

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E CAPACIDADE DE INDUÇÃO DE MORTE E PARADA DE CICLO EM CÉLULAS TUMORAIS B16F10 POR COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO MALEIMIDA E 1,4-DIOXO-2-BUTENIL LIGADOS AO ENXOFRE**

Linha de Pesquisa: Cultivo celular, terapia celular e engenharia tecidual

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

2022

Mayara Rodrigues Mota

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS E CAPACIDADE DE INDUÇÃO DE MORTE E PARADA DE CICLO EM CÉLULAS TUMORAIS B16F10 POR COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO MALEIMIDA E 1,4-DIOXO-2-BUTENIL LIGADOS AO ENXOFRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Co-Orientador: Adrivanio Baranoski

Campo Grande

2022

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe **Ismara Leite**, por sempre acreditar em mim, me amar incondicionalmente e por ter abdicado de muitos momentos de sua vida em prol da realização dos meus sonhos e vontades.*

*Ao meu pai **Anselmo Mota**, por sempre reforçar a importância do estudo e torcer/incentivar todo o meu caminho profissional.*

*Aos meus avós, **Ismael e Darcy**, por tanto amor, carinho e ensinamentos desde os meus primeiros dias de vida.*

*Ao meu marido **Renato Brum**, por sempre me incentivar, me cuidar e me dar todo o suporte (emocional e físico) necessário para o alcance das minhas conquistas.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à **Deus**, que sempre foi o meu maior porto seguro, quem me guiou, me orientou e me sustentou em todos os momentos da minha vida;

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da **UFMS**, que possibilitou a realização deste trabalho;

Ao meu orientador, **Dr. Rodrigo Juliano Oliveira**, pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, experiência, sabedoria e pelo significativo aprendizado científico adquirido durante o mestrado;

Ao meu co-orientador, **Dr. Adrivanio Baranoski**, por ter guiado meus passos em toda a parte experimental e dividir cada etapa do trabalho comigo. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, dedicação e por me mostrar os caminhos da pesquisa científica, tornando-os mais leves;

Ao professor **Dr. Roberto da Silva Gomes** pela colaboração na síntese e fornecimento dos compostos utilizados na pesquisa;

Aos membros da banca examinadora, **Prof<sup>ª</sup>. Dra. Renata Trentin Perdomo, Prof. Dr. Lucas Roberto Pessatto, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Thalita Alves Zanetti e Prof. Dr. Valter Aragão do Nascimento** pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

Aos meus colegas do laboratório CeTroGen, obrigada pela ajuda e ensinamentos com experimentos, pelos momentos de descontração, parceria e paciência;

À minha mãe, **Ismara Leite**, que sonhou muito com este momento da minha defesa, depositando um sonho antigo e grandes expectativas sobre este título, e que não mediu esforços para que eu seguisse em frente, sem me deixar desistir, sempre com muito amor;

Ao meu pai, **Anselmo Mota**, que sempre me ensinou sobre persistência e resiliência, na vida e no trabalho, me guiando e orientando através das dificuldades e conquistas;

Aos meus avós, **Ismael e Darcy**, que sempre me deram muito amor, educação, exemplos de vida e são figuras muito importantes na minha vida, desde os meus primeiros dias de nascimento até os dias de hoje;

Ao meu marido, **Renato Brum**, que sempre me apoiou, me incentivou e me aplaudiu em todos os momentos, entendendo minhas ausências em virtude dos momentos de dedicação à pesquisa e ao trabalho;

A todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para realização deste sonho.

