

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELLA TELES BURKNER

Atividade antileucêmica de derivados de imidazo[1,2-a]piridinas *in vitro*

CAMPO GRANDE-MS

2022

GABRIELLA TELES BURKNER

Atividade antileucêmica de derivados de imidazo[1,2-a]piridina *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Investigação de alvos terapêuticos, estudos epidemiológicos e pré-clínicos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

CAMPO GRANDE – MS

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de aperfeiçoamento, saúde e disposição para enfrentar os desafios durante o processo de realização desse trabalho e por me dar coragem de seguir em frente em todos os projetos iniciados ao mesmo tempo nesse período, o de trabalhar e adquirir experiência na área e o de ser mãe.

Aos meus amigos e familiares, especialmente à minha filha que está a caminho, que mesmo ainda tão pequena tem sido meu maior incentivo de prosseguir e estudar cada vez mais.

Ao meu orientador professor Dr. Eduardo Benedetti Parisotto pela paciência, colaboração, ensinamentos e sua confiança em mim depositada para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr Edgar Julian Paredes-Gamero pelas orientações e colaboração na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho pela colaboração na realização desse trabalho.

Ao Prof Dr Jamal Rafique Khan e à Prof^a Dra. Sumbal Saba pela colaboração e contribuição na realização desse trabalho.

À prof^a Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes e à Msc Fernanda Tondello Jacobsen da Universidade Federal de Santa Catarina pelos ensinamentos e pela colaboração na realização desse trabalho.

À Dheborá Albuquerque e Kamylla Fernanda Souza de Souza por toda paciência, ensinamentos e colaboração na realização desse trabalho.

À Denise Caroline Luiz Soares Basílio pelo apoio e contribuição neste trabalho.

À aluna Anna Júlia Papa de Araujo pela colaboração neste trabalho.

À todos os docentes do programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos transmitidos.

À todos aqueles que, embora não nomeados, ofereceram apoio em distintos momentos da realização desse trabalho.

RESUMO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa e corresponde a 15% das leucemias em adultos. Compostos contendo imidazo[1,2-a]piridina têm sido amplamente utilizados na química medicinal e no desenvolvimento de fármacos porque estão correlacionados com muitas propriedades terapêuticas, incluindo como uma importante estratégia na pesquisa de agentes quimioterápicos. Esses compostos promovem estresse oxidativo nas células, induzindo assim a senescência ou morte celular por apoptose. A presente pesquisa utilizou compostos contendo imidazo[1,2-a]piridinas em linhagens de células leucêmicas e investigou os efeitos antitumorais. As imidazo[1,2-a]piridinas foram sintetizadas e a biodisponibilidade oral e toxicidade foram analisadas usando o software SwissADME e Osiris® Property Explorer, respectivamente. As linhas de células leucêmicas humanas Kasumi, KG-1, K562 e Jurkat foram cultivadas em condições apropriadas. A triagem foi realizada com base no efeito redox e o melhor perfil oxidativo foi selecionado para as etapas seguintes do estudo. O ensaio de citotoxicidade foi analisado por citometria de fluxo (fluorescência) e MTT. A proliferação celular foi avaliada por contagem de células foi realizada utilizando câmara de Neubauer. A indução da senescência foi avaliada através da expressão de SA- β -galactosidase por citoquímica. O estresse oxidativo foi avaliado por determinação da lipoperoxidação pelo ensaio de TBARS (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico) e pelo conteúdo de glutathione reduzida (GSH). A análise preditiva de toxicidade mostrou apenas um possível efeito sobre o sistema reprodutivo. No entanto, não sugere efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou de irritabilidade. MRK-107 frente às células K562 foi o derivado imidazo[1,2-a]piridina que apresentou o melhor perfil redox para os experimentos. No entanto, o MRK-107 não foi capaz de induzir a morte celular em células K562 e monócitárias. Por outro lado, este composto foi capaz de inibir a proliferação celular e induzir a senescência celular nos períodos de 48 e 72 horas. Além disso, o composto MRK-107 induziu estresse oxidativo em células K562 após 72h de exposição, aumentando peroxidação lipídica e diminuindo o conteúdo de GSH. Assim, este estudo demonstrou que a senescência induzida pelo composto MRK-107 possui envolvimento de estresse oxidativo como possível mecanismo de ação, sendo um potencial mecanismo antitumoral na quimioterapia de células cancerígenas utilizando compostos derivados de imidazo[1,2-a]piridina contra a LMC.

Palavras-chave: Leucemia,; Estresse Oxidativo; Imidazo[1,2-a]piridinas; Leucemia Mieloide Crônica; Senescência

ABSTRACT

The chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder and accounts for 15% of adult leukemia. Compounds containing imidazo[1,2-a]pyridine have been used in medicinal chemistry and drug development because are correlated with many therapeutic properties including an important strategy in drug research of chemotherapeutic agents. These compounds promote oxidative stress in cells thereby inducing senescence or apoptosis. The present scientific research used compounds containig imidazo[1,2-a]pyridines in leukemic cell lines and investigated the antitumor effects. The imidazo[1,2-a]pyridines were synthesized and the oral bioavailability and toxicity were analysed using SwissADME software and Osiris® Property Explorer respectively. Human leukemic cell lines Kasumi, KG-1, K562 and Jurkat were grown and cultivated in appropriate conditions. The screening was performed based on redox effect and the best oxidative profile was selected for the following stages of study. The citotoxicity assay was analyzed using fluorescence flow cytometry and MTT. Cell proliferation was assessed by cell counting was performed using a Neubauer chamber. After the induction of sencece was evaluated through the expression of SA- β -galactosidase by cytochemistry. Oxidative stress was evaluated by determination of lipid peroxidation using the TBARS assay (substances that react with thiobarbituric acid) and by the reduced glutathione (GSH) content. The predictive analysis showed a possible effect on the reproductive system. However, it does not suggest mutagenic, carcinogenic or irritability effects. MRK-107 against K562 cells was the imidazo[1,2-a]pyridines derivative that showed the best redox profile for the experiments. However, MRK-107 was not able to induce death in K562 and monocyte cells. On the other hand, this compound was able to inhibit cell proliferation and induced cell senescence after 72 hours. Furthermore, the MRK-107 compound induced oxidative stress in K562 cells after 72h of exposure, increasing lipid peroxidation and decreasing the GSH content. Thus, this study demonstrated that the senescence induced by the compound MRK-107 has the involvement of oxidative stress as a possible mechanism of action, being a potential antitumor mechanism in the chemotherapy of cancer cells using compounds derived from imidazo[1,2-a]pyridine against the CML.

Keywords: Leukemia, oxidative stress, imidazo[1,2-a]pyridines, chronic myeloid leukemia, senescence.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
LEUCEMIAS	10
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA	11
IMIDAZO[1,2-a]PIRIDINAS	15
ESTRESSE OXIDATIVO	18
MORTE CELULAR	20
SENESCÊNCIA CELULAR	22
REFERÊNCIAS	26
OBJETIVOS	43
Objetivo geral.....	43
Objetivos específicos.....	43
CAPÍTULO II – ARTIGO.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
PERPECTIVAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fundamentação teórica

Figura 1. Histórico e características genético-moleculares do Cromossomo Filadélfia.....	12
Figura 2. Composto Imidazo[1,2-a]piridina	15
Figura 3: Interação entre estresse oxidativo e senescência.....	23
Figura 4. Representação esquemática dos resultados obtidos no estudo.....	64

CAPÍTULO II

ARTIGO: Selenylated imidazo[1,2-a]pyridine induces cell senescence and oxidative stress in chronic myeloid leukemia cells

Figure 1. Chemical structure of the compounds studied.....	48
Figure 2. Redox screening evaluated by fluorescence intensity obtained in different leukemic cells after treatment with Imidazo[1,2-a]pyridines (10 μ M). . (*) $p < 0.05$ among analyzed compounds. (***) $p < 0.001$ among analyzed compounds.....	53
Figure 3 Effect of treatment with MRK-107 at different concentrations on cell viability and proliferation. (A) Percentage of monocyte cell viability; (B) Percentage of viability of K562 cells after MRK-7 treatment at 24, 48, and 72 hours; (C) Cell counts after MRK-7 treatment at 24, 48, and 72 hours. (***) $p < 0.001$ compared to the control group.	55
Figure 4. Percentage of senescent K562 cells after 24, 48 and 72 hours of MRK-107 incubation (10 and 100 μ M). (***) $p < 0.001$ compared to the control group.....	57
Figure 5. Oxidative stress markers in K562 cells. (A) Amount of TBARS (nmol/ml) after stimulation with MRK-107 (10 μ m and 100 μ m) in 72 hours. (B) Amount of reduced glutathione - GSH (μ mol/ml) after stimulation with MRK-107 (10 μ M and 100 μ M) at 72 hours. (*) $p < 0.05$ compared to the control group; (***) $p < 0.001$ compared to the control group.....	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

ARTIGO: Selenylated imidazo[1,2-a]pyridine induces cell senescence and oxidative stress in chronic myeloid leukemia cells

Table 1. Theoretical parameters of oral bioavailability and toxicity of compounds.....52

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

LEUCEMIAS

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública e corresponde a um conjunto de doenças que possuem em comum o crescimento de células anormais, que dividem-se rapidamente e podem atingir locais distantes do órgão afetado (INCA, 2022; WHO, 2022). As leucemias são neoplasias malignas que ocorrem em crianças e adultos, e caracterizam-se pela proliferação descontrolada de células tronco-hematopoéticas. Tal proliferação exacerbada é originada de células que sofreram mutações na sequência de bases do DNA, rearranjos cromossômicos com expressão inadequada de oncogenes, e/ou inibição de mecanismos de controle proliferativo, culminando na substituição parcial ou total de células normais por anormais na medula óssea (BAIN, 2003; HOFFBRAND e MOSS 2018). Em decorrência disso, indivíduos portadores de leucemias podem apresentar diversos distúrbios hematológicos, como hemorragias, anemias e são mais suscetíveis à processos infecciosos, pois a produção cancerosa de leucócitos anormais e imaturos afeta o sistema imunológico e leva à redução da capacidade da medula óssea de produzir hemácias e plaquetas (HOFFBRAND; MOSS 2018; The American Society of Hematology, 2020).

Existem mais de 12 tipos de leucemias, sendo as quatro principais: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLC) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (ARBER et al., 2016; INCA, 2020). Em relação à classificação do tipo de leucemia, as leucemias são divididas segundo a origem celular (mieloides e linfoides) e quanto ao estágio de maturação das linhagens celulares (agudas e crônicas) (SWERDLOW et al., 2008; ARBER et al., 2016). Nas leucemias agudas, a proliferação ocorre a partir de células primitivas mieloides ou linfoides, que perdem a capacidade de maturação. A expansão dos clones é rápida e causa insuficiência hematopoética fatal se não for instituído o tratamento. Nas leucemias crônicas, embora possam originar-se igualmente de evento oncogênico em células primitivas, a capacidade de maturação é mantida, a insuficiência hematopoética é tardia e a sobrevida dos pacientes pode atingir meses ou anos (BAIN, 2003; HOFFBRAND; MOSS, 2018; HOWLADER et al., 2016).

De fato, as leucemias estão relacionadas com elevadas taxas de mortalidade. Em âmbito nacional, 6.837 casos foram relacionados com óbito no ano de 2015. E para o

triênio de 2020 a 2022 a estimativa é de 10.810 novos casos, sendo 5.920 novos casos em homens e 4.890 em mulheres, classificando as leucemias entre os 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil, tanto para homens, quanto para mulheres (INCA, 2020).

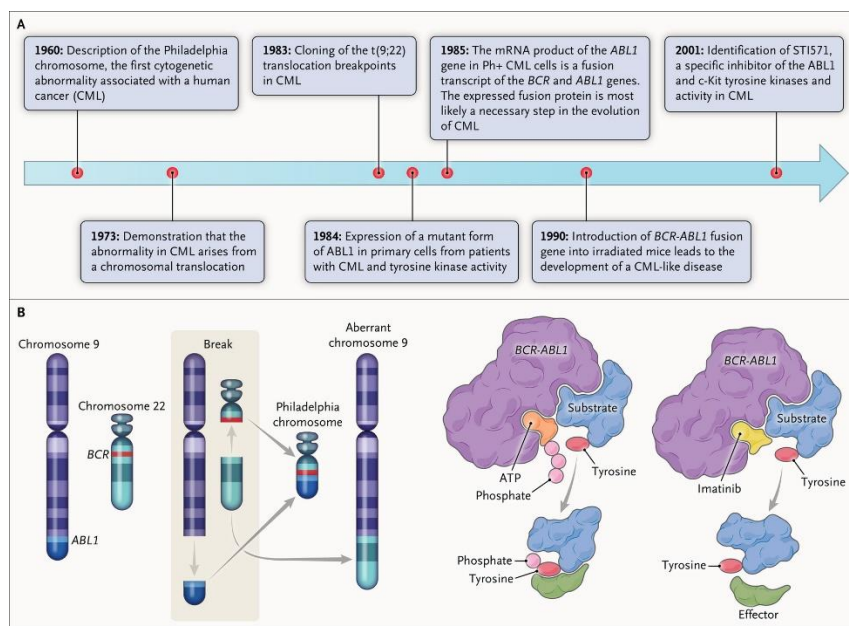
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

A leucemia mieloide crônica foi identificada como uma doença pela primeira vez em 1845 (MCCANN, 2012; BENNETT, 1845). Em 1973 foi identificado e publicado o chamado cromossomo Filadélfia (Ph), que é patognomônico para leucemia mieloide crônica (LMC).

O Ph positivo é caracterizado pela translocação entre os cromossomos 9 e 22, do gene ABL do cromossomo 9 com o gene BCR do cromossomo 22 (ROWLEY, 1973; NOWELL, 1960; GEARY, 2000). A partir dos anos 2000, com a introdução do tratamento com inibidores de tirosina quinase, como por exemplo o Imatinibe, chamados TKIs (Tirosina Kinase Inhibitors), a LMC passou de uma doença fatal para uma espécie de doença crônica para a maioria dos pacientes, e estudos recentes relatam que devido a isso a expectativa de vida da LMC se aproxima da população normal (GAMBACORTI-PASSERINI et al., 2011; HOGLUND et al., 2013).

