophageal carcinoma cells. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 44, p. 413-420, 2017.

SHEARN, C.T.; SMATHERS, R.L.; STEWART, B.J. et al. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) inhibition by 4-hydroxynonenal leads to increased Akt activation in hepatocytes. **Mol Pharmacol.** v.79, p. 941-52, 2011.

- SHI, L.; DUAN, Y.; YAO, X. et al. Effects of selenium on the proliferation and apoptosis of sheep spermatogonial stem cells *in vitro*. **Anim Reprod Sci.** v.215:106330, 2020.
- SHIIZAKI, S.; NAGURO, I.; ICHIJO, H. Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. **Adv Biol Regul.** v. 53, p.135-44, 2013.
- SHIN, I.; YAKES, F.M.; ROJO, F. et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. **Nat Med.** v.8 (10):1145-52, 2002.
- SHIMIZU, S.; TAKEHARA, T.; HIKITA, H. et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.** v. 52, p.698-704, 2010.
- SIGNORE, M.; PELACCHI, F, DI MARTINO, S. et al. Combined PDK1 and CHK1 inhibition is required to kill glioblastoma stem-like cells *in vitro* and *in vivo*. **Cell Death Dis.** v. 5:e1223, 2014.
- SINGAL, A.G.; LAMPERTICO, P.; NAHON, P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: **New trends. J Hepatol.** v. 72, p. 250-261, 2020.
- SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L. et al. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. **Molecules.** v. 24(8):1583, 2019.
- SINGH, D.; ARORA, R.; KAUR, P. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer. **Cell Biosci.** v.7:62, 2017.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** v. 175, p. 184-91, 1988.
- SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.20, p. 175-193, 2019.
- SOBHAKUMARI, A.; LOVE-HOMAN, L.; FLETCHER, E.V. et al. Susceptibility of human head and neck cancer cells to combined inhibition of glutathione and thioredoxin metabolism. **PLoS One.** 7(10):e48175, 2012.
- SODHI, R. K.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. **Vascul Pharmacol.**, v. 53, p. 77-87, 2010.
- SONG, M.; BODE, A.M.; DONG, Z. et al. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. **Cancer Res.** v. 79, p. 1019-1031, 2019.
- SONG, Y.; LIN, X.; KANG, D. et al. Discovery and characterization of novel imidazopyridine derivative CHEQ-2 as a potent CDC25 inhibitor and promising anticancer drug candidate. **Eur J Med Chem.** v.82, p.293-307, 2014.
- SOUZA, C.F.; BALDISSERA, M.D.; DESCOVI, S.N. et al. Diphenyl diselenide dietary supplementation protects against methylmercury-chloride-induced immunotoxicity in the head kidney and spleen of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) via regulation of

purinergic signaling and the NLRP3 inflammasome. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v. 222, p. 59-64, 2019.

SPENCER, P.K. Measuring and modeling apoptosis in single cells. **Cell**, v. 144, p. 926-939, 2011.

SRINIVAS, U.S.; TAN, B.W.Q.; VELLAYAPPAN, B.A. et al. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biol.** v. 25:101084, 2019.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (ed.). **World cancer report.** Lyon: IARC Press, 2014. p, 1010, 2014.

SU, C.C.; TANSINONE, II. A inhibits gastric carcinoma AGS cells by decreasing the protein expression of VEGFR and blocking Ras/Raf/MEK/ERK pathway. **Int J Mol Med.** v.41, p. 2389-2396, 2018.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis Cancer. **J Oncol.** 2013:102735, 2013.

SUBBA RAO, A.V.; VISHNU VARDHAN, M.V.; SUBBA REDDY N.V. et al. Synthesis and biological evaluation of imidazopyridinyl-1,3,4-oxadiazole conjugates as apoptosis inducers and topoisomerase II $\alpha$  inhibitors. **Bioorg Chem.** v 69, p.7-19, 2016.

SULLIVAN, R.J.; INFANTE, J.R.; JANKU, F. et al. First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study. **Cancer Discov.** v.8, p. 184-195, 2018.

SUN, H.W.; YU, X.J.; WU, W.C.; et al., GLUT1 and ASCT2 as Predictors for Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. **Plos One.** v.11 (12): e0168907, 2016.

SUNKARI, S.; BONAM, S.R.; RAO, A.V.S. et al. Synthesis and biological evaluation of new bisindole-imidazopyridine hybrids as apoptosis inducers. **Bioorg Chem.** v.87, p.484-494, 2019.

SUTTERWALA, F.S.; HAASKEN, S.; CASSEL, S.L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1319, p. 82-95, 2014.