## **RESUMO:**

A incidência de câncer atingiu mais de 17 milhões de novos casos no mundo em 2018, levando a óbito quase 9,5 milhões de pessoas. Quando se fala em melanoma, um tipo de câncer de pele mais agressivo, houve aumento no número de casos no século 21. Embora o tratamento cirúrgico permaneça como "padrão ouro", avanços recentes em imunoterapia e terapia molecular alvo, para doenças metastáticas, têm mostrado resultados bastante promissores. Enfatiza-se a importância do estudo de novas estruturas moleculares e construção de substâncias inéditas que poderão ser utilizadas na terapia desta doença. Neste estudo foi realizada avaliação e triagem de cinco compostos que combinam o grupo maleimida e 1,4-dioxo-2-butenil, contendo enxofre em sua estrutura, em células tumorais B16F10 com relação à citotoxicidade, através do ensaio do MTT, surgindo dois compostos com resultados mais significativos em inibição de proliferação celular, denominados Composto 3 e Composto 5. As células foram submetidas a 24h de tratamento com os compostos e avaliados em citômetro de fluxo quanto à integridade de membranas e contagem celular, demonstrando redução significativa do número de células no tratamento com ambos os compostos, em todas as concentrações testadas, sem alteração significativa em integridade de membranas. Em seguida, avaliou-se perfil de ciclo celular, evidenciando acentuada retenção na fase G1, principalmente no Composto 3, além do aparecimento de população sub-G1, fornecendo indícios de morte celular, confirmados pela indução de apoptose inicial em ambos os compostos e concentrações testadas. Observa-se aumento de EROs a partir da concentração de 125  $\mu\text{M}$  em ambos os compostos, após 3 horas de tratamento. O estudo de genotoxicidade identifica resultados expressivos em ambas moléculas. O Composto 5 mostrou-se mais eficiente em danos genotóxicos que o Composto 3, aumentando tanto o comprimento do cometa, quanto a quantidade de DNA na cauda. Finaliza-se o estudo com a expressão gênica, obtendo-se aumento considerável de GADD45a, marcador de danos generalizados, aumento de ATR, TP53, CDKN1a, CHK2, COX2 e CASP3, em ambos os compostos, nas concentrações de 125  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ . A ativação de GADD45a indica que os danos causados por ambos compostos são sinalizados por ativação da via p38/JNK, sendo neste caso, possivelmente independente de ativação de P53. Estes resultados, somados, indicam possibilidade terapêutica futura dos mesmos no enfrentamento do melanoma.

**Palavras-chave:** Melanoma; Citotoxicidade; Estresse Oxidativo.

**ABSTRACT:**

Cancer reached more than 17 million new cases in the world in 2018, leading to the death of almost 9.5 million people. When it comes to melanoma, a more aggressive type of skin cancer, there has been an increase in the number of cases in the 21st century. Although surgical treatment remains the "gold standard", recent advances in immunotherapy and targeted molecular therapy for metastatic diseases have showed very promising results. It emphasizes the importance of studying new molecular structures and building new substances that can be used in the therapy of this disease. In this study, evaluation and screening of five compounds that combine the maleimide and 1,4-dioxo-2-butenyl group, containing sulfur in its structure, in B16F10 tumor cells in relation to cytotoxicity, through the MTT assay, emerged with more significant results in cell proliferation inhibition, called Compound 3 and Compound 5. The cells were subjected to 24 hours of treatment and evaluated in a flow cytometer for membrane integrity and cell count, demonstrating a significant reduction in the number of cells in treatment with both compounds, at all concentrations tested, without significant change in membrane integrity. Then, a cell cycle profile was evaluated, showing marked retention in the G1 phase, mainly in Compound 3, in addition to the appearance of a sub-G1 population, providing evidence of cell death, confirmed by the induction of initial apoptosis in both compounds and concentrations tested. An increase in ROS is observed from the concentration of 125  $\mu$ M in both compounds, after 3 hours of treatment. The genotoxicity study identifies expressive results in both molecules. Compound 5 proved to be more efficient in genotoxic damage than Compound 3, increasing both the length of the comet and the amount of DNA in the tail. The study is concluded with gene expression, obtaining a considerable increase in GADD45a, a marker of generalized damage, increase in ATR, TP53, CDKN1a, CHK2, COX2 and CASP3, in both compounds, at concentrations of 125  $\mu$ M and 500  $\mu$ M. Activation of GADD45a indicates that damage caused by both compounds is signaled by activation of the p38/JNK pathway, in this case, possibly independent of P53 activation. These results, added together, indicate a future therapeutic possibility for them to fight melanoma.