O cromossomo Filadélfia (Ph) é imperativo para uma LMC positiva e fatores genéticos ou ambientais podem influenciar nessa fusão de pontos do cromossomo 9 no gene ABL com pontos do cromossomo 22 no gene BCR, gerando um híbrido BCR-ABL, que codifica uma proteína anormal com atividade tirosina quinase continuamente ativa na região ABL, responsável pelo desenvolvimento da leucemia (FOÁ; CHIARETTI, 2022). Não há evidências de predisposição genética e relatos de LMC familiar são raros, mas fatores como estilo de vida, tabagismo e alto índice de massa corporal foram identificados como fatores de risco para LMC (LICHTMAN, 2008; SEGEL; LICHTMAN, 2009; HEMMINKI; JIANG, 2002; WIERNIK, 2015; BJÖRKHOLM et al., 2013; LILLICRAP; STERNDAL, 1984; KASIM et al., 2005; STROM et al., 2009; KABAT et al., 2013; MUSSELMAN et al., 2013).

Figura 1. Histórico e características genético-moleculares do Cromossomo Filadélfia.



Fonte: Foá e Chiaretti, 2022.

Estudos epidemiológicos associaram aos efeitos leucemogênicos a exposição química e exposição aguda à radiação ionizante de altas doses, as quais foram identificados em vítimas de bombas atômicas no Japão após a Segunda Guerra Mundial, sendo que quase 20% das leucemias foram classificadas como LMC entre 1950 e 2001 (HSU et al., 2013; HOGLUND; SANDIN; SIMONSSON, 2015). Além disso, também foi observado um aumento da incidência de LMC em trabalhadores responsáveis pela limpeza de Chernobyl após o acidente da Usina Nuclear no ano de 1986. (GLUZMAN et al., 2006). Estudos biológicos corroboraram com essas evidências epidemiológicas para LMC induzida por radiação. Esses estudos mostraram em cultura de células hematopoiéticas, que o oncogene BCR-ABL pode resultar de altas doses de raio-X ou radiação gama e essa elevada exposição à radiação pode gerar genes específicos da leucemia (ITO et al., 1993; DEININGER et al, 1998).

Os dados de incidência de LMC variam de baixo como 0,4/100.000 pessoas em alguns países não ocidentais a 1,75/100.000 em alguns países como EUA (HARRISON; JOHNSON; HOLYOAKE, 2004; SMITH et al., 2014; BHAYAT et al, 2009; ROHRBACHER et al., 2009). Como a LMC aumenta com a idade, essa variação nos registros pode ocorrer devido a variações nas distribuições das idades populacionais dos países, questões metodológicas dos centros de registros e diferenças entre subgrupos étnicos, como já demonstrado em outros cânceres hematológicos como leucemia

linfocítica crônica e leucemia promielocítica aguda (GALE et al., 2000; MATASAR et al., 2006).

A incidência de LMC aumenta com idade, pelo menos até 75 – 80 anos. Porém, na Europa a idade média de diagnóstico da LMC é de 57 – 60 anos, o que é válido ressaltar pois as estimativas são cerca de 10 anos acima da idade média observada nos ensaios clínicos (SMITH et al., 2014; ROHRBACHER et al., 2009; ROHRBACHER; HASFORD, 2009). Em crianças, a LMC é uma doença rara com incidência muito baixa (DE LA FUENTE et al., 2014). Além disso, a LMC é mais frequente em homens que em mulheres, com uma razão entre homens e mulheres variando entre 1,2 e 1,7 em alguns estudos (ROHRBACHER; HASFORD, 2009; HÖGLUND et al., 2013; BERGER et al., 2005).

Em relação à prevalência da LMC, observa-se que o tratamento direcionado pelos TKIs possibilitou uma sobrevida a longo prazo de pelo menos 8 anos em 89% dos pacientes, o que se aproxima da expectativa de vida da população normal (PFIRRMANN et al., 2016). Dessa forma, a melhora na sobrevida com o tratamento de TKIs aumenta diretamente as taxas de prevalência da LMC (ROHRBACHER; HASFORD, 2009). Os dados de prevalência ainda são escassos, mas alguns registros indicam que uma prevalência calculada aumentou de 5,8/100.000 em 1998 para 6,8 em 2002, para 7,3 em 2003 e para 10,4 em 2007 (ROHRBACHER; HASFORD, 2009). Em um estudo Francês as taxas de sobrevida de pacientes com Ph+ foram de 44% quando diagnosticados em 1980-1986, 64% em 1987-1999 e 89% em 2000-2009 (PENOT et al., 2015).

Além disso, o aumento da prevalência associado ao aumento da sobrevida a longo prazo para pacientes em tratamento com TKIs tem sido estudado também com foco no risco de malignidades secundárias, pois foram observados uma ocorrência maior de tumores sólidos secundários como câncer gastrointestinal, nariz e garganta na “era imatinibe” do que na era pré-imatinibe (SHAH; GHIMIRE, 2014). No entanto, os estudos indicam que a ocorrência desses tumores secundários em pacientes com LMC estão diretamente relacionados à LMC subjacente do que à terapia com TKIs (GUNNARSSON et al., 2015).

A sobrevivência dos pacientes com LMC depende diretamente do sistema nacional de saúde disponível, pois os custos dos medicamentos desempenham um papel importante nas decisões da terapia e na adesão do paciente ao tratamento (VERDECCHIA et al., 2008; MENZIN et al., 2004; DARKOW et al., 2007; DALZIEL et al., 2004; MICHELI et al., 2003; CONTI; PADULA; LARSON, 2015; Experts in Chronic Myeloid

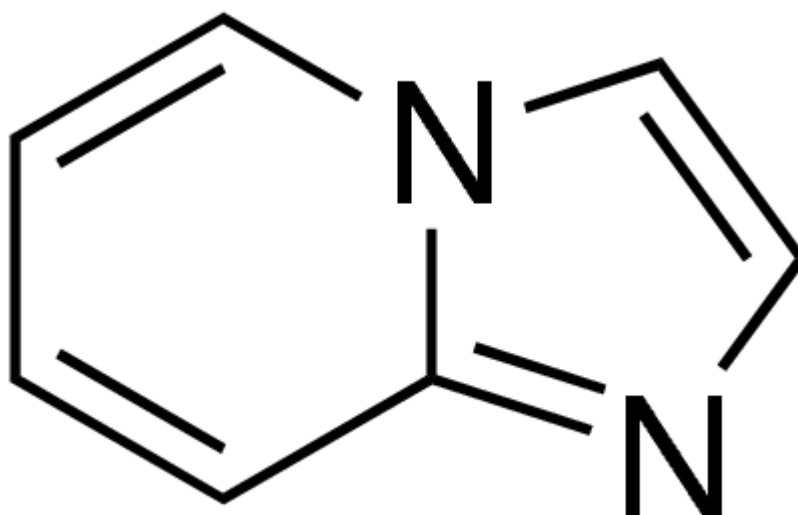
Leukemia, 2013; TARDIEU et al., 2005). Em países como os EUA, por exemplo, o custo do tratamento para os pacientes pode levar à falência econômica pessoal e essas circunstâncias podem ser motivos para a má adesão ou descontinuação do tratamento, pois é observado em estudos que cerca de 10% dos pacientes deixam de tomar os medicamentos prescritos devido aos altos custos (ROHRBACHER; HASFORD, 2009; Experts in Chronic Myeloid Leukemia, 2013). Isso sugere uma menor taxa de adesão ao tratamento nos EUA em comparação com taxas mais altas de adesão na Europa, por exemplo, na Suécia, que tem uma taxa de sobrevida em 10 anos de 80% dos pacientes com LMC devidos à política nacional de saúde (Experts in Chronic Myeloid Leukemia, 2013).

Dessa forma, especialistas em LMC desenvolveram recomendações de manejo médico para pacientes de todas as idades, de acordo com cada fase da LMC, o uso adequado dos TKIs e a avaliação das respostas citogenéticas e moleculares (BACCARANI et al., 2006; BACCARANI et al., 2009; BRECCIA et al., 2014; GUGLIOTTA et al., 2014; SEITER, 2012). A idade do paciente, as comorbidades associadas são fatores que influenciam nas decisões do tratamento. Idosos por exemplo, recebem uma dose reduzida de imatinibe em caso de outras comorbidades associadas ou outras terapias, com o objetivo de uma melhor sobrevida (BRECCIA et al., 2014; GUGLIOTTA et al., 2014; SEITER, 2012; RUSSO et al., 2013; WIGGINS et al., 2010). Apesar das recomendações de tratamento, a maioria dos pacientes idosos não recebia como primeira linha regimes de tratamento contendo imatinibe entre 2002 – 2004, mas a partir de 2006, foi observada uma mudança na terapia com imatinibe para idosos (ROHRBACHER; HASFORD, 2009). No entanto, essa população foi menos propensa ao tratamento com TKIs do que populações mais jovens (ROHRBACHER; HASFORD, 2009). Além dessa diferença de idade no tratamento com TKIs, tem sido observado que a população idosa está sub-representada na maioria dos ensaios clínicos investigacionais.

IMIDAZO[1,2-a]PIRIDINAS

Compostos contendo Imidazo[1,2-a]piridinas (IPs) têm sido amplamente utilizados na química medicinal e no desenvolvimento de fármacos (SABA et al., 2020). Esses compostos possuem um amplo espectro de atividade biológica e propriedades farmacológicas e por isso têm atraído atenção, pois apresentam propriedades interessantes na quimioterapia do câncer (DEEP et al., 2017; CHITTI et al., 2019; WANG et al., 2020). Entre as propriedades terapêuticas desses compostos destaca-se propriedade anticancerígena, anti-inflamatória, antidiabética e antimalárica (LEE et al, 2013; . CHEN et al, 2012; LEE et al, 2014). Esses compostos demonstraram ser inibidores potentes de PI3K/mTOR com excelente seletividade de quinase induzindo à parada no ciclo celular e apoptose (YU et al., 2020; ALIWAINI et al., 2019). Devido ao amplo espectro de atividade farmacológica, os IPs têm sido muito explorados, tornando-os candidatos promissores na terapia antitumoral, em doses menos tóxicas e igualmente eficazes (GOEL; LUXAMI; PAUL, 2016).

Figura 2. Composto Imidazo[1,2-a]piridina



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/275778>

Avaliações biológicas desses compostos demonstrou que são capazes de suprimir o sinal extracelular oncogênico, causando a inibição do câncer de próstata humano e proliferação celular (LI et al., 2019). Estudos relatam que as imidazopiridinas inibem a progressão do ciclo celular através da atividade inibitória da quinase, resultando em um

potente efeito antiproliferativo contra linhagens de células de câncer de mama e cólon (GHANEM et al., 2018). Foi demonstrado também que os IPs são potentes inibidores de quinase e reguladores do sinal de apoptose e contribuem para a regulação da morte celular, diferenciação celular e regulação imune (TERAO et al., 2012). Outro estudo recente demonstrou que um derivado de imidazopiridina suprimiu a fosforilação de STAT3 e foi capaz de atenuar a sobrevivência de células de hepatocarcinoma (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004).

Além dos IPs, o selênio também é um elemento químico que possui uma importância biológica. Compostos organosselenilados sintéticos modulam diversos processos biológicos, inclusive estresse oxidativo, superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), disfunção mitocondrial e danos ao DNA (NOGUEIRA; BARBOSA; ROCHA, 2021; FRIZON et al., 2020). As atividades farmacológicas desses organosselênios têm sido amplamente relatados, principalmente devido aos seus efeitos antitumorais e outras atividades tais como proteção cardiovascular, atividade antiviral e anti-Alzheimer, pois são muito bem documentados como moduladores redox e têm uma alta seletividade e sensibilidade em células malignas (FERNANDES; GANDIN, 2015; NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004; BENASSI et al., 2021; SCHEIDE et al., 2020). Os efeitos toxicológicos e quimioterápicos dos organosselênios também incluem a inibição da tiorredoxina redutase, dano ao DNA, parada no ciclo celular e apoptose, relatada em alguns estudos como o principal mecanismo de ação dos selênio-compostos (LI; HE; ZENG, 2012; BARBOSA et al., 2018; BENASSI et al., 2021; SINHA; EL-BAYOUMY, 2004). Além disso, o selênio é um composto que tem alta tolerância e baixa toxicidade biológica, o que favorece o uso em combinação com fármacos quimioterápicos (BHATTACHARYA, 2011; DE SOUZA et al., 2015).

Estudos recentes relataram um potencial efeito antitumoral de IPs selenilados e a importância desses compostos no câncer através de uma triagem em linhagens de células cancerígenas, demonstrando atividade promissora em células de câncer de mama, células de hepatocarcinoma, com citotoxicidade, inibição da proliferação, apoptose e uma seletividade para essas células tumorais em uma dose micromolar relativamente baixa (ALMEIDA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2021). Essa terapia com organosselênios pode ocorrer através da ativação de p53 induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs) e apoptose (DOS SANTOS et al., 2021). Portanto, considerando-se a importância farmacológica de ambos os compostos, a hibridização molecular dos IPs e dos organosselênios resulta em certas propriedades terapêuticas de interesse (ALMEIDA et

al., 2018; DOS SANTOS et al., 2021; VELOSO et al., 2021).

ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são importantes produtos do metabolismo celular, que participam de processos de sobrevivência, proliferação, apoptose e ciclo de vida das células, mantendo assim a homeostase (D'ARENA et al., 2019). O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de EROs, radicalares ou não-radicalares, e os mecanismos de defesa antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Esse desequilíbrio pode ocorrer por fatores fisiológicos, patológicos e pode causar apoptose celular e danos nos tecidos (BEN MAHMOUD et al., 2017).

As produção de EROs podem ser induzidas exógena e/ou endogenamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). As exógenas são causadas por substâncias externas, como radiação e drogas, enquanto que as endógenas são originadas de produtos do metabolismo aeróbico intracelular, sendo que o sistema de transporte de elétrons mitocondrial e o complexo de NADPH oxidase são as fontes primárias (AMMAR et al., 2020). Por outro lado, os organismos aeróbicos também possuem um sistema de defesa antioxidante, e a produção excessiva de EROs, quando excede a capacidade funcional dos antioxidantes celulares, pode gerar um desequilíbrio oxidativo, que é a base para processos inflamatórios, doenças cardiovasculares e câncer, por exemplo (ZELEN et al., 2010). Além disso, também podem ativar fatores como NFkB, PI3K e outras vias de sinalização que contribuem para o crescimento tumoral (DONG; ZHANG; ZHANG, 2021).