SUZUKI, M.; ENDO, M.; SHINOHARA, F. et al. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, p. 475-484, 2010b.

SUZUKI, Y.; SHIRAI, K.; OKA, K. et al. Higher pAkt expression predicts a significant worse prognosis in glioblastomas. **J Radiat Res.** v. 51, p. 343-8, 2010.

SZABO, E.; SCHNEIDER, H.; SEYSTAHL, K. et al. Autocrine VEGFR1 and VEGFR2 signaling promotes survival in human glioblastoma models in vitro and in vivo. **Neuro Oncol**, v. 18, p. 1242-52, 2016.

TAGARAM, H.R.; DESAI, D.; LI, G. et al. A Selenium Containing Inhibitor for the Treatment of Hepatocellular Cancer. **Pharmaceuticals (Basel).** v.9, 2016.

- TALWAR, H.; BAUERFELD, C.; BOUHAMDAN, M. et al. MKP-1 negatively regulates LPS-mediated IL-1 $\beta$  production through p38 activation and HIF-1 $\alpha$  expression. **Cell Signal**. v. 34, p. 1-10, 2017.
- TAO, S.; ROJO DE LA VEJA, M.; CHAPMAN, E. et al. The effects of NRF2 modulation on the initiation and progression of chemically and genetically induced lung cancer. **Mol Carcinog**. v.57, p. 182-192, 2018.
- TAN, H.W.; MO, H.Y.; LAU, ATY. Et al. Selenium Species: Current Status and Potentials in Cancer Prevention and Therapy. **Int J Mol Sci**. v.20, p.75, 2018.
- TANG, D.; KANG R.; VANDEN BERGHE, T. et al., The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**. v. 29, p. 347–364, 2019.
- TANG, Y.; ZHAO, W.; CHEN, Y. et al. Acetylation is indispensable for p53 activation. **Cell**. v.133, p.612–626, 2008.
- TERLIZZI, M.; CASOLARO, V.; PINTO, A. et al. Inflammasome: cancer's friend or foe? **Pharmacol Ther**. v. 143, p. 24-33, 2014.
- TIANCHI, Y.; BO, T.; XUEYING, S. Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. **Yonsei Med J**. v.58, p.489-496, 2017.
- TOLEDANO, M.B.; PLANSON, A.G.; DELAUNAY-MOISAN. A. **Reining in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for safe signaling**. **Cell**. v. 140, p. 454-456, 2010.
- TOŁOCZKO-IWANIUK, N.; DZIEMIAŃCZYK-PAKIEŁA, D.; NOWASZEWSKA, B.K. et al Celińska-Janowicz K, Mityk W. Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention-Review. **Curr Drug Targets**. v. 20, p. 302-315, 2019.
- TONELLI, C.; CHIO, I.I.C.; TUVESON, D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxid Redox Signal**. v. 29, p. 1727-1745, 2018.
- TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov**. v. 8, p. 579-91, 2009.
- TSOPELAS, F.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**. v. 12, p. 885-896, 2017.
- TOUFEKTCHAN, E.; TOLEDO, F. The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure. **Cancers (Basel)**. v. 10(5):135, 2018.
- UNWITH, S.; ZHAO, H.; HENNAH, L. et al. The potential role of HIF on tumour progression and dissemination. **Int J Cancer**. v.136, p. 2491-503, 2015.
- VAN MEIR, E. G.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D. et al., Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA Cancer J Clin**, v. 60, p. 166-193, 2010.



VANAJA, S.K.; RATHINAM, V.A.; FITZGERALD, K.A. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. **Trends Cell Biol.** v. 25, p. 308-15, 2015.

VÁSQUEZ, D.; RODRÍGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C. et al. Studies on quinones. Part 46. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of aminopyrimido isoquinoline quinones. **Eur J Med Chem.** v. 45, p. 5234-5242, 2010.

VAUPEL, P.; SCHMIDBERGER, H.; MAYER, A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. **Int J Radiat Biol.** v. 95, p. 912-919, 2019.

VELIZ, I.; LOO, Y.; CASTILLO, O. et al., Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma-is there any hope for the future? **Ann Transl Med,** v. 3, p. 7, 2015.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, p.131- 149, 2003.

VOISIN, L.; SABA-EL-LEIL, M.K.; JULIEN, C. et al. Genetic demonstration of a redundant role of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 mitogen-activated protein kinases in promoting fibroblast proliferation. **Mol Cell Biol.** v.30, p. 2918-2932, 2010.