**Keywords:** Melanoma; Cytotoxicity; Oxidative stress.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>2.OBJETIVO GERAL</b> .....	4
<b>2.1.Objetivos Específicos</b> .....	4
<b>3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>3.1.Melanócitos</b> .....	5
<b>3.2.Melanoma</b> .....	6
<b>3.3.Ciclo Celular</b> .....	10
<b>3.4.Morte Celular</b> .....	11
<b>3.5.Tratamento do Melanoma</b> .....	13
<b>3.6.Grupo Maleimida</b> .....	15
<b>3.7.Fragmento Farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil</b> .....	17
<b>3.8.Elemento Químico Enxofre</b> .....	18
<b>4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	20
<b>ARTIGO</b> .....	25
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	26
<b>2.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>2.1.Agentes Químicos e Cultivo de Células</b> .....	28
<b>2.2.Viabilidade Celular e Triagem de Compostos</b> .....	28
<b>2.3.Integridade de Membranas e Contagem Celular</b> .....	29
<b>2.4.Perfil de Ciclo Celular e população Sub-G1</b> .....	29
<b>2.5. Morte Celular por Apoptose</b> .....	30
<b>2.6.Avaliação de EROs por H<sub>2</sub>DCFDA</b> .....	30
<b>2.7.Genotoxicidade</b> .....	30
<b>2.8.Expressão Gênica</b> .....	31
<b>2.9.Análise Estatística</b> .....	32
<b>3.RESULTADOS</b> .....	33
<b>3.1.Viabilidade Celular e Triagem de Compostos</b> .....	33
<b>3.2.Integridade de Membranas e Contagem Celular</b> .....	34
<b>3.3.Perfil de Ciclo Celular e população Sub-G1</b> .....	34
<b>3.4.Morte Celular por Apoptose</b> .....	36
<b>3.5.Avaliação de EROs por H<sub>2</sub>DCFDA</b> .....	36
<b>3.6.Genotoxicidade</b> .....	37
<b>3.7.Expressão Gênica</b> .....	38
<b>4.DISSCUSSÃO</b> .....	40
<b>5.AGRADECIMENTOS</b> .....	43
<b>6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44
<b>7.APÊNDICES</b> .....	50
<b>8.CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	55

## 1.INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença com expectativa de ser classificada como a principal causa de morte, bem como um dos fatores impeditivos mais importantes no aumento da expectativa de vida no mundo no século XXI. Segundo dados do último relatório da *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), ligada a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2018, a incidência foi de 17 milhões de novos casos de câncer no mundo, levando a óbito quase 9,5 milhões de pessoas. Entre os cânceres mais incidentes, excetuando os cânceres de pele não melanoma, estão os cânceres de pulmão (2,09 milhões), mama (2,08 milhões), colorretal (1,84 milhões), próstata (1,27 milhões), estômago (1 milhão) e fígado (841 mil). Dentre estes, os cânceres de pulmão (1,76 milhões), colorretal (880 mil) e estômago (782 mil) foram os que mais levaram a óbitos (BRAY et al., 2018).

Apesar dos números ainda significativos, estamos visualizando queda na incidência de alguns tipos de cânceres. Entretanto, quando se fala em melanoma, um tipo de câncer de pele mais agressivo, houve aumento no número de casos no século XXI. Estes números, por vezes contraditórios em alguns estudos, são três vezes maiores em homens quando estudamos uma população acima de 75 anos de idade, enquanto que, até a faixa etária dos 40 anos, a incidência é maior em mulheres (RASTRELLI et al., 2014). Ahmed et al. (2020) reforça que este é o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o sexto mais comum em mulheres.

No que tange aos fatores de risco relacionados ao melanoma, a exposição aos raios ultravioleta mostra ser o principal fator modificável relacionado ao ambiente, devido ao seu potencial genotóxico (RASTRELLI et al., 2014). Os demais fatores englobam número de nevos melanocíticos presentes, história familiar da doença e susceptibilidade genética (RASTRELLI et al., 2014). Ainda de acordo com este estudo, as áreas mais comuns para a ocorrência de lesões cancerígenas de pele do tipo melanoma são sexo-dependentes, sendo que em homens a doença se manifesta mais na região dorsal. Já nas mulheres ocorre nos braços e pernas. A raça/etnia também parece ser fator de influência na incidência. Assim, evidencia-se que a população branca tem risco dez vezes maior em relação à população negra, asiática ou hispânica (RASTRELLI et al., 2014).

Estudos recentes em países desenvolvidos demonstram que a maioria dos novos casos de câncer poderiam ser evitados pela eliminação ou redução da exposição a fatores de risco ambientais e alteração no estilo de vida (BRAY et al., 2018).