As EROs são importantes reguladores da homeostase das células hematopoiéticas, porém elevada produção de EROs podem induzir estresse oxidativo e alterar o estado metabólico dessas células, provocando alterações no microambiente hematopoiético e causar senescência ou apoptose de células hematopoiéticas (DONG; ZHANG; ZHANG, 2021). Na leucemia, durante a quimioterapia, as células tronco leucêmicas podem residir na medula óssea em um estado quiescente, escapando da ação dos quimioterápicos, causando resistência quimioterápica e recaída na leucemia (WANG; ZHONG, 2018; KONOPLEVA et al., 2009). No entanto, atualmente, muitas evidências têm demonstrado que romper essa homeostase redox existente no nicho da medula óssea, pode ser um novo tratamento para leucemia, pois nesse nicho da medula óssea, o estado de quiescência e as funções biológicas das células estão intimamente ligadas com o nível de EROs e o estado de estresse oxidativo (WARR; PIETRAS; PASSEGUE, 2011; NAIR;

TOLENTINO; HAZLEHURST, 2012).

A aplicação de agentes quimioterápicos pró-oxidantes pode causar morte das células leucêmicas pelo aumento de EROs, oxidação e mutação de proteínas, peroxidação lipídica, estresse mitocondrial e ativação do “checkpoint” do ciclo celular da fase G2/M (PRIETO-BERMEJO et al., 2018; GUACHALLA; RUDOLPH, 2010). Muitos agentes quimioterápicos utilizados no tratamento da leucemia, como vincristina e doxorubicina, por exemplo, têm como mecanismo de ação a geração de EROs (GRONINGER et al., 2002; MIZUTANI et al., 2005; ROMANO et al., 2000; KANNO et al., 2004). Dessa forma, o uso combinado de quimioterápicos pode melhorar os resultados de uma terapia pró-oxidativa na leucemia (JING et al., 2018).

As mitocôndrias são o principal local de geração de EROs intracelular, por isso direcionar as mitocôndrias é uma estratégia para interromper o equilíbrio redox das células, gerar estresse oxidativo e consequentemente promover a apoptose de células leucêmicas (SILIC-BENUSSI et al., 2018). Os altos níveis de EROs não induzem apenas à apoptose, podem induzir também à necroptose, que é favorável à superação da resistência a medicamento mediado pelo defeito apoptótico (HUANG et al., 2018; CHEN et al., 2015). Além disso, o nicho leucêmico pode proteger as células leucêmicas do estresse oxidativo e as células leucêmicas também possuem mecanismos de resistência ao estresse oxidativo e manter o equilíbrio redox, dessa forma estudos demonstram que a supressão do sistema antioxidante intracelular pode melhorar a eficácia da terapia pró-oxidativa (SCHOENEBERGER et al., 2015; HAß et al., 2016; TAN et al., 2014; LIU et al., 2011; FISKUS et al., 2014). Outros estudos também demonstraram que as células leucêmicas também aliviam o estresse oxidativo via autofagia e limpam as organelas danificadas pelo estresse oxidativo, portanto inibir a autofagia também é favorável para promover a morte de células leucêmicas (Takahashi et al., 2017; FOLKERTS et al., 2017; WU et al., 2016).

MORTE CELULAR

Em organismos multicelulares para manter a homeostase também é necessário que haja um equilíbrio entre número de células geradas por mitose e o número de células que são removidas do corpo (D'ARCY, 2019). Essa rotatividade de células é importante para o desenvolvimento de estruturas (ZAKERI; AHUJA, 1997). Os mecanismos regulatórios utilizados pelos organismos para controlar a mitose detectam anormalidades e podem dar início ao processo de morte celular programada, conhecido como apoptose, ou outras formas de morte celular controlada como a piroptose ou autofagia (D'ARCY, 2019; SOENGAS, et al., 1999).

A classificação mais utilizada de morte celular é dividida em dois tipos: apoptose e necrose (MAJNO; JORIS, 1995; KROEMER et al., 2009; GALLUZZI et al., 2007). A autofagia também é proposta como um mecanismo de morte celular, no entanto a autofagia é um processo que permite que as células privadas de nutrientes por longos períodos ou privada de fatores de crescimento sobreviva, ou seja, as células irão digerir todos os substratos disponíveis, gerando energia através da digestão de organelas e macromoléculas e morrerão, esse tipo de morte celular é chamado de “morte celular associado à autofagia (MAJNO; JORIS, 1995; KROEMER et al., 2009; GALLUZZI et al., 2007).

Outro conceito importante é o de morte celular programada, pois a morte só é programada quando é geneticamente controlada. Esse conceito possibilitou avanços no descobrimento de diversas doenças, pois a proliferação descontrolada pode resultar no desenvolvimento de doenças como câncer, ao passo que o excesso de morte celular pode resultar em doenças como Alzheimer, Parkinson e artrite reumatóide (D'ARCY, 2019). Existem várias enzimas e proteínas reguladoras nesse processo, que podem ser expressas de forma anormal quando mutadas e ter uma influência direta no ciclo celular, estimulando a apoptose ou inibindo-a, e a inibição da morte celular ou de mecanismos de morte celular pode influenciar diretamente na suscetibilidade de um câncer à quimioterapia, por exemplo, podendo resultar em resistência (D'ARCY, 2019).

Em relação à leucemia, estudos demonstram que uma expressão aumentada de algumas enzimas envolvidas no ciclo celular implicam em um prognóstico ruim em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), e em alguns casos de recaída o nível dessas enzimas é maior que os níveis iniciais quando foram diagnosticados (LANCELOT et al., 2013). Outro estudo recente também demonstrou que o microambiente encontrado

ao redor de células em necroptose direciona o comprometimento da linhagem no câncer de fígado, ou seja, o tipo de morte celular presente em determinado tecido influencia na tumorigênese (SEEHAWER et al., 2018).

A forma de morte celular controlada é conhecida como apoptose, enquanto a morte celular descontrolada é chamada de necrose (D'ARCY, 2019). A apoptose é um processo no qual uma célula deixa de se dividir e crescer resultando na morte programada da célula e é dependente de caspases (D'ARCY, 2019). Ao detectar o dano celular as caspases iniciam uma cascata de eventos que resulta em fragmentação do DNA, destruição de proteínas nucleares e citoesqueleto, expressão de proteínas para células apoptóticas e formação de corpos apoptóticos (MARTINVALET; ZHU; LIEBERMAN, 2005; POON et al., 2014). Os macrófagos normalmente removem os corpos apoptóticos antes que se fragmentem, resultando em uma contenção do tecido lesado e consequentemente diminuindo riscos de danos à outras células (D'ARCY, 2019).

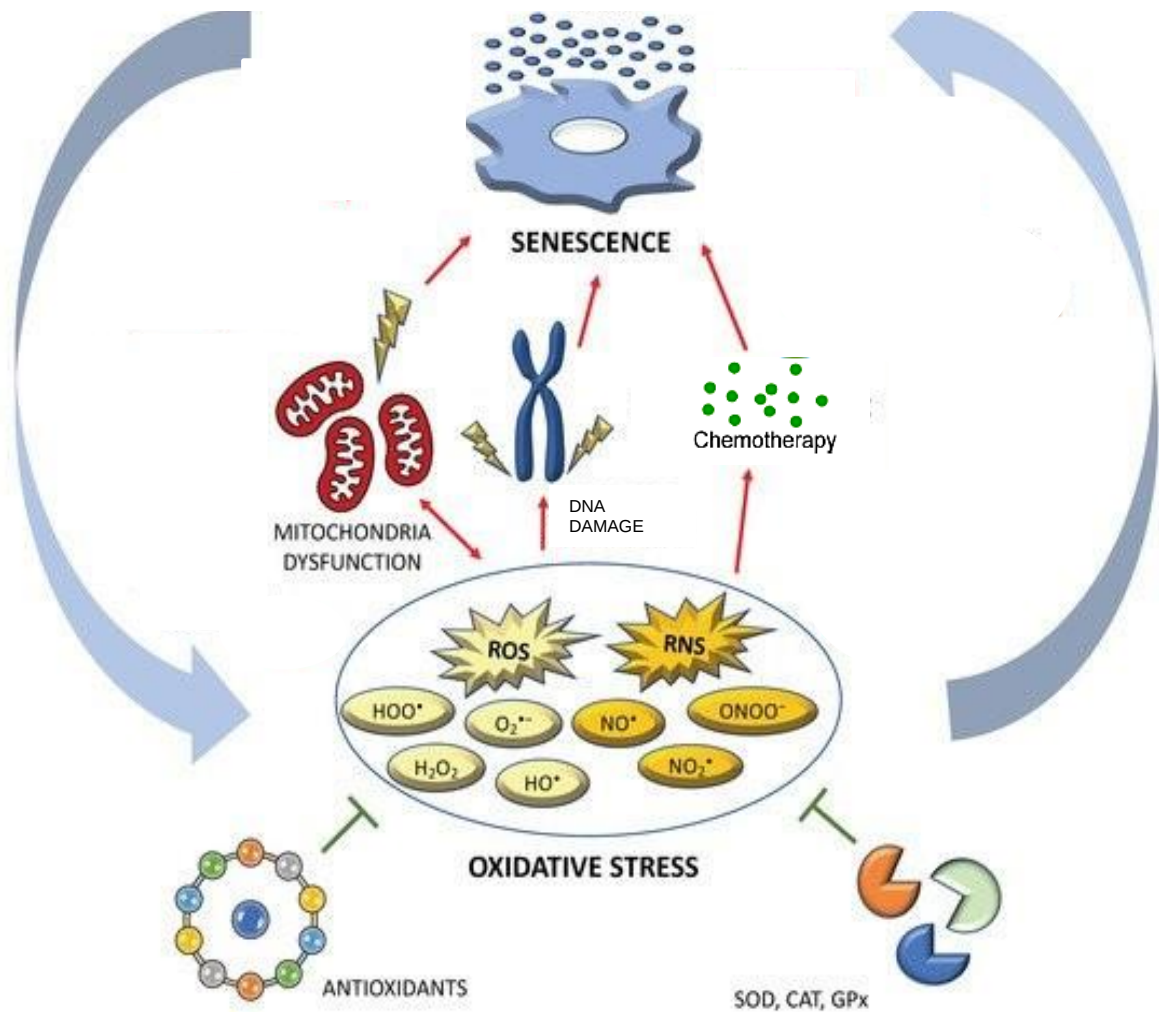
Já a necrose é uma forma de morte celular não controlada, induzida por fatores externos, hipóxia ou inflamação (ELMORE, 2007). Esse processo normalmente envolve a participação de fatores pró-inflamatórios, proteínas e compostos e resulta na ruptura da membrana celular e consequentemente derramamento do conteúdo da célula nas áreas circundantes, desencadeando a ativação da cascata de inflamação e dano tecidual. Essa morte celular é independente de energia, pois a célula é danificada por um choque súbito, como radiação, calor, produtos químicos e hipóxia, por exemplo (D'ARCY, 2019). Dessa forma, a compreensão dos mecanismos de morte celular contribui para o desenvolvimento de novas terapias clínicas e mais eficazes para o tratamento de doenças como o câncer.

SENESCÊNCIA CELULAR

A senescência celular é caracterizada pela parada do crescimento celular e que é resistente à estimulação mitogênica (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). Porém, diferente das células quiescentes essas células são capazes de entrar novamente no ciclo celular em condições favoráveis de crescimento (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). A senescência também é distinta da apoptose, sendo que umas das características das células senescentes é a resistência à apoptose (WANG, 1995). A senescência foi observada pela primeira vez em 1961 em fibroblastos diploides humanos, em que essas culturas tinham um potencial replicativo limitado, e essa proliferação prejudicada parecia estar associada a uma escassez de telômeros que induziu uma resposta persistente ao dano do DNA e sinais ativados, incluindo p53 e p16 (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961; PEREZ-MANCERA; YOUNG; NARITA, 2014). Esse mecanismo foi hipotetizado como um mecanismo fisiológico para prevenir o início do câncer, evitando a proliferação de células danificadas, pois a inibição da telomerase demonstrou inibir o crescimento do tumor em diversos camundongos (COLLADO; BLASCO; SERRANO, 2007; GONZALEZ-SUAREZ et al., 2000).

Com o envelhecimento e o acúmulo progressivo de danos ao DNA, inicia-se um estado de senescência celular que tem como objetivo principal reparar esse dano ao DNA e é denominado senescência replicativa ou senescência associada a danos ao DNA (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). A senescência replicativa ocorre após uma proliferação excessiva, quando uma célula atingiu sua capacidade replicativa e não é mais capaz de sofrer divisão celular (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). Já a senescência associada ao dano, inicialmente causa uma parada no ciclo celular para suprimir as células disfuncionais, transformadas ou envelhecidas (GORGOULIS, et al., 2019; MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014). Dessa forma, a senescência pode ser considerada um mecanismo de proteção tumoral, que impede a replicação descontrolada de células pré-cancerosas que contém alguma ativação de oncogenes ou a perda de genes supressores de tumor (SIEBEN et al., 2018).

Figura 3: Interação entre estresse oxidativo e senescência



Fonte: Adaptado de Varesi et al., 2022.

Além disso, a senescência também pode ocorrer prematuramente após a exposição a um sinal de estresse, denominada senescência prematura, senescência induzida por estresse ou senescência induzida por oncogenes (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). Os gatilhos extracelulares ou intracelulares que causam senescência prematura incluem uma dieta rica em gorduras, citocinas, radioterapia e drogas quimioterápicas podem ser chamadas de senescência induzida por terapia (TIS), EROs (estresse oxidativo), disfunção mitocondrial e ativação de oncogenes (DI MICCO et al., 2006). Esses sinais de estresse podem causar outros destinos celulares, principalmente apoptose (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020).

Também há a senescência fisiológica, associada ao desenvolvimento, que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e tem como função a remodelação tecidual eficiente (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). Essa senescência é

dependente da ativação de p21 e macrófagos infiltrantes que promovem a eliminação dessas células senescentes, e ao contrário da senescência associada à idade é independente de danos ao DNA (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). Assim, tanto a senescência associada à idade quanto à senescência durante o desenvolvimento embrionário são partes de um ciclo de limpeza-regeneração que desencadeiam remodelação tecidual e remoção de células senescentes, mantendo a homeostase do tecido (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). Esse ciclo é feito com o suporte do sistema imunológico que realiza a remoção das células senescentes, porém com o avanço da idade ocorre um declínio da resposta imunológica, denominado imunosenescência, que faz com que essas etapas não se concluam, comprometendo a depuração das células senescentes, gerando inflamação e outros efeitos prejudiciais, sendo um fator de risco relevante para o câncer (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014; MCHUGH; GIL, 2018).