WADA, M.; CANALS, D.; ADADA, M. et al. P38 delta MAPK promotes breast cancer progression and lung metastasis by enhancing cell proliferation and cell detachment. **Oncogene.** v. 36, p. 6649-6657, 2017.

WADE, M.; WANG, Y.V.; WAHL, G.M. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. **Trends Cell Biol.** v.20, p. 299-309, 2010.

WAGHRAY, D.; ZHANG, Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. **J Med Chem.** v. 61, p. 5108-5121, 2018.

WAGNER, E.F.; NEBREDA, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nat Rev Cancer.** v. 9, p. 537-49, 2009.

WANG, C.; LI, Y.; CHEN, H. et al. Inhibition of CYP4A by a novel flavonoid FLA-16 prolongs survival and normalizes tumor vasculature in glioma. **Cancer Lett.** v. 402, p. 131-141, 2017.

WANG, H.; LUO, Q.; FENG, X. et al. NLRP3 promotes tumor growth and metastasis in human oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer.** v. 18:500, 2018.

WANG, H.; ZHANG, T.; SUN, W. et al. Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. **Cell Death Dis.** v.7(6):e2247, 2016.

WANG, J.; WU, H.; SONG, G. et al. A Novel Imidazopyridine Derivative Exerts Anticancer Activity by Inducing Mitochondrial Pathway-Mediated Apoptosis. **Biomed Res Int.** v. 4929053, 2020.

WANG, J.X.; CHOI, S.Y.C.; NIU, X. et al. Lactic Acid and an Acidic Tumor Microenvironment suppress Anticancer Immunity. **Int J Mol Sci.** v. 21, p. 8363, 2020

WANG, H.; LIU, X.; LONG, M. et al. NRF2 activation by antioxidant antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. **Sci Transl Med.** v. 8(334):334ra51, 2016b

WANG, K.; FU, X.T.; LI, Y. et al. Induction of S-Phase Arrest in Human Glioma Cells by Selenocysteine, a Natural Selenium-Containing Agent Via Triggering Reactive Oxygen Species-Mediated DNA Damage and Modulating MAPKs and Akt Pathways. **Neurochem Res.** v.41, p.1439-1447, 2016a.

WANG, L.; YANG, Z.; FU, J. et al. Ethaselen: a potent mammalian thioredoxin reductase 1 inhibitor and novel organoselenium anticancer agent. **Free Radical Biology & Medicine,** v. 52, p. 898–908, 2012.

WANG, S.S.; CHEN, Y.H.; CHEN, N.; et al., Hydrogen sulfide promotes autophagy of hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Cell Death Dis.** v.8, e2688, 2017.

WANG, Z.; FAN, M.; CANDAS, D. et al. Cyclin B1/CDK1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression. **Dev Cell.** v. 29, p. 217–232, 2014.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science,** v. 123, p. 309-314, 1956.

WAS, H.; CICHON, T.; SMOLARCZYK, R. et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. **Am J Pathol.** v. 169, p. 2181-98, 2006.

WEI, J.C.; MENG, F.D.; QU, K.; et al. Sorafenib inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of p53 and suppressing FoxM1. **Acta Pharm. Sin.** v. 36, p.241–251, 2015.

WEI, Q.; GUO, P.; MU, K. et al. Estrogen suppresses hepatocellular carcinoma cells through ER $\beta$ -mediated upregulation of the NLRP3 inflammasome. **Lab Invest.** v. 95, p. 804-16, 2015.

WELCKER, M.; ORIAN, A.; JIN, J. et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 101, p. 9085-90, 2004.

WELLBROCK, C.; KARASARIDES, M.; MARAIS, R. The RAF proteins take centre stage. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 5, p. 875-85, 2004.

WELSH, S.J.; BELLAMY, W.T.; BRIEHL, M.M. et al. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. **Cancer Res.** v. 62, p. 5089-95, 2002.

WEN, N.; GUO, B.; ZHENG, H. et al. Bromodomain inhibitor jq1 induces cell cycle arrest and apoptosis of glioma stem cells through the VEGF/PI3K/AKT signaling pathway. **Int J Oncol.** v. 55, p. 879-895, 2019.

WILHELM, S.M.; ADNANE, L.; NEWELL, P. et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. **Mol Cancer Ther.** v. 7, p. 3129–40, 2008.

WILLIAMS, G.H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol.**, v.226, p.352 - 364, 2012, 2004.

WITTIG-BLAICH, S.M. et al. Matrix-dependent regulation of Akt in hepsin-overexpression PC3 prostate cancer cells. **Neoplasia**, v. 13, p. 579-589, 2011.