Embora o tratamento cirúrgico permaneça como "padrão ouro" no caso do melanoma, avanços recentes em imunoterapia e terapia molecular alvo, para doenças metastáticas, demonstram resultados bastante promissores. Algumas mutações genéticas já são conhecidas e associadas com lesões melanocíticas, envolvendo os seguintes genes: *BRAF*, *KIT*, *NRAS*, *HRAS*, *GNAQ*, *PTEN*, *TERT*, *NF1*, *ARID2*, *CDKN2A*. Neste sentido, combinações de imunoterapia com inibidores de *BRAF* e *NRAS* são estudadas com o objetivo de prolongar resposta ao tratamento, minimizando efeitos colaterais, bem como o surgimento de resistência tumoral. Entretanto, a ótima combinação ainda não foi determinada e o padrão de tratamento continua sendo o uso de agentes isolados (PAVRI et al., 2016).

Levando em consideração esses desafios e os altos custos de tratamento dessa doença, destaca-se a importância do estudo de novas estruturas moleculares e a reatividade de compostos orgânicos, dentro do contexto de avanços em química orgânica, onde pode-se construir substâncias raras ou inéditas que poderão ser utilizadas na terapia adjuvante deste problema de saúde pública. Futuramente, esses compostos orgânicos possibilitarão a descoberta de novas drogas que influenciarão, inclusive, no tratamento de diversas outras doenças (OLIVEIRA et al., 2018a).

Nesse contexto, compostos que apresentam em sua estrutura os grupos maleimida, 1,4-dioxo-2-butenil e enxofre, já demonstraram resultados importantes na inibição de diferentes tipos de células tumorais (ROSOLEN, 2014; OLIVEIRA et al., 2014), atividade antibacteriana, antifúngica (ANDRICOPULO et al., 1998), elevação de EROs (AN et al., 2021), entre outros, demonstrando sua importância como candidatos a futuros agentes anticâncer ou contra outras enfermidades e, portanto, serão utilizados e testados nesta pesquisa.

## **2.OBJETIVO GERAL**

Avaliar cinco diferentes compostos que combinam o grupo maleimida e 1,4-dioxo-2-butenil, contendo enxofre em sua estrutura, em células tumorais B16F10 (linhagem de melanoma de camundongos) com relação à citotoxicidade, sendo os mais efetivos, avaliados quanto à retenção de proliferação celular, danos ao DNA e membranas, interferência no perfil do ciclo celular, indução de estresse oxidativo, morte celular por apoptose, além dos níveis de expressão gênica de genes relacionados a estes aspectos.

### **2.1.Objetivos Específicos**

- a. Triagem de séries de compostos por viabilidade celular pelo ensaio de citotoxicidade – MTT.
- b. Avaliar o número de células após o tratamento utilizando citometria de fluxo.
- c. Avaliar danos em membrana por citometria de fluxo induzidos pelos compostos selecionados.
- d. Avaliar as fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) utilizando citometria de fluxo.
- e. Avaliar os níveis de estresse oxidativo utilizando citometria de fluxo através do marcador H<sub>2</sub>DCFDA.
- f. Avaliar a genotoxicidade induzida pelos compostos selecionados pelo ensaio do cometa após 3 h de tratamento.
- g. Avaliar o perfil de morte celular por apoptose utilizando citometria de fluxo após tratamento com os compostos selecionados.
- h. Avaliar o perfil de expressão de mRNA dos genes relacionados ao ciclo celular, danos no DNA e estresse oxidativo utilizando a técnica RT-qPCR após tratamento com os compostos selecionados.

### **3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1.Melanócitos**

Os melanócitos, cuja homeostase é regulada pelos queratinócitos epidérmicos, encontram-se na camada basal da epiderme e nos folículos capilares, e são células caracterizadas pela produção de melanina. A melanina é o pigmento responsável pela cor da pele e do cabelo, em resposta a exposição à luz ultravioleta (UV) (ALI et al., 2013).

Essas células produtoras de pigmentos derivam embriologicamente de células-tronco pluripotentes da crista neural. Durante o desenvolvimento fetal, eles não apenas migram, como também se diferenciam predominantemente na epiderme, mas também para outros locais contendo pigmentos extra-cutâneos, como olhos, meninges, esôfago e membranas mucosas (ALI et al., 2013).