Uma discussão importante no campo da oncologia é sobre o papel da senescência no câncer, pois alguns estudos apontam a senescência como um efeito disposto a parar o crescimento do tumor, como um mecanismo supressor, enquanto outros apoiam a ideia de que a senescência cria um ambiente favorável para que as células tumorais sejam protegidas da depuração imune (PEREZ-MANCERA; YOUNG; NARITA, 2014; LOWE, CEPERO; EVAN, 2004). Dessa forma, a senescência pode ser benéfica em alguns casos, quando seguida de depuração imunológica e remodelação tecidual e também pode prevenir a tumorigênese evitando a replicação de células cancerosas (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014; SERRANO et al., 1997). Porém, a relação entre idade, câncer e senescência continua sendo um grande exemplo de como a senescência pode ser prejudicial aos pacientes, pois a população idosa é propensa à patologias degenerativas e neoplásicas derivadas da perda de função celular e doenças como o câncer ocorrem em tecidos disfuncionais e o acúmulo de células senescentes, com o avanço da idade, pode piorar o estado do tecido (CAMPISI, 2013).

A senescência também pode ocorrer como um resultado da intervenção farmacológica (TIS) como citado anteriormente e pode ser um resultado vantajoso ou ter um efeito colateral indesejado, como a recaída do câncer (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020). A recaída ocorre devido à presença de células cancerígenas adormecidas que sobrevivem à terapia porque são resistentes à apoptose, e alguns estudos demonstram que células cancerosas que escaparam de TIS mostram uma alta expressão de marcadores de senescência (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO,

2020). Portanto, a senescência têm obtido a atenção de diversos estudos devido à complexidade do seu papel na progressão, desenvolvimento e prevenção do câncer, pois estudos recentes demonstram que a senescencia pode ser uma alternativa que pode impedir a progressão tumoral (BATTRAM; BACHILLER; MARTÍN-ANTONIO, 2020).

REFERÊNCIAS

Aliwaini S, Awadallah AM, Morjan RY, Ghunaim M, Alqaddi H, Abuhamad AY, 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. *Oncol Lett.* 2019, Jul; 18(1): 830–7.

Almeida GM, Rafique J, Saba S, Siminski T, Mota NSRS, Wilhelm Filho D, 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.* 2018, Sep; 503(3): 1291–7.

Ammar M, Ben Mahmoud L, Medhaffar M, Ghozzi H, Sahnoun Z, Hakim A, et al. Relationship of oxidative stress in the resistance to imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia: a retrospective study. *J Clin Lab Anal.* 2020, Feb; 34(2).

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016, May; 127(20): 2391-405.

Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperleyet J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009, Dec; 27(35): 6041–51.

Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2006, Sep; 108(6): 1809–20.

Bain BJ. Diagnósticos em leucemias. 2ª edição. Rio de janeiro: Revinter, 2003.

Barbosa FAR, Siminski T, Canto FRS, Almeida GM, Mota NSRS, Ourique F, et al. Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma. *Eur J Med Chem.* 2018, Jul. 155: 503–15.

Battram AM, Bachiller M, Martín-Antonio B. Senescence in the development and response to cancer with immunotherapy: A double-edged sword. *Int J Mol Sci.* 2020, Jun; 21(12): 4346.

Ben Mahmoud L, Mdhaaffar M, Ghozzi H, Ammar M, Hakim A, Atheymen R, et al. Oxidative stress in tunisian patients with acute lymphoblastic leukemia and its involvement in leukemic relapse. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2017, Apr; 39(3): 124–30.

Benassi JC, Barbosa FAR, Candiotto G, Grinevicius VMAS, Wilhelm Filho D, Braga AL, et al. Docking and molecular dynamics predicted B-DNA and dihydropyrimidinone selenoesters interactions elucidating antiproliferative effects on breast adenocarcinoma cells. *J Biomol Struct Dyn.* 2021, Apr; 13: 1-14.

Benassi JC, Barbosa FAR, Grinevicius VMAS, Ourique F, Coelho D, Felipe KB, et al. Novel dihydropyrimidinone-derived selenoesters as potential cytotoxic agents to human hepatocellular carcinoma: molecular docking and DNA fragmentation. *Anti-Cancer Agents in Med Chem.* 2021; 21(6): 703–15.

Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg J.* 1845; 64:413–23.

Berger U, Maywald O, Pfirrmann M, Lahaye T, Hochhaus A, Reiter A, et al. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. *Leukemia.* 2005, Jun; 19(6):984–9.

Bhattacharya A. Methylselenocysteine: a promising antiangiogenic agent for overcoming drug delivery barriers in solid malignancies for therapeutic synergy with anticancer drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011, Jun; 8(6): 749-63.

Bhayat F, Das-Gupta E, Smith C, McKeever T, Hubbard R. The incidence of and mortality from leukaemias in the UK: a general population-based study. *BMC Cancer.* 2009, Jul; 9: 252.

Björkholm M, Kristinsson SY, Landgren O, Goldin LR. No familial aggregation in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013, Jul; 122(3):460–1.

Breccia M, Luigiana L, Latagliata R, Castagnetti F, Ferrero D, Cavazzini F, et al. Age influences initial dose and compliance to imatinib in chronic myeloid leukemia elderly patients but concomitant comorbidities appear to influence overall and event-free survival. *Leuk Res*. 2014, Oct; 38(10):1173–6.

Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75: 685–705.

Chen G, Liu Z, Zhang Y, Shan X, Jiang L, Zhao Y, et al. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel benzimidazole and imidazopyridine derivatives. *ACS Med. Chem. Lett*. 2012, Nov; 4(1): 69-74.

Chen Y, Zou Z, Wu Z, Zhao Z, Luo X, Xie C, et al. TNF- α -induced programmed cell death in the pathogenesis of acquired aplastic anemia. *Expert Rev Hematol*. 2015, Aug; 8(4): 515–26.

Chitti S, Singireddi S, Reddy PSK, Trivedi P, Bobde Y, Kumar C, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-(1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)imidazo[1,2- a]pyridine analogues as antiproliferative agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2019, Sep; 29(18): 2551–8.

Collado M, Blasco MA, Serrano, M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007, Jul; 130(2): 223–33.

Conti RM, Padula WV, Larson RA. Changing the cost of care for chronic myeloid leukemia: the availability of generic imatinib in the USA and the EU. *Ann Hematol*. 2015, Apr; 94: 249–57.

D'arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019, Jun; 43(6): 582-92.

D'Arena G, Seneca E, Migliaccio I, De Feo V, Giudice A, La Rocca F, et al. Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia: Still a matter of debate. *Leuk Lymphoma*. 2019, Apr; 60(4):867–75.

Dalziel K, Round A, Stein K, Garside R, Price A. Effectiveness and cost-effectiveness of imatinib for first-line treatment of chronic myeloid leukaemia in chronic phase: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess*. 2004, Jul; 8(28): 1–120.

Darkow T, Henk HJ, Thomas SK, Feng W, Baladi JF, Goldberg GA, et al. Treatment interruptions and non-adherence with imatinib and associated healthcare costs: a retrospective analysis among managed care patients with chronic myelogenous leukaemia. *Pharmacoeconomics*. 2007; 25(6):481–96.

de la Fuente J, Baruchel A, Biondi A, de Bont E, Dresse MF, Suttorp M, et al. Managing children with chronic myeloid leukaemia (CML): recommendations for the management of CML in children and young people up to the age of 18 years. *Br J Haematol*. 2014, Oct; 167(1):33–47.

De Souza D, Mariano DOC, Nedel F, Schultze E, Campos VF, Seixas F, et al. New organochalcogen multitarget drug: synthesis and antioxidant and antitumoral activities of chalcogenozidovudine derivatives. *J Med Chem*. 2015, Apr; 58(8): 3329-39.

Deep A, Bhatia RK, Kaur R, Kumar S, Jain UK, Singh H, et al. Imidazo[1,2-a]pyridine scaffold as prospective therapeutic agents. *Curr Top Med Chem*. 2017; 17(2): 238–250.

Deininger MW, Bose S, Gora-Tybor J, Yan XH, Goldman JM, Melo JV. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res*. 1998; 58 (3):421–5.

Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006, Nov; 444(7119): 638–42.

Dong C, Zhang NJ, Zhang LJ. Oxidative stress in leukemia and antioxidant treatment. *Chin Med J*. 2021, Jul; 134(16), 1897-907.

dos Santos DC, Rafique J, Saba S, Almeida GM, Siminski T, Pádua C, 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*. 2021, Mar; 35(3).

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007, Jun; 35(4): 495–516.

Experts in Chronic Myeloid Leukemia. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. *Blood*. 2013 May;121(22):4439–42.

Fernandes AP, Gandin V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015, Aug; 1850(8): 1642–60.

Fiskus W, Saba N, Shen M, Ghias M, Liu J, Das Gupta S, et al. Auranofin induces lethal oxidative and endoplasmic reticulum stress and exerts potent preclinical activity against chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2014, May; 74(9): 2520–32.

FOÁ, Robin; CHIARETTI, Sabina. Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2022, Jun; 386(25): 2399 - 2411.

Folkerts H, Hilgendorf S, Wierenga ATJ, Jaques J, Mulder AB, Coffey PJ, et al. Inhibition of autophagy as a treatment strategy for p53 wildtype acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis*. 2017, Jul; 8(7).

Frizon TEA, Cararo JH, Saba S, Dal-Pont GC, Michels M, Braga HC. Synthesis of novel selenocyanates and evaluation of their effect in cultured mouse neurons submitted to oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2020, May.

Gale RP, Cozen W, Goodman MT, Wang FF, Bernstein L. Decreased chronic

lymphocytic leukemia incidence in Asians in Los Angeles County. *Leuk Res.* 2000, Aug; 24(8):665–9.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007, Jul; 14(7): 1237-43.

Gambacorti-Passerini C, Antolini L, Mahon FX, Guilhot F, Deininger M, Fava C, et al. Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leucemia patients treated with imatinib. *J Natl Cancer Inst.* 2011, Apr; 103 (7): 553–61.

Geary CG. A The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2000, Jul; 110(1): 2-11.

Ghanem NM, Farouk F, George RF, Abbas SES, El-Badry OM. Design and synthesis of novel imidazo[4,5-b]pyridine based compounds as potent anticancer agents with CDK9 inhibitory activity. *Bioorg Chem.* 2018, Oct; 80: 565-76.

Gluzman D, Imamura N, Sklyarenko L, Nadgornaya V, Zavelevich M, Machilo V. Patterns of hematological malignancies in Chernobyl clean-up workers (1996–2005). *Exp Oncol.* 2006; 28(1):60–3.

Goel R, Luxami V, Paul K. Imidazo[1,2-a]pyridines: Promising Drug Candidate for Antitumor Therapy. *Curr Top Med Chem.* 2016; 16(30): 3590-616.

Gonzalez-Suarez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat. Genet.* 2000, Sep; 26(1): 114–7.

Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell.* 2019, Oct; 179 (4): 813–27.

Groninger E, Meeuwssen-De Boer GJ, De Graaf SSN, Kamps WA, De Bont ESJM. Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial

controlled pathway regulated by reactive oxygen species? *Int. J. Oncol.* 2002, Dec; 21(6): 1339–45.

Guachalla LM, Rudolph KL. Ros induced DNA damage and checkpoint responses: influences on aging? *Cell Cycle.* 2010, Oct; 9(20): 4058–60.

Gugliotta G, Castagnetti F, Apolinari M, Pirondi S, Cavo M, Baccarani M, et al. First-line treatment of newly diagnosed elderly patients with chronic myeloid leukemia: current and emerging strategies. *Drugs.* 2014, Apr; 74(6): 627–43.

Gunnarsson N, Stenke L, Höglund M, Sandin F, Björkholm M, Dreimane A, et al. Second malignancies following treatment of chronic myeloid leukaemia in the tyrosine kinase inhibitor era. *Br J Haematol.* 2015, Jun; 169(5):683–8.

Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 2015, 5: 235-64.

Harrison SJ, Johnson PR, Holyoake TL. The Scotland Leukaemia Registry audit of incidence, diagnosis and clinical management of new patients with chronic myeloid leukaemia in 1999 and 2000. *Scott Med J.* 2004, Aug; 49(3): 87–90.

Haß C, Belz K, Schoeneberger H, Fulda S. Sensitization of acute lymphoblastic leukemia cells for LCL161-induced cell death by targeting redox homeostasis. *Biochem Pharmacol.* 2016, Apr; 105: 14–22.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961, Dec; 25: 585–621.

Hemminki K, Jiang Y. Familial myeloid leukemias from the Swedish Family-Cancer Database. *Leuk Res.* 2002 Jun; 26 (6): 611–3.

Hoffbrand VA, Moss PAH. *Fundamentos Em Hematologia.* 7ª edição. Porto Alegre, RS: Artmed, 2018.

Höglund M, Sandin F, Hellstrom K, Bjoreman M, Bjorkholm M, Brune M, et al.

Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population-based Swedish CML registry. *Blood*. 2013, Aug; 122(7):1284–92.

Hoglund M, Sandin F, Hellstrom K, Björemann M, Björkholm M, Bruneet M, et al. Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population-based Swedish CML registry. *Blood*. 2013 Aug;122(7):1284–92.

Hoglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol*. 2015;94: 241–7.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2016 – [Acesso em: 27/09/2022]. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.

Hsu WL, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, et al. The incidence of leukemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950–2001. *Radiat Res*. 2013 Mar;179(3):361–82.

Huang X, Xiao F, Li Y, Qian W, Ding W, Ye X. Bypassing drug resistance by triggering necroptosis: recent advances in mechanisms and its therapeutic exploitation in leukemia. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2018, Dec; 37(1).

INCA. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil – Leucemias. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> [Acesso em 27/09/2022].

INCA. O que é câncer? Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer [atualizada em 14/07/2022; acesso em 27/09/2022]. Disponível em <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>.

Ito T, Seyama T, Mizuno T, Hayashi T, Iwamoto KS, Dohi K, et al. Induction of BCR-

ABL fusion genes by in vitro X-irradiation. *Jpn J Cancer Res.* 1993, Feb; 84 (2):105–9.

Jing B, Jin J, Xiang R, Liu M, Yang L, Tong Y, et al. Vorinostat and quinacrine have synergistic effects in t-cell acute lymphoblastic leukemia through reactive oxygen species increase and mitophagy inhibition. *Cell Death Dis.* 2018, May; 9(6).

Kabat GC, Wu JW, Moore SC, Morton ML, Park Y, Hollen AR, et al. Lifestyle and dietary factors in relation to risk of chronic myeloid leukemia in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013, May; 22(5):848–54.

Kanno SI, Higurashi A, Watanabe Y, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Susceptibility to cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity in human leukemia cell lines. *Toxicol. Lett.* 2004, Sep; 152(10): 149–58.