WU, C. I.; WANG, H.Y.; LING, S. The Ecology and Evolution of Cancer: The Ultra Microevolutionary Process. **Annu Rev Genet**, v. 50, p. 347-369, 2016.

WU, B.; GE, J.; ZHANG, Z. et al. Combination of Sodium Selenite and Doxorubicin Prodrug Ac-Phe-Lys-PABC-ADM Affects Gastric Cancer Cell Apoptosis in Xenografted Mice. **Biomed Res Int.** 2019:2486783, 2019.

WU, J.; ZHENG, W.; RONG, L. et al. Bicyclol exerts an anti-tumor effect via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in human renal cell carcinoma cells. **Biomed Pharmacother.** v. 91, p.1184–1192, 2017.

XING, S.Q.; ZHANG, C.G.; YUAN, J.F. et al. Adiponectin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma through differential modulation of thioredoxin proteins. **Biochem Pharmacol.** v. 93, p. 221-31, 2015.

XIONG, G.; WU, Z.; YI, J. et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Res.**v. 49(W1):W5-W14, 2021.

XUE, L.; WANG, Y.; YUE, S. et al. Low MiR-149 expression is associated with unfavorable prognosis and enhanced Akt/mTOR signaling in glioma. **Int J Clin Exp Pathol.** v. 8, p. 11178-84, 2015.

YALCIN, S.; MARINKOVIC, D.; MUNGAMURI, S.K.; ZHANG, X. et al. ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. **EMBO J.** v. 29, p. 4118-31, 2010.

YAN, X.; ZHANG, X.; WANG, L. et al. Inhibition of Thioredoxin/Thioredoxin Reductase Induces Synthetic Lethality in Lung Cancers with Compromised Glutathione Homeostasis. **Cancer Res.** v. 79, p.125-132, 2019.

YANG, H.; VILLANI, R.M.; WANG, H. et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** v. 37, p. 266–0909, 2018.

YANG, S.; MAO, Y.; ZHANG, H. et al. Xu Y, An J, Huang Z. The chemical biology of apoptosis: Revisited after 17 years. **Eur J Med Chem.** v. 177, p. 63-75, 2019.

YANG, T.; ZHANG, A.; PASUMARTHY, A. et al. Nitric oxide stimulates COX-2 expression in cultured collecting duct cells through MAP kinases and superoxide but not cGMP. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 29:F891-5, 2006.

YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, p. 165–176, 2016.

YAO, A.; STORR, S.J.; AL-HADYAN, K. et al. Thioredoxin System Protein Expression Is Associated with Poor Clinical Outcome in Adult and Paediatric Gliomas and Medulloblastomas. **Mol Neurobiol.** v. 57, p. 2889-2901, 2020.

YEE, P.P.; WEI, Y.; KIM, S.Y. et al. Neutrophil-induced ferroptosis promotes tumor necrosis in glioblastoma progression. **Nat Commun.** v. 11(1):5424, 2020.

YEUNG, Y.T.; BRYCE, N.S.; ADAMS, S.; BRAIDY, N. et al. p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells. **J Neurooncol.** v. 109, p. 35-44, 2012.

YI, J.; LUO, J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. **Biochim Biophys Acta.** v. 1804, p.1684–1689, 2010.

YOUSSEF, C.; CUBILLOS-ROJAS, M.; COMALADA, M. et al. p38 $\alpha$  signaling promotes intestinal IGF-1 production and inflammation-associated tumorigenesis. **EMBO Mol Med.** v. 10:e8403, 2018.

YIN, M.B.; LI, Z.R.; TÓTH, K. et al. Potentiation of irinotecan sensitivity by S-methylselenocysteine in an in vivo tumor model is associated with downregulation of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, and hypoxia-inducible factor 1 alpha expression, resulting in reduced angiogenesis. **Oncogene**, v. 25, p. 2509-2519, 2006.

YIN, X.F.; ZHANG, Q.; CHENG Z.Y. et al. NLRP3 in human glioma is correlated with increased WHO grade, and regulates cellular proliferation, apoptosis and metastasis via epithelial-mesenchymal transition and the PTEN/Akt signaling pathway. **Int J Oncol.** v.53, p. 973-986, 2018.

YOULE, R.J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 9, p.47-59, 2008.

YOUNG, S.; SEUNG, Y.; HEE, S. et al. Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. **Mol. Cells.**, v. 29, p.327-332, 2010.