Os melanócitos promovem um papel fundamental na proteção da pele contra os efeitos nocivos da radiação UV, como também na prevenção do câncer de pele. Indivíduos que apresentam ausência de melanócitos funcionais, como é o caso do vitiligo e do albinismo são hipersensíveis à radiação UV e apresentam grande suscetibilidade ao melanoma. Contudo, os melanócitos são os precursores do melanoma, pois podem proliferar e espalhar-se levando à formação de nevos (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; ERNFORS, 2010).

Os nevos são geralmente benignos, mas podem progredir para o melanoma da fase de crescimento radial (RGP), uma lesão intraepidérmica que pode envolver alguma microinvasão na derme. As células RGP podem progredir para a fase de crescimento vertical (VGP), fase considerada mais perigosa em que as células têm potencial metastático, com possibilidade de invasão da derme (Figura 1) (GRAY-SCHOPFER et al., 2007).

**Figura 1 – Progressão na transformação do melanócito.**

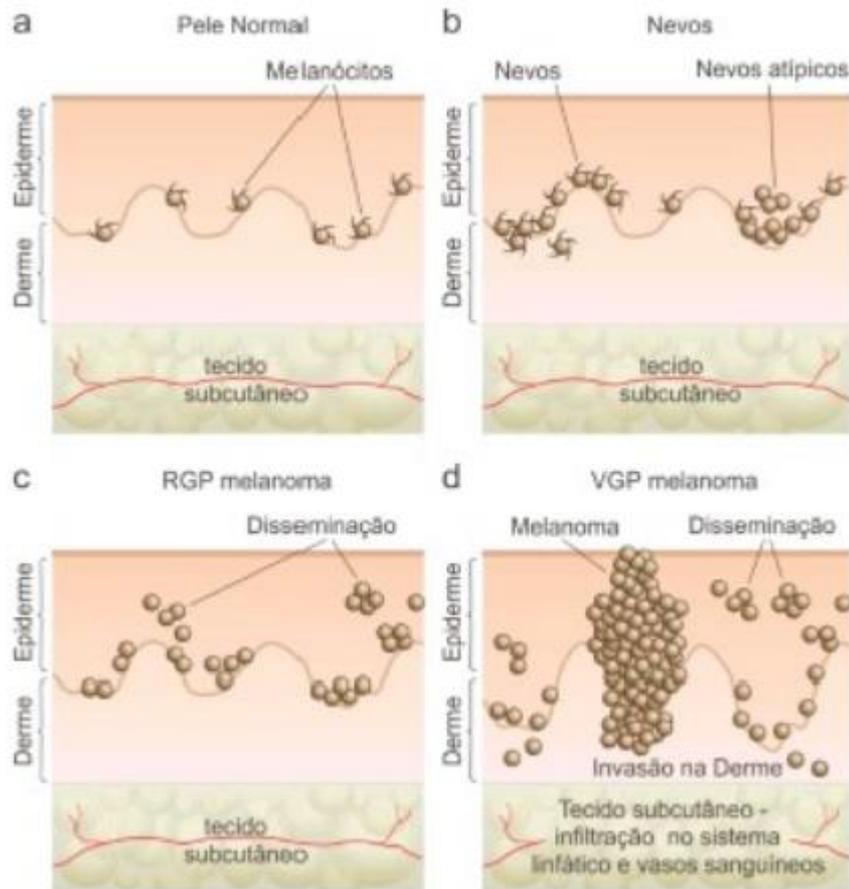


Figura 1. a) Pele normal. Distribuição dos melanócitos dendríticos dentro da camada basal da epiderme. b) Nevos melanocíticos benignos ocorrem devido ao aumento do número de melanócitos dendríticos. c) Fase de crescimento radial (RGP), fase maligna primária. d) Fase de crescimento vertical (VGP), considerada como maligno, conduz diretamente ao melanoma metastático.

Fonte: Adaptada de Gray-Schopfer et al. (2007).

### 3.2.Melanoma

O melanoma (Figura 2), ainda citado como um dos mais letais tumores de pele, com números elevados em morbidade e mortalidade, é uma ameaça à saúde humana. Portanto, a identificação de modalidades efetivas de tratamento é de suma importância (AHMED et al., 2020; AN et al., 2021).

A incidência de melanoma é maior em regiões próximas à linha do Equador e diminui conforme o aumento da distância dessa região, em virtude da redução da exposição aos raios ultravioletas (UV), particularmente, raios UV-B (ALI et al., 2013).

O principal fator modificável, relacionado ao ambiente, parece ser a exposição aos raios ultravioleta, que são causadores do melanoma, devido ao seu potencial genotóxico (ALI et al., 2013).

O receptor de melanocortina 1 (MC1R) é um receptor de superfície celular de melanócitos que induz a produção de pigmento após a ativação por seu ligante, o hormônio estimulador de melanócitos alfa (MSH). A pigmentação tem grande influência na suscetibilidade da pele a alterações malignas e, devido aos polimorfismos do gene *MC1R*, variantes como cabelo ruivo e o fenótipo de pele clara expressam baixa pigmentação, maior sensibilidade à luz ultravioleta (UV) e, portanto, aumento do risco de melanoma associado (NOONAN et al, 2012; ALI et al., 2013).

Outros fatores de risco também são elencados: número de nevos melanocíticos presentes, história familiar da doença e susceptibilidade genética (ALI et al., 2013; RASTRELLI et al., 2014). Estes nevos melanocíticos são acúmulos benignos de melanócitos ou células e podem ser congênitos ou adquiridos. Aproximadamente 25% dos casos de melanoma ocorrem em conjunto com um nevo pré-existente (RASTRELLI et al., 2014). Os nevos atípicos podem apresentar bordas irregulares, coloração variada e diâmetro igual ou superior a 5 mm (Figura 2) (WAGNER et al., 2000).

**Figura 2 – Melanoma maligno.**

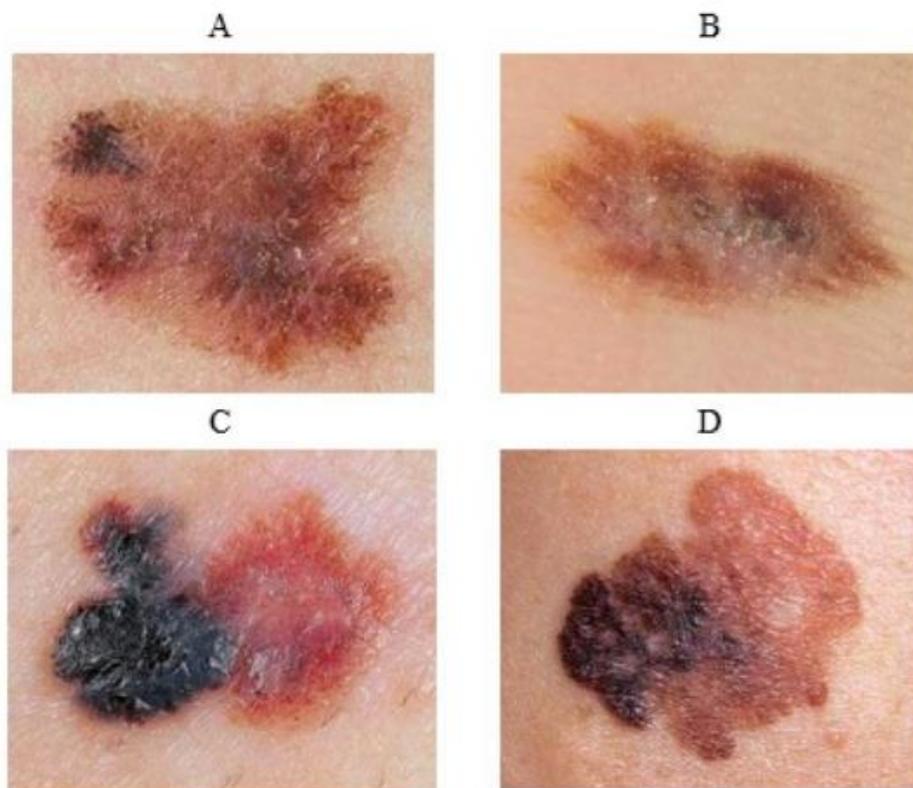


Figura 2. Lesões cutâneas apresentando assimetria (A), bordas irregulares (B), coloração variada (C) e diâmetro igual ou superior a 5 mm (D). Fonte: MEF (2014).

Os indivíduos que tiveram um melanoma têm um risco importante de desenvolver um segundo