Kasim K, Levallois P, Abdous B, Auger P, Johnson K C. Lifestyle factors and the risk of adult leukemia in Canada. *Cancer Causes Control.* 2005, Jun;16(5): 489–500.

Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z, Andreeff M. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat.* 2009; 12: 103–13.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009, Jan; 16(1): 3-11.

Lancelot J, Caby S, Dubois-Abdesselem F, Vanderstraete M, Trolet J, Oliveira G, et al. *Schistosoma mansoni* sirtuins: characterization and potential as chemotherapeutic targets. *PLOS Negl Trop Dis.* 2013, Sep; 7(9).

Lee H, Kim SJ, Jung KH, Son MK, Yan HH, Hong S, et al. A novel imidazopyridine PI3K inhibitor with anticancer activity in non-small cell lung cancer cells. *Oncol. Rep.* 2013, Aug; 30(2): 863-9.

Lee KH, Jeong D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-

oxidant activities: the selenium paradox (Review). *Mol. Med. Rep.* 2012, Feb; 5(2): 299-304.

Li DD, He J, Zeng HH. Biological evaluation of novel selenazole-based compounds as potential thioredoxin reductase inhibitors. *Applied Organometallic Chemistry*. 2012, Nov; 26(11): 619–24.

Li Y, Huang JH, Wang JL, Song GT, Tang DY, Yao F, 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*. 2019, Jul; 84(19): 12632-8.

Lichtman MA. Is there an entity of chemically induced BCR-ABL- positive chronic myelogenous leukemia? *Oncologist*. 2008, Jun;13(6):645–54.

Lillicrap DA, Sterndale H. Familial chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 1984, Sep; 2(8404): 699.

Liu JJ, Liu Q, Wei HI, Yi J, Zhao HS, Gao LP. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in adriamycin-resistant human K562 chronic myeloid leukemia cells. *Pharmazie*. 2011, Jun; 66(6): 440–4.

Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004, Nov; 432: 307–315.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995, Jan; 146(1): 3-15.

Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005, Mar; 22(3): 355–70.

Matasar MJ, Ritchie EK, Consedine N, Magai C, Neugut AI. Incidence rates of acute promyelocytic leukemia among Hispanics, blacks, Asians, and non-Hispanic whites in

the United States. *Eur J Cancer Prev.* 2006, Aug; 15(4):367–70.

McCann SR. Chronic Myeloid Leukaemia: A paradigm for malignancy or just a strange disease?. *Sultan Qaboos University Med Journal.* 2012 Nov; 12(4): 422-8.

McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.* 2018, Jan; 217(1): 65–77.

Menzin J, Lang K, Earle CC, Glendenning A. Treatment patterns, outcomes and costs among elderly patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based analysis. *Drugs Aging.* 2004; 21(11):737–46.

Micheli A, Capocaccia R, Martinez C, Mugno E, Coebergh JW, Baili P, et al. Cancer control in Europe: a proposed set of European cancer health indicators. *Eur J Public Health.* 2003, Sep;13:116–8.

Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 2005, Feb; 76(13): 1439–53.

Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014, Jul; 15(7): 482–96.

Musselman JRB, Blair CK, Cerhan JR, Nguyen P, Hirsch B, Ross JA. Risk of adult acute and chronic myeloid leukemia with cigarette smoking and cessation. *Cancer Epidemiol.* 2013;37(4):410-6.

Nair RR, Tolentino JH, Hazlehurst LA. Role of stat3 in transformation and drug resistance in CML. *Front. Oncol.* 2012.

Nogueira CW, Barbosa NV, Rocha JBT. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. *Arch of Toxicol.* 2021, Apr; 95(4): 1179–226.

Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 2004, Dec; 104(12): 6255-85.

Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960. 142:1497.

Penot A, Preux PM, Le Guyader S, Collignon A, Herry A, Dufour V, et al. Incidence of chronic myeloid leukemia and patient survival: results of five French population-based cancer registries 1980–2009. *Leuk Lymphoma*. 2015, Jun; 56(6):1771–7.

Perez-Mancera PA, Young ARJ, Narita M. Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2014, Aug; 14(8): 547–58.

Pfirschmann M, Bacarani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, et al. Prognosis of long term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016, Jan; 30(1):48–56.

Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol*. 2014, Mar; 14(3): 166–80.

Prieto-Bermejo R, Romo-González M, Pérez-Fernández A, Ijurko C, Hernández-Hernández Á. Reactive oxygen species in haematopoiesis: leukaemic cells take a walk on the wild side. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2018, Jun; 37(1).

Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, Metzgeroth G, Adam K, Lahaye T, et al. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/ BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia*. 2009, Mar; 23(3):602–4.

Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology and etiology of chronic myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009, Sep; 22(3): 295-302.

Romano MF, Lamberti A, Bisogni R, Tassone P, Pagnini D, Storti G, et al. Enhancement of cytosine arabinoside-induced apoptosis in human myeloblastic leukemia cells by NF-kappa B/Rel- specific decoy oligodeoxynucleotides. *Gene Ther*.

2000, Jul; 7(14): 1234–7.

Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973, Jun; 243:290–3.

Russo D, Malagola M, Skert C, Fili C, Bergonzi C, Cancelli V, et al. Treatment of chronic myeloid leukemia elderly patients in the tyrosine kinase inhibitor era. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013, Sep; 13(7):755–67.

Saba S, Dos Santos CR, Zavarise BR, Naujorks AAS, Franco MS, Schneider AR, et al. Photoinduced, direct C(sp²)–H bond azo coupling of imidazoheteroarenes and imidazoanilines with aryl diazonium salts catalyzed by eosin Y. *Chemistry*. 2020, Apr; 26(20): 4461–6.

Scheide MR, Schneider AR, Jardim GAM, Martins GM, Durigon DC, Saba S, et al. Electrochemical synthesis of selenyl-dihydrofurans via anodic selenofunctionalization of allyl-naphthol/phenol derivatives and their anti-Alzheimer activity. *Org Biomol Chem*. 2020, Jul; 18(26): 4916–21.

Schoeneberger H, Belz K, Schenk B, Fulda S. Impairment of antioxidant defense via glutathione depletion sensitizes acute lymphoblastic leukemia cells for Smac mimetic-induced cell death. *Oncogene*. 2015, Jul; 34(31): 4032–43.

Seehawer M, Heinzmann F, D’Artista L, Harbig J, Roux PF, Hoenicke L, et al. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer. *Nature*. 2018, Oct; 562(7725): 69–75.

Segel GB, Lichtman MA. Familial (inherited) leukemia, lymphoma, and myeloma: an overview. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:246–61.

Seiter K. Considerations in the management of elderly patients with chronic myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012, Feb; 12(1):12–9.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997, Mar; 88(5): 593–602.

Shah BK, Ghimire KB. Second primary malignancies in chronic myeloid leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014;30(4):236–40.

Sieben CJ, Sturmlechner I, van de Sluis B, van Deursen JM. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol*. 2018, Sep; 28(9): 723–37.

Silic-Benussi M, Scattolin G, Cavallari I, Minuzzo S, Del Bianco P, Francescato S, et al. Selective killing of human t-all cells: an integrated approach targeting redox homeostasis and the oma1/opa1 axis. *Cell Death Dis*. 2018, Aug; 9(8).

Sinha R, El-Bayoumy K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004, Feb; 4(1): 13-28.

Smith AG, Painter D, Howell DA, Evans P, Smith G, Patmore R, et al. Determinants of survival in patients with chronic myeloid leukaemia treated in the new era of oral therapy: findings from a UK population-based patient cohort. *BMJ Open*. 2014, Jan; 4(1).

Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53- dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*. 1999, Apr; 284(5411): 156–59.

Strom SS, Yamamura Y, Kantarjian HM, Cortes-Franco JE. Obesity, weight gain, and risk of chronic myeloid leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009, May;18(5):1501–6.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Geneva: WHO Press, 2008.

Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J. Autophagy is required for cell survival under lasparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene*. 2017, Jul; 36(30): 4267–76.

Tan Y, Bi L, Zhang P, Wang F, Lin F, Ni W, et al. Thioredoxin-1 inhibitor PX-12 induces human acute myeloid leukemia cell apoptosis and enhances the sensitivity of cells to arsenic trioxide. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(8): 4765–73.

Tardieu S, Brun-Strang C, Berthaud P, Michallet M, Guilhot F, Rousselot P, et al. Management of chronic myeloid leukemia in France: a multicentered crosssectional study on 538 patients. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2005, Aug;14(8):545–53.

Terao Y, Suzuki H, Yoshikawa M, Yashiro H, Takekawa S, Fujitani Y, et al. Design and biological evaluation of imidazo[1,2-a]pyridines as novel and potent ASK1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012, Dec; 22(24): 7326-9.

The American Society of Hematology.[Atualizada em: outubro de 2020. Acesso em: Agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.hematology.org/>.

Veloso IC, Delanogare E, Machado AE, Braga SP, Rosa GK, Fabro de Bem A, et al. A selanylimidazopyridine (3-SePh-IP) reverses the prodepressant- and anxiogenic-like effects of a high-fat/high-fructose diet in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2021, Mar; 73 (5): 673–81.

Verdecchia A, Baili P, Quaglia A, Kunkler I, Ciampichini R, Berrino F, et al. Patient survival for all cancers combined as indicator of cancer control in Europe. *Eur J Public Health*. 2008;18(5): 527–32.

Wang A, Zhong H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2018, Dec; 23(10): 729–39.

Wang E. Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to

Suppress bell Is Involved. *Cancer Res.* 1995, Jun; 55(11): 2284–92.

Wang J, Wu H, Song G, Yang D, Huang J, Yao X, et al. A novel Imidazopyridine derivative exerts anticancer activity by inducing mitochondrial pathway-mediated apoptosis. *BioMed Res Int.* 2020, Aug.

Warr MR, Pietras EM, Passegue, E. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2011; 3(6): 681–701.

WHO. Cancer. World Health Organization. 2022 [atualizado em 3 February 2022; acesso em 27/09/2022]. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/en/>.

Wiernik PH. Familial leukemias. *Curr Treat Options Oncol.* 2015, Feb;16 (2): 8.

Wiggins CL, Harlan LC, Nelson HE, Stevens JL, Willman CL, Libby EN, et al. Age disparity in the dissemination of imatinib for treating chronic myeloid leukemia. *Am J Med.* 2010, Aug; 123(8): 764–9.

Wu X, Feng X, Zhao X, Ma F, Liu N, Guo H, et al. Role of beclin-1-mediated autophagy in the survival of pediatric leukemia cells. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 39(5): 1827–36.

Yu Y, Han Y, Zhang F, Gao Z, Zhu T, Dong S, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives as novel PI3K/mTOR dual inhibitors. *J Med Chem.* 2020, Mar; 63(6): 3028 – 46.

Zakeri ZF, Ahuja HS. Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. *Mut Res.* 1997, Dec; 396(1): 149–61.

Zelen I, Djurdjevic P, Popovic S, Stojanovic M, Jakovljevic V, Radivojevic S, et al. Antioxidant enzymes activities and plasma levels of oxidative stress markers in B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Buon.* 2010; 15(2): 330–6.

Zou B, Nagle A, Chatterjee AK, Leong SY, Tan LJ, Sim WLS, et al. Lead optimization of imidazopyrazines: a new class of antimalarial with activity on Plasmodium liver stages. *ACS Med Chem Lett.* 2014, Aug; 5(8): 947-50.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a capacidade antileucêmica de derivados de derivados de imidazo[1,2-a]piridinas em linhagens de leucemia humana a partir de uma triagem pró-oxidante.

Objetivos específicos

- Avaliar a biodisponibilidade oral e toxicidade através da análise *in silico*;
- Incubar as células com diferentes concentrações de derivados de imidazo[1,2-a]piridinas e avaliar a geração de EROs;
- Selecionar o(s) derivado(s) de imidazo[1,2-a]piridinas mais promissores, que apresentarem o melhor perfil oxidativo/citotóxico/senescente para os ensaios posteriores;
- Avaliar a viabilidade celular (citotoxicidade) do(s) composto(s) selecionado(s);
- Avaliar o potencial indutor de senescência do(s) composto(s) selecionado(s);
- Verificar a participação do estresse oxidativo como mecanismo de morte/senescência celular.

CAPÍTULO II – ARTIGO

Selenylated imidazo[1,2-a]pyridine induces cell senescence and oxidative stress in chronic myeloid leukemia cells

Gabriella Teles Burkner¹, Dhébora Albuquerque Dias¹, Kamylla Fernanda Souza de Souza^{1,2}, Anna Júlia Papa de Araújo¹, Denise Caroline Luiz Soares Basilio¹, Fernanda Tondello Jacobsen³, Ana Carolina Rabello de Moraes³, Saulo Euclides Silva-Filho¹, Sumbal Saba⁵, Maria Lígia Rodrigues Macedo¹, Edgar Julian Paredes-Gamero¹, Jamal Rafique^{4*}, Eduardo Benedetti Parisotto^{1*}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

³Departamento de Análises Clínicas (ACL), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

⁴Instituto de Química (INQUI), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

*Corresponding authors:

Jamal Rafique
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).
Instituto de Química (INQUI),
Av. Costa e Silva – Bairro Universitário. CEP: 79070-900 - Campo Grande, MS -
BRASIL.
e-mail: jamal.chm@gmail.com ; jamal.rafique@ufms.br
ORCID: 0000-0002-2336-040X

Eduardo Benedetti Parisotto
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN).
Av. Costa e Silva – Bairro Universitário. CEP: 79070-900 - Campo Grande, MS -
BRASIL.
E-mail: eduardo.parisotto@ufms.br; parisotto.edu@gmail.com
ORCID: 0000-0001-5934-0323

Abstract

The chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder and accounts for 15% of adult leukemia. Compounds containing imidazo[1,2-a]pyridine have been used in medicinal chemistry and drug development because are correlated with many therapeutic properties including an important strategy in drug research of chemotherapeutic agents. These compounds promote oxidative stress in tumor thereby inducing senescence or apoptosis. The present scientific research used compounds containig imidazo[1,2-a]pyridines in leukemic cell lines and investigated the antitumor effects. The imidazo[1,2-a]pyridines were synthesized and the oral bioavailability and toxicity were analysed using SwissADME software and Osiris® Property Explorer respectively. Human leukemic cell lines Kasumi, KG-1, K562 and Jurkat were grown and cultivated in appropriate conditions. The screening was performed based on redox effect and the best oxidative profile was selected for the following stages of study. The citotoxicity assay was analyzed using fluorescence flow cytometry and MTT. Cell proliferation was assessed by cell counting was performed using a Neubauer chamber. After the induction of senscence was evaluated through the expression of SA- β -galactosidase by cytochemistry. Oxidative stress was evaluated by determination of lipid peroxidation using the TBARS assay (substances that react with thiobarbituric acid) and by the reduced glutathione (GSH) content. The predictive analysis showed a possible effect on the reproductive system. However, it does not suggest mutagenic, carcinogenic or irritability effects. MRK-107 against K562 cells was the imidazo[1,2-a]pyridines derivative that showed the best redox profile for the experiments. However, MRK-107 was not able to induce death in K562 and human monocyte cells. On the other hand, this compound was able to inhibit cell proliferation and induced cell senescence after 72 hours. Furthermore, the MRK-107 compound induced oxidative stress in K562 cells after 72h of exposure, increasing lipid peroxidation and decreasing the GSH content. Thus, this study demonstrated that the senescence induced by the compound MRK-107 has the involvement of oxidative stress as a possible mechanism of action, being a potential antitumor mechanism in the chemotherapy of cancer cells using compounds derived from imidazo[1,2-a]pyridine against the CML

Keywords: Leukemia, oxidative stress, imidazo[1,2-a]pyridines, chronic myeloid leukemia, senescence.

Introduction

Leukemia is a set of malignant disorders that present an excess of white blood cells in the blood and/or bone marrow [1]. There is a range of hematopoietic malignancies currently subcategorized according to their morphology, immunophenotype, cytogenetic and molecular abnormalities, and clinical features [2].

The chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm and accounts for 15% of adult leukemias [3]. Since the introduction of imatinib in 2000, the annual mortality has decreased from 10-20% down to 1-2% [3]. Despite the success of this therapy, the prevalence of CML has increased and has been suggested that in 2040 the incidence rate and mortality rate will balance [4, 5]. However, the cure of CML is functionally not molecular because imatinib does not act directly on the bases of CML, but competing for the ATP binding site of tyrosine kinase, restoring cell death mechanism [6]. Therefore, it is important to continue research of therapies that increase the rate of complete answer and that improve the eradication of minimal residual disease, with fewer side effects and less toxicity.

Compounds containing imidazo [1,2-a] pyridines have been largely used in medicinal chemistry and drug development because this compounds are correlated with many therapeutic properties, including anticancer [7], anti-inflammatory [8], antidiabetic [9] and antimalarial [10]. Owing on the pharmacological importance of imidazo[1,2-a]pyridines and biological relevance of organochalcogenides, the molecular hybridization of these two moieties results in some interesting therapeutic properties [11-13]. The properties of imidazo [1, 2-a] pyridine derivatives have been related to an important strategy in drug research as novel chemotherapeutic agents, because they can increase the anticancer effect in less toxic and equally effective doses, taking the DNA and cell death [14].

Imidazo[1,2-a]pyridine proved to be potent P3IK/mTOR inhibitors with excellent kinase selectivity, inducing cell cycle arrest and apoptosis [15]. On the other hand, organoselenium compounds modulate many biological processes, including oxidative stress, overgeneration of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial dysfunction and DNA damage [14,16]. Considering the pharmacological importance of imidazo[1,2-a]pyridine and the biological importance of organoselenides, molecular hybridization of this two moieties results in certain therapeutic properties, and recently there were reported the potencial antitumor effect of selenylated imidazo[1,2-a]pyridines, in such way

showing promising activity on breast cancer cells [11], hepatocarcinoma cells [12], with cytotoxicity, inhibition of proliferation, apoptosis, and selectivity of tumor cells at the relatively low micromolar range. These effects were related to oxidative damage and inhibition of proteins involved in cell proliferation pathways.

As imidazo[1,2-a]pyridines induce oxidative stress in tumor cells [11,12], we hypothesized their involvement in the antiproliferative mechanism by inducing senescence of leukemic cells. Cell senescence is a programmed arrest of growth preventing cell proliferation [17]. Thus, when apoptosis does not induce cancer cell death, the induction of cell senescence is an alternative for tumor suppression [18].

The main goal of the present research is the search of new drugs for treatment of myeloid chronic leukemia. Considering that oxidative stress, induction of apoptosis, and senescence are important process involved in response of cancer cells therapy, we used compounds of imidazo[1,2-a]pyridine in leukemic cell lines to investigate its antitumor effects with interest on a potential chemotherapeutic activity against the CML.

Materials and Methods

2.2. Synthesis of imidazo[1,2-a]pyridines and chalcogenated derivatives

The starting material, imidazo[1,2-a]pyridine MRK-115, was synthesized by refluxing 2-amino-4-methylpyridine 4 and bromoacetophenone 5 in ethanol for 4 h [20]. A series of chalcogenated imidazo[1,2-a]pyridine (MRK-107, MRK-113, MRK-116) were synthesized through C(sp²)-H bond selenylation/sulfenylation of imidazo[1,2-a]pyridines MRK-115 using diorganyl diselenides/disulfides (**Figure 1**), as previously described by Rafique and collaborators [21-24] .

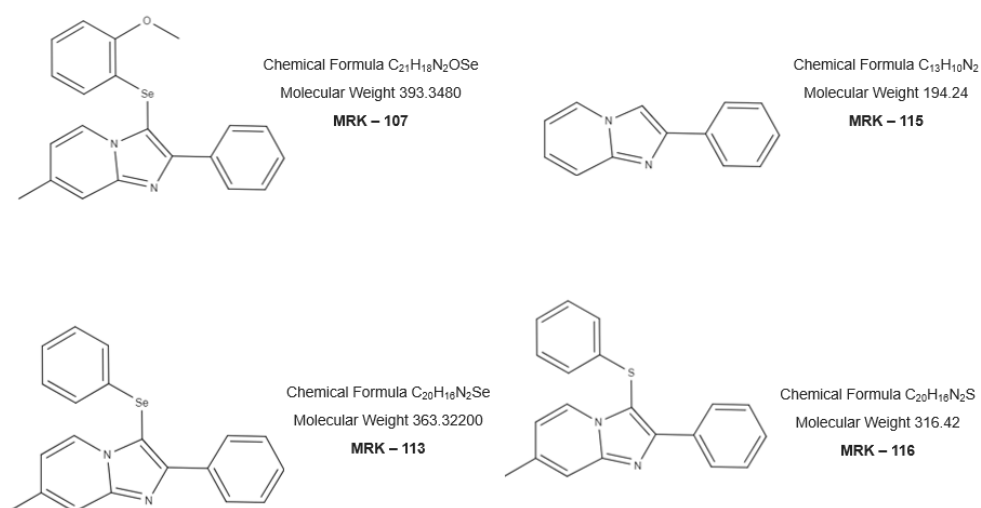


Figure 1. Chemical structure of the compounds studied.

Oral bioavailability and toxicity of compounds: *in silico* analysis

The oral bioavailability of the compounds was evaluated using the SwissADME software, an online tool developed by the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) which is available at <http://www.swissadme.ch/> that predictively evaluates the pharmacokinetics, based on the similarity to medicines and the medicinal chemical compatibility of compounds. Compounds were evaluated according to criteria established by Lipinski et al. (1997) [25] and Veber et al. (2002) [26], namely: mLogP, molecular weight (MW), number of hydrogen bond acceptors (N and O atoms), number of hydrogen bond donors (NH and OH radicals), number of rotatable bonds and area of polar surface (TPSA).

Toxicity tests were performed using Osiris® Property Explorer, a free program that, by analyzing the chemical structure of compounds, shows relevant properties of drugs and possible drugs. The properties evaluated were: mutagenicity, tumorigenicity, irritability and negative effects on reproduction.

Cell Culture

Human leukemic cell lines used were Jurkat (Acute lymphocytic leukemia-ALL), K562 (MCL), KG1 (Acute Myeloid Leukemia -AML) and Kasumi (AML) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). KG-1 cells were maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil). The other lineages were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich, Germany) medium supplemented with 10% FBS. All cells

were cultured in medium containing 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, Germany) and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Germany) and in a humidified incubator containing 5% CO₂ at 37°C. The passage numbers for all leukemic cell lines were between 3 and 6.

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from three healthy donors (human monocytes). All human volunteers provided informed consent. Separation of mononuclear cells was performed by gradient centrifugation methods using Ficoll Histopaque-1077 (1.077 g/cm³) (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. The use of human samples was approved by the local Ethical Committee of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CAAE35853720.2.0000.0021). The cells were maintained in IMDM supplemented with 20% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO₂.

Redox effect screening: measurement of intracellular ROS

Initially, the screening of imidazo[1,2-a]pyridines and leukemia cells was performed based on the redox effect. Then, the leukemic strain most responsive to treatments with the compounds (best oxidative profile) was selected for the following stages of the study. Intracellular ROS content were evaluated as reported by [27]. Human leukemic cell lines were incubated for 12 h with imidazo[1,2-a]pyridines (10 µM), washed twice with HBSS, and then 100 µl of HBSS/well was added. After, the cells were loaded with DCFH-DA (10 µM) in HBSS at 37 °C and incubated for 30 min. Excess DCFH-DA was removed by washing with fresh HBSS. The intensity of fluorescence was measured at 485 nm for excitation and 530 nm for emission using a Multiscan microplate reader (Thermo Fisher Scientific Oy®).

Cytotoxicity assay

The MTT assay was performed according to Mosmann (1983) [28] and using human monocytes. Briefly, monocytes were dispensed in 96-well culture plates and placed in an incubator at 37 °C, 5% CO₂. After 24 h, MRK-107 (10, 50, and 100 µM/mL, 100 µL) was diluted in IMDM medium and added. As a negative control, cells were maintained without stimuli. After 48 h, the supernatant was removed, 10 µL of MTT solution (5 mg/mL) were added to the remaining cells, and the plate incubated for 2 h. The medium containing MTT was removed and lysis solution (200 µL of DMSO) was added to each well and homogenized. After 20 min, the absorbance was read at 540 nm

in an ELISA reader (HumanReader HS). The results were expressed as percentage values (%) of viable cells compared to the control group.

Cell death assay

K562 cells were plated (10^5 cells/mL) and stimulated with the MRK-107 (0-200 μ M) for 24, 48 and 72 h. After this period, the cells were washed and resuspended in the buffer solution (0.01 M HEPES, pH = 7.4, 0.14 M NaCl, and 2.5 mM CaCl_2). The suspensions were labeled with propidium iodide (PI) (Becton Dickinson) according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated at room temperature for 20 min. A total of 10,000 events were collected per sample. Flow cytometry evaluation was performed in a flow cytometer (Cytotflex Beckman counter[®]). Data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star Inc).

Cell proliferation assay

K562 cells were incubated with MRK-107 at concentrations of 10 and 100 μ M for 24, 48 and 72 h. Cell counting was performed using a Neubauer chamber [29]. The growth constant was calculated using the logistic growth equation.

Senescence assay

Induction of senescence was assessed by measuring SA- β -galactosidase (β -Gal) activity using the senescence cells cytochemical method was conducted as described by Dimri et al. 1995 [30]. K562 cells were plated (10^5 cells/mL) and stimulated with the MRK-107 (10 and 100 μ M) for 24, 48 and 72 h. After, the cells were washed in PBS and incubated at 37°C (no CO_2) with fresh senescence associated stain solution: 1 mg of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal) per ml [stock = 2mM MgCl_2 , 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ PBS buffer, pH 7.4]. Cell staining and morphology were assessed by microscopy after 12 hours (microscope: Leica[®]). Results were expressed as percentage of senescent cells.

Oxidative stress markers

Oxidative stress markers were evaluated in K562 cells treated with MRK-107 compound (10 and 100 μ M) for 72 hours [31]. The cells were homogenized in a cold bufer containing 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.1% Triton and 150 mM NaCl (48×10^6 per 600 μ L), except for the reduced glutathione assay that was homogenized in

a TCA 12% solution. The determinations were performed using the supernatant after centrifugation (5000g for 5 min).

Lipid Peroxidation Assessment

The endogenous lipid peroxidation was evaluated in the tests by detection of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), particularly malondialdehyde (MDA), according to the method described by Bird and Draper (1984) [32]. Briefly, the homogenate was precipitated with 12% TCA, followed by incubation in bufer (60 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid) and 0.73% thiobarbituric acid, at 100 °C, for 60 min. After cooling, the samples were centrifuged (5 min at 10,000g) and the absorbance of the chromophore was measured at 535 nm. The results were expressed in nmol TBARS/mL.

Reduced glutathione assay (non-protein thiols)

The reduced glutathione (GSH) contents were determined from acid extracts in 12% TCA, using the reagent DTNB (5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid), according to Beutler et al. (1963) [33]. After being centrifuged at 5000g for 5 min, the supernatants from the acid extracts [12% TCA, 1:10 w/v] were added to 2.5 mM DTNB in 0.2 M sodium phosphate bufer, pH 8.0, and the formation of the yellow thiolate anion was immediately measured at 412 nm. Determinations were expressed in $\mu\text{mol/mL}$.

Statistical Analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD).The data were analyzed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni or Tukey-Kramer test. Values of were considered statistically significant. Statistical analysis was obtained from three independent experiments and was performed by GraphPad Prism software, version 8.0 (San Diego, USA).

Results and Discussion

The parameters of oral bioavailability and toxicity evaluated using the SwissADME software and Osiris® Property Explorer respectively, are shown in **Table 1**. According to this analysis only one presented violation of the Lipinsk rules [25].

Table 1. Theoretical parameters of oral bioavailability and toxicity of compounds.

Compound	mLogP	MW (g/mol)	n° of violations	Mutagenicity	Tumorigenicity	Irritability	Effects on reproduction	Absorption in the GIT
MRK-107	3,37	393,34	0	-	-	-	Yes	High
MRK-113	3,76	363,31	0	-	-	-	Yes	High
MRK-115	2,54	208,26	0	-	-	-	Yes	High
MRK-116	4,61	316,42	1 (mLogP > 4,15)	-	-	-	Yes	High

Note: MW: molecular weight; GIT: gastrointestinal tract

According to Lipinski and colleagues (1997) these rules are related to the molecular properties that are necessary for the studied compound to present good physicochemical characteristics such as solubility, intestinal permeability and oral bioavailability [25]. Therefore, only the compound MRK-116 can present problems with solubility, oral bioavailability and consequently absorption, because of a mLogP higher than the ideal value of 4,15. All the other compounds showed promising oral bioavailability.

In addition, about the toxicity all the compounds presented low risk for all the parameters evaluated, such as mutagenicity, tumorigenicity, irritability and effects on reproduction. Therefore, all the compounds were considered promising in the *in silico* studies. Consequently, *in vitro* studies were initiated to evaluate the antileukemic potential of imidazo[1,2-a]pyridines.

The generation of ROS is necessary for normal cell function, but it may also be suggested in cancer therapy. Therefore, cell lines from leukemic models were incubated with imidazopyridine compounds to assess the potential of these compounds to induce intracellular ROS generation. Cells were exposed to the same concentration of 10 μ M and analyzed by fluorescence. The cells used in the screening were Jurkat (Acute lymphocytic leukemia-ALL), K562 (MCL), KG1 (Acute Myeloid Leukemia -AML) and Kasumi (AML) (**Figure 2**).

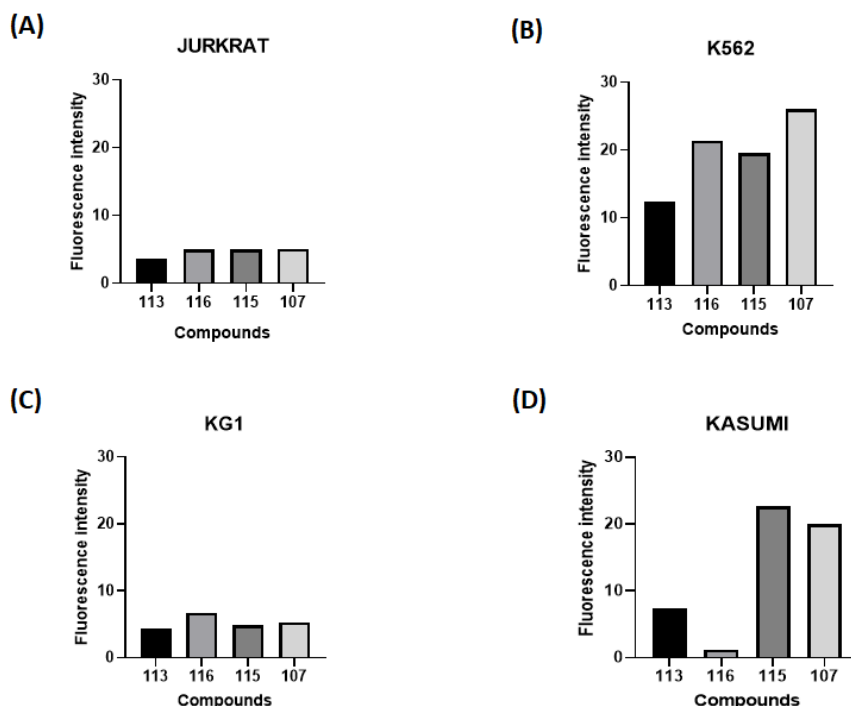


Figure 2. Redox screening evaluated by fluorescence intensity obtained in different leukemic cells after treatment with Imidazo[1,2-a]pyridines (10 μ M). . (*) $p < 0.05$ among analyzed compounds. (***) $p < 0.001$ among analyzed compounds.

As can be observed in **Figure 2**, the cell line K562 (3B) showed the highest fluorescence intensity, as well as the highest rate of intracellular ROS, notably the marker 107. The application of ROS in the therapeutic field of hematopoietic cancer cells has been linked to a therapeutic mechanism, as anticancer drugs induce an increase in ROS generation, leading cancer cells to apoptosis or senescence [34, 35]. Thus, the K562 and MRK-107 cell lines were selected for the following assays, as the MRK 107 was the imidazo[1,2-a]pyridine compound that showed the best oxidative profile.

In the cell viability assay, MRK-107 was tested at different concentrations in monocytes. MRK-107 at concentrations of 10, 50, and 100 $\mu\text{M/mL}$ presented cell viability of 89.93, 86.66, and 87.53%, respectively (**Figure 3A**), indicating that MRK-107 did not induce cytotoxicity in any tested concentrations.

The assay was performed to assess cell viability and to evaluate the cytotoxic and proliferative effects induced by MRK 107, which could eventually lead to cell death. The cells K562 were stimulated with the MRK-107 for 24, 48 and 72 hours and analyzed by flow cytometry (**Figure 3B**). The test demonstrated that the administration of MRK-107 was not time-dependent, as cell viability was not significantly affected, suggesting that cell death by apoptosis did not occur. However, the proliferation assay (**Figure 3C**) showed that after 72 hours there was a significant reduction in cell count, demonstrating that MRK 107 induced an inhibition of cell proliferation.

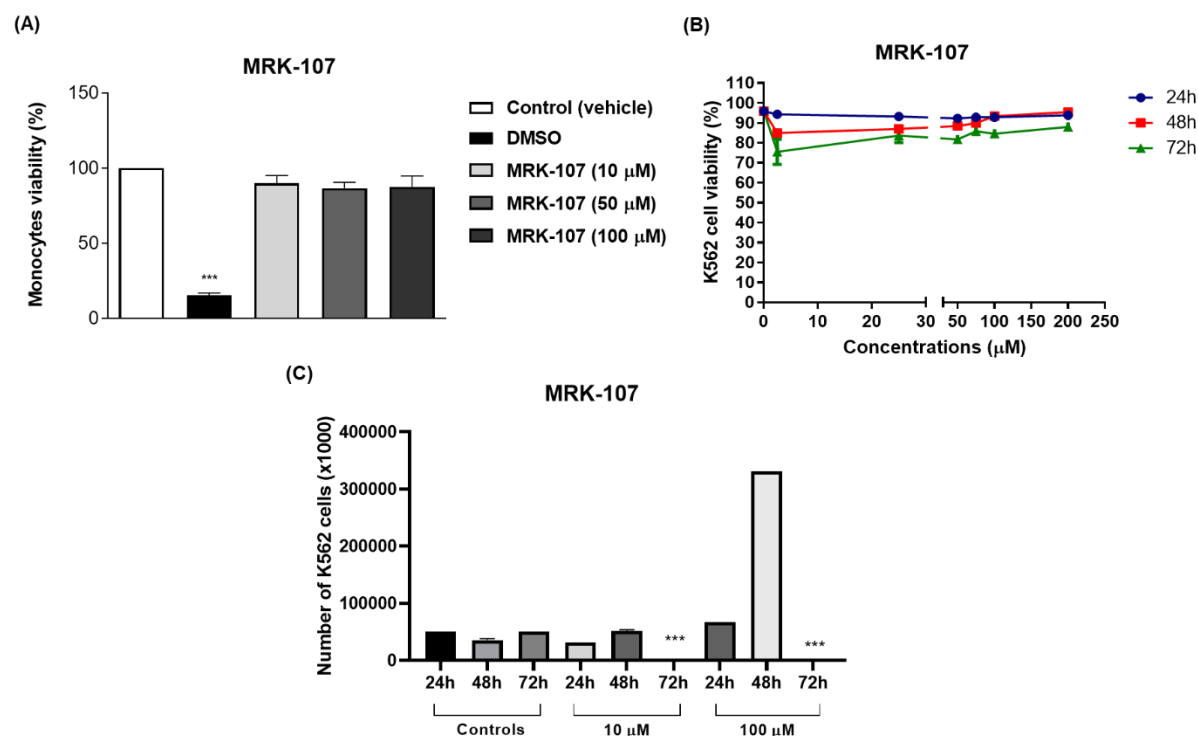


Figure 3 Effect of treatment with MRK-107 at different concentrations on cell viability and proliferation. **(A)** Percentage of monocyte cell viability; **(B)** Percentage of viability of K562 cells after MRK-7 treatment at 24, 48, and 72 hours; **(C)** Cell counts after MRK-7 treatment at 24, 48, and 72 hours. (***) $p < 0.001$ compared to the control group.

The results obtained corroborated those of Santos and collaborators who, through the analysis of a compound derived from selenylated imidazopyridine, obtained a significant reduction in cell counts when compared to cells not treated with the compound, that is, they reported that imidazopyridine derivatives have an antiproliferative potency in the cells of glioblastoma [36]. Another study by Almeida and collaborators using the same imidazopyridine-derived compound, demonstrated an inhibition of cell growth in 90% of breast cancer cell line when compared to untreated controls [11]. Another study carried out by Santos and collaborators also evaluated the oxidative damage and the antiproliferative effect of selenylated imidazo[1,2-a]pyridines in hepatocarcinoma cell lines and obtained a reduction in the proliferative capacity of 80% after 72 hours, that is, also corroborating that compounds derived from imidazopyridines induce a state of cell death [12]. Therefore, the study was continued to evaluate the mechanism of senescence.

The percentage of senescent cells in 48 and 72 hours (**Figure 4**) at two non-toxic concentrations of MRK-107 was significantly higher than 50%, which indicates that the administration of this compound is able to induce cells to senescence, thereby being a desired and consistent effect for chemotherapy.

It is well known that senescence is one of the tumor suppressor mechanisms and that it

causes an irreversible interruption of cell proliferation and that this condition can be induced in response to chemotherapy [37, 38, 39]. Senescence is a mechanism that causes the cell cycle to stop in order to potentially inhibit cell cycle progression and consequently allow the proliferation of dysfunctional or transformed cells to occur [40,41].

The mechanisms that cause senescence are broad and include ROS overgeneration, DNA-damage, mitochondrial dysfunction [19], while the use of radiotherapy and chemotherapy drugs for example, is known as “therapy-induced senescence” [40]. Guo and collaborators (2010) published that a treatment with hydrogen peroxide (H_2O_2), which induces oxidative stress, resulted in 80% of mouse embryonic fibroblasts to become senescent, which corroborates the present study, since MRK 107 showed a high rate of intracellular ROS in K562 cells, as well as a significant higher rate of senescent cells after treatment with the respective marker [42]. Accordingly, Zhong and collaborators (2019) in a study with breast cancer cells, also demonstrated that oxidative stress mediated by H_2O_2 treatment also caused an induction of senescence in these cells [43].

In addition, a review study on hydroxyurea (HU), an antineoplastic drug widely used in neoplastic and non-neoplastic conditions, reported that the compound is able to reduce cell proliferation as it can induce a state of cell senescence [44]. According to some related studies, HU promotes a deficiency of proteins that regulates oxidative stress, thus contributing to the elevation of ROS and, consequently, to the establishment of cellular senescence [45, 46, 47]. These findings are well in line with the data obtained in the present study, as they indicate that increased levels of ROS contribute to cellular senescence. In such a way, senescence may be a protective mechanism against tumor growth, which prevents an uncontrolled proliferation of cancer cells or cells that contain some oncogene activation or the loss of tumor suppressor genes, corroborating some other related studies that also support senescence as a proliferation suppressor mechanism that can stop tumor growth [48, 49].

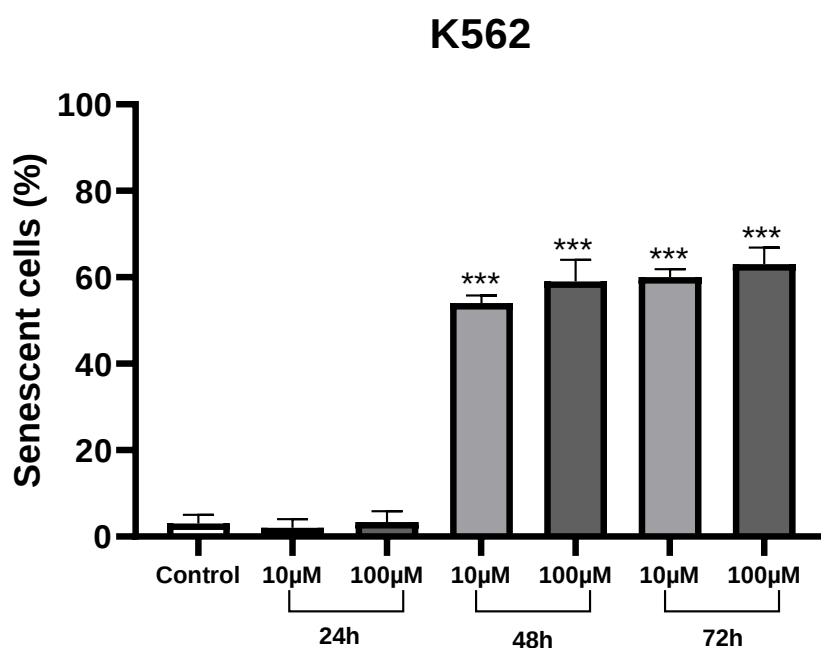


Figure 4. Percentage of senescent K562 cells after 24, 48 and 72 hours of MRK-107 incubation (10 and 100 μ M). (***) $p < 0.001$ compared to the control group.

Through the analysis of TBARS and reduced glutathione (GSH) in 72 hours, it was possible to observe the presence of oxidative stress after stimulation of the K562 cell with MRK-107 (**Figure 5**). TBARS (nmol/ml) is a product of lipid peroxidation of the cell membrane, which occurs in the presence of oxidative stress, while GSH is a naturally consumed antioxidant in the presence of oxidative stress, thus increasing TBARS (**Figure 5A**) and decreasing GSH (**Figure 5B**) indicate the presence of oxidative damage induced by MRK-107.

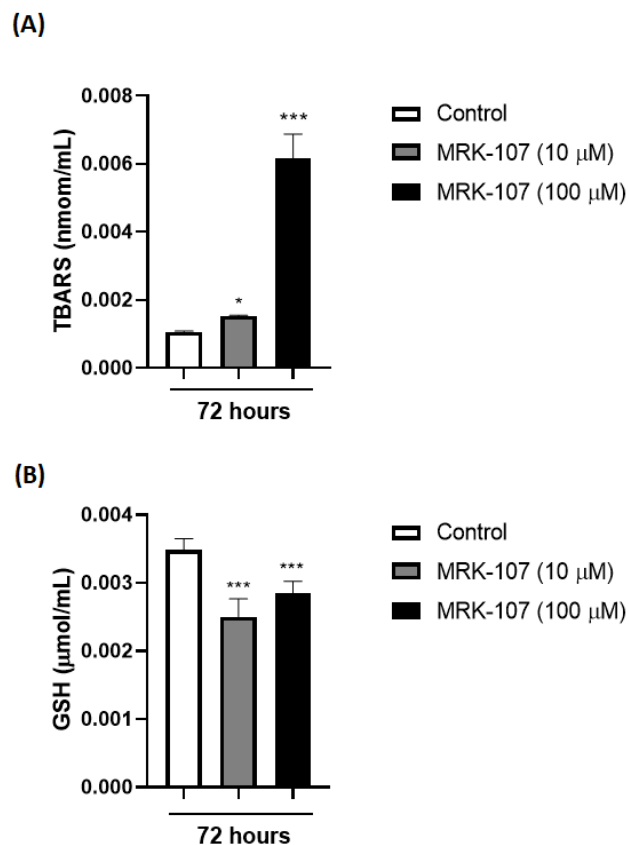


Figure 5. Oxidative stress markers in K562 cells. (A) Amount of TBARS (nmol/ml) after stimulation with MRK-107 (10 μM and 100 μM) in 72 hours. (B) Amount of reduced glutathione - GSH (μmol/ml) after stimulation with MRK-107 (10 μM and 100 μM) at 72 hours. (*) $p < 0.05$ compared to the control group; (***) $p < 0.001$ compared to the control group.

The studies of cell damage associated with senescence are still difficult to detect, however several studies showed the most toxic forms with more immediate effects, such as DNA damage. DNA breakage is considered one of the most toxic forms of cell damage, one of its immediate consequences include cell cycle arrest, that is, senescence as it is known that telomere shortening and chromosomal instabilities are well-established factors for senescence. In addition, studies report an increase in oxidized intracellular compounds, such as lipofuscin and carbonyl, glycated and modified proteins by lipid peroxidation in aged senescent cells[50].

These data corroborate other findings in the literature as well, in which a low level of GSH in the brain of mice was found associated with a detoxification of endogenous toxins originated through cellular lipoperoxidation processes arising from an insufficient removal of H_2O_2 that favors the production of an oxidative stress [51]. In addition, in that same study, a higher density of senescent cells was found associated with mice with the brain more exposed to oxidative stress, demonstrating that oxidative stress is an important factor that causes senescence [51].

In conclusion, the study demonstrated that senescence is a potential mechanism of cytotoxicity induced by the potential chemotherapeutic activity of MRK-107 against chronic myeloid leukemia (CML).

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 313047/2020-0), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Finance Code 001). AJPA was recipient of PIBIC scholarship from UFMS.

References

- [1] G. Juliusson, R. Hough. Leukemia. Prog. Tumor Res. 43 (2016), 87 – 100. <https://doi.org/10.1159/000447076>
- [2] A. E. Whiteley, T. T. Price, G. Cantelli, D. A. Sipkins. Leukaemia: a model metastatic disease. Nat Rev Cancer. 21 (2021), 461 – 475. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00355-z>.
- [3] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf> , 2017. (Accessed in 13 March 2022).
- [4] J. Cortes, R. Silver, H. Kantarjian, Chronic myeloid leucemia, In: Abeloff M, Armitage J, Niederhuber J, Kastan M, McKenna G, eds. Abeloff's Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia, 2008, pp. 2279-2293.
- [5] Kantarjian H, O'Brien S. The chronic leukemias: chronic myelogenous leucemia, in: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, 2008, pp. 1397-1408.
- [6] X. Huang, J. Cortes, H. Kantarjian. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. Cancer. 118(2012), 3123–3127. <https://doi.org/10.1002/cnccr.26679>
- [7] H. Lee, S.J. Kim, K.H. Jung, *et al.* A novel imidazopyridine PI3K inhibitor with anticancer activity in non-small cell lung cancer cells, Oncol. Rep. 30 (2013) 863 – 869. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2499>.
- [8] G. Chen, Z. Liu, Y. Zhang, *et al.* Synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel benzimidazole and imidazopyridine derivatives. ACS Med. Chem. Lett. 4 (2013) 69 - 74. <https://doi.org/10.1021/ml300282t>
- [9] K.H. Lee, D. Jeong. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: the selenium paradox (Review), Mol. Med. Rep., 5 (2012), 299 – 304. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.651>.

- [10] B. Zou, A. Nagle, A.K. Chatterjee, *et al.* Lead optimization of imidazopyrazines: a new class of antimalarial with activity on *Plasmodium* liver stages, *ACS Med. Chem. Lett.* 5 (2014), 947 – 950. <https://doi.org/10.1021/ml500244m>.
- [11] G. M. Almeida, J. Rafique, S. Saba, *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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2018), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.039>
- [12] D. C. dos Santos, J. Rafique, S. Saba, *et al.* Apoptosis oxidative damage-mediated and antiproliferative effect of selenylated imidazo[1,2-a]pyridines on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and in vivo. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35 (2021). <https://doi.org/10.1002/jbt.22663>
- [13] I. C. Veloso, E. Delanogare, A. E. Machado, *et al.* A selanylimidazopyridine (3-SePh-IP) reverses the prodepressant- and anxiogenic-like effects of a high-fat/high-fructose diet in mice. *J. Pharmacy and Pharmacology*, 73 (2021), 673 – 681. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa070>
- [14] R.A. El-Awady, M.H. Semreen, M.M. Saber, *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*. 37 (2016), 1 – 11. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.10.004>.
- [15] Y. Yu, Y. Han, F. Zhang, *et al.* “Design, synthesis, and biological evaluation of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as novel PI3K/mTOR dual inhibitors,” *Journal of Medicinal Chemistry*, 63 (2020), 3028–3046. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01736>.
- [16] T. E. A. Frizon, J. H. Cararo, S. Saba, *et al.* Synthesis of novel selenocyanates and evaluation of their effect in cultured mouse neurons submitted to oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/5417024>
- [17] A. M. Battram, M. Bachiller, B. Martín-Antonio. Senescence in the Development and Response to Cancer with Immunotherapy: A Double-Edged Sword. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(2020), 4346. <https://doi.org/10.3390/ijms21124346>
- [18] K.B. Felipe, J. Benites, C. Glorieux, *et al.* Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells. *Biochemical and Biophysical res. Communications*. 433 (2013), 573-578. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.028>
- [19] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5 (2015), 235-264. <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- [20] S. Kona, R. S. Ravi, V. N. R. Chava, R. S. Perali. A Convenient Synthesis of C-3-Aryloxymethyl Imidazo[1,2- a]Pyridine Derivatives. *Journal of chemistry*, 2013 (2012). <https://doi.org/10.1155/2013/296792>
- [21] J. Rafique, S. Saba, A. R. Rosário, A. L. Braga. Regioselective, Solvent- and Metal-Free Chalcogenation of Imidazo[1,2-a]pyridines by Employing I₂/DMSO as the Catalytic Oxidation System. *Chemistry European Journal*. 22 (2016), 11854 – 11862.

<https://doi.org/10.1002/chem.201600800>.

[22] L. Bettanin, S. Saba, C. V. Doerner, *et al.* NH₄I-catalyzed chalcogen(S/Se)-functionalization of 5-membered N-heteroaryls under metal-free conditions. *Tetrahedron*. 74 (2018), 3971 – 3980. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.05.084>

[23] J. Rafique, S. Saba, M. S. Franco, *et al.* Direct, Metal-free C(sp²)–H Chalcogenation of Indoles and Imidazopyridines with Dichalcogenides Catalysed by KIO₃. *Chemistry European Journal*. 24 (2018), 4173 – 4180. <https://doi.org/10.1002/chem.201705404>

[24] S. Saba, J. Rafique, M. S. Franco, *et al.* Rose Bengal catalysed photo-induced selenylation of indoles, imidazoles and arenes: a metal free approach. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6 (2018). <https://doi.org/10.1039/C7OB03177G>

[25] C. A. Lipinski. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (2004), pp. 337-341.

[26] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 45 (2002), pp. 2615 – 2623.

[27] M. J. Reiniers, R. F. van Golen, S. Bonnet, *et al.* Preparation and Practical Applications of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays, *Analytical Chemistry*, 89 (2017), 3853-3857. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00043>

[28] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol*, 65 (1983), 55 – 63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

[29] L. M. R de Novais, L. F. Ferreira, P. T. de Sousa Jr, *et al.* Eglerisine, a Novel Sesquiterpenoid Tropolone from *Dulacia egleri* with Antiproliferative Effect against an Acute Myeloid Leukemia Lineage. *Planta med*, 86 (2020), 55–60. <https://doi.org/10.1055/a-1021-0611>

[30] G. P. Dimiri, X. Lee, G. Basile, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (1995), 9363 - 9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

[31] G. B. Gomes, C. S. Zubieta, S. S. Weber, *et al.* Thiopyrimidine derivatives induce cytotoxicity, cell cycle arrest and oxidative stress in breast cancer 3D-spheroids. *CHEMICAL PAPERS*, 75 (2021), 1211-1220. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01383-z>

[32] R. P. Bird, A. H. Draper. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology*, 90 (1984), 105-110. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05038-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05038-2)

[33] E. Beutler, O. Duron, B. M. Kelly. Improved method for the determination of blood

glutathione. *J Lab Clin Med*, 61 (1963), 882-890.

[34] C. L. Grek, D. M. Townsend, K. D. Tew. The impact of redox and thiol status on the bone marrow: Pharmacological intervention strategies. *Pharmacol Ther.* 129 (2011), 172–184. <https://doi.org/10.1080/713803463>

[35] K. J. A. Davies. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*, 48 (1999), 41–47. <https://doi.org/10.1080/713803463>

[36] D. C. dos Santos, J. Rafique, S. Saba, et al. IP-Se-06, a Selenylated Imidazo [1, 2-a] pyridine, Modulates Intracellular Redox State and Causes Akt/mTOR/HIF-1 α and MAPK Signaling Inhibition, Promoting Antiproliferative Effect and Apoptosis in Glioblastoma Cells. ***Oxid Med Cell Longev.***, 2022 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/3710449>

[37] P. A Perez-Mancera, A. R. J. Young, M. Narita. Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14 (2014), 547–558. <https://doi.org/10.1038/nrc3773>

[38] S. Lee, C. A. Schmitt. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol.*, 21 (2019), 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>

[39] J. Guillon, C. Petit, B. Toutain, *et al.* Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. ***Cell Cycle***, 18 (2019), 2385-2397. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1652047>.

[40] V. Gorgoulis, P. D. Adams, A. Alimonti, *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179 (2019), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>

[41] D. Munoz-Espin, M. Serrano. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15 (2014), 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>

[42] Y. L. Guo, S. Chakraborty, S. S. Rajan, et al. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. ***Stem Cells Dev***, 19 (2010), 1321-1331. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0313>

[43] G. Zhong, S. Qin, D. Townsend, *et al.* Oxidative stress induces senescence in breast cancer stem cells. ***Biochem Biophys Res Commun***, 514 (2019), 1204-1209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.098>

[44] S. Kapor, V. Čokić, J. F. Santibanez. Mechanisms of hydroxyurea-induced cellular senescence: an oxidative stress connection?. ***Oxid Med Cell Longev***, 2021 (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/7753857>.

[45] C. M. Dong, X. L. Wang, G. M. Wang, *et al.*, 2014. A stress-induced cellular aging model with postnatal neural stem cells. ***Cell Death & Disease***, 5, e1116. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.82>

- [46] Y. Zhai, R. Wei, J. Liu, *et al.* Drug-induced premature senescence model in human dental follicle stem cells. **Oncotarget**, 8 (2017), 7276–7293. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14085>
- [47] K. Geng, N. Fu, X. Yang, *et al.* Adjudin delays cellular senescence through Sirt 3 mediated attenuation of ROS production. *Int J Mol Med*, 42 (2018), 3522–3529. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3917>
- [48] C. J. Sieben, I. Sturmlechner, B. van de Sluis, *et al.* Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol*, 28 (2018), 723–737. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.04.006>
- [49] S. W. Lowe, E. Cepero, G. Evan. Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432 (2004), 307–315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- [50] M. A. Baraibar, J. Hyzewicz, A. Rogowska-Wrzesinska, *et al.* Impaired energy metabolism of senescent muscle satellite cells is associated with oxidative modifications of glycolytic enzymes. *Free Radic Biol Med.*, 75 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.738>.
- [51] E. B. Parisotto, V. Vidal, S. Garcia-Cerro, *et al.* Chronic Melatonin Administration Reduced Oxidative Damage and Cellular Senescence in the Hippocampus of a Mouse Model of Down Syndrome. *Neurochem Res.*, 11 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2008-8>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com o presente estudo, permitem concluir que:

- Os derivados de IP possivelmente apresentam boa absorção oral, com exceção do MRK-116. Além disso, não mostraram importantes efeitos tóxicos de mutagenicidade, tumorigenicidade e irritabilidade. Porém, mostraram possível efeito sobre o sistema reprodutor.
- O composto MRK-107 obteve o melhor perfil oxidativo e a célula K562 foi a célula mais responsiva;
- O composto MRK-107 não foi capaz de induzir morte celular em células K562 nem em monócitos humanos;
- O composto MRK-107 foi capaz de diminuir a proliferação das células K562 após 72h de exposição.
- O composto MRK-107 foi capaz de induzir senescência celular em células K562 em 48 e 72h de exposição.
- O composto MRK-107 induziu estresse oxidativo em células K562 após 72h de exposição

Assim, este estudo demonstrou que a senescência induzida pelo composto MRK-107 possui envolvimento de estresse oxidativo como possível mecanismo de ação, sendo um potencial mecanismo antitumoral contra leucemia mieloide crônica (LMC).

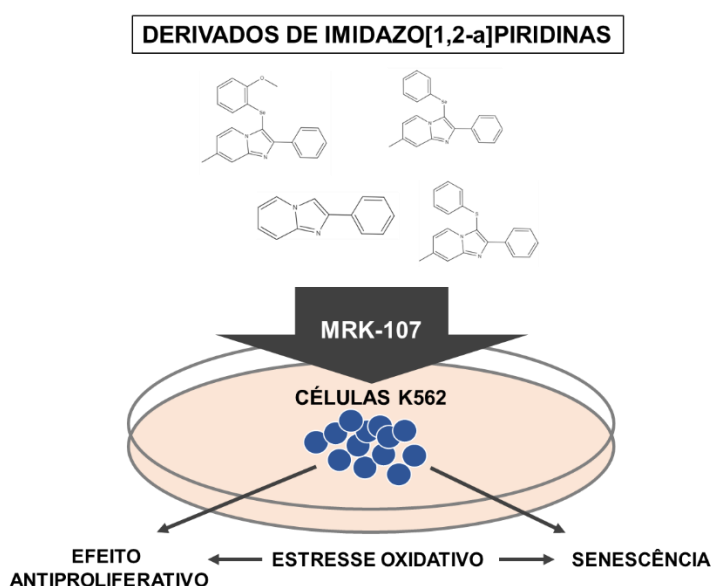


Figura 4. Representação esquemática dos resultados obtidos no estudo.

PERPECTIVAS

- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular e dano ao DNA.
- Avaliar a associação de MRK-107 e imatinibe (terapia adjuvante) no tratamento de células de LMC.