YU, C.Y.; JERRY TENG, C.L.; HUNG, P.S. et al. Ovatodiolide isolated from *Anisomeles indica* induces cell cycle G2/M arrest and apoptosis via a ROS-dependent ATM/ATR signaling pathways. **Eur J Pharmacol.** v. 819, p. 16-29, 2018.

YU, Y.; HAN, Y.; ZHANG, F. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Imidazo[1,2-*a*]pyridine Derivatives as Novel PI3K/mTOR Dual Inhibitors. **J Med Chem.** v. 63, p. 3028-3046, 2020.

YUE, X.; ZHAO, Y.; XU, Y. et al. Mutant p53 in cancer: Accumulation, gain-of-function, and therapy. **J Mol Biol.** v. 429, p. 1595–1606. 2017.

- ZAMBRANO, A.; MOLT, M.; URIBE, E. et al. Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. **Int J Mol Sci.** v. 20, p. 3374, 2019.
- ZAWACKA-PANKAU, J.; GRINKEVICH, V.V.; HÜNTEN, S. et al. Inhibition of glycolytic enzymes mediated by pharmacologically activated p53: targeting Warburg effect to fight cancer. **J Biol Chem.** v. 286, p. 41600-41615, 2011.
- ZHANG, C.; LIN, M.; WU, R. et al., Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 108, p. 16259–16264, 2011.
- ZHANG, D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. **Drug Metab Rev.** v. 38, p. 769-89, 2006.
- ZHANG, J.; LI, X.; HAN, X.; LIU, R.; FANG, J. Targeting the thioredoxin system for cancer therapy. **Trends Pharmacol Sci.** v. 38, p. 794–808, 2017.
- ZHANG, L.; HUANG, G.; LI, X. et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAIL by hypoxia-inducible factor -1 $\alpha$  in hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer.** v.2013, 2013.
- ZHANG, X.; TANG, N.; HADDEN, T.J. et al. Akt, Foxo and regulation of apoptosis. **Biochim Biophys Acta.** v. 1813, p. 1978-86, 2011.
- ZHANG, Z.Z.; LEE, E.E.; SUDDERTH, J. et al. Glutathione depletion, pentose phosphate pathway activation, and hemolysis in erythrocytes protecting cancer cells from vitamin C-induced oxidative stress. **J. Biol. Chem.** v. 291, p. 22861–22867, 2016.
- ZHAO, M.X.; WEN, J.L.; WANG, L. et al. Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species. **Cell Stress Chaperones.** v. 24, p. 609-619, 2019.
- ZHAO, X.; ZHANG, C.; HUA, M. et al. NLRP3 inflammasome activation plays a carcinogenic role through effector cytokine IL-18 in lymphoma. *Oncotarget.* v. 8(65):108571-108583, 2017.
- ZHENG, S.S.; CHEN, X.H.; YIN, X. et al., Prognostic significance of HIF-1 $\alpha$  expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. **PLoS One.** v. 8, p. 6: e65753, 2013.
- ZHENG, T.; ZHANG, B.; CHEN, C. et al. Protein kinase p38 $\alpha$  signaling in dendritic cells regulates colon inflammation and tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 115(52):E12313-E12322, 2018.
- ZHENG, Z.; LI, G. Mechanisms and Therapeutic Regulation of Pyroptosis in Inflammatory Diseases and Cancer. **Int J Mol Sci.** v. 21, p. 1456, 2020.

ZHONG, W.F.; WANG, X.H.; PAN, B. et al. Eupatilin induces human renal cancer cell apoptosis via ROS-mediated MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. **Oncol Lett.** V.12, n. 4, p. 2894-2899, 2016.

ZOHNY, S.F.; AL-MALKI, A.L.; ZAMZAMI, M.A. et al. p21<sup>Waf1/Cip1</sup>: its paradoxical effect in the regulation of breast cancer. **Breast Cancer.** v. 26, p. 131-137, 2019.

ZONNEVILLE, J.; COLLIGAN, S.; GRANT, S. et al. Blockade of p38 kinase impedes the mobilization of protumorigenic myeloid populations to impact breast cancer metastasis. **Int J Cancer.** v. 147, p. 2279-2292, 2020.

ZHU, J; THOMPSON, C.B. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 20, p. 436-450, 2019.

ZHU, P.; ZHU, J.J. Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives. **Chin Clin Oncol.** v. 6:41, 2017.

ZUO, Z.; ZHANG, P.; LIN, F. et al. Interplay between Trx-1 and S100P promotes colorectal cancer cell epithelial-mesenchymal transition by up-regulating S100A4 through Akt activation. **J Cell Mol Med.** v.22, p. 2430-2441, 2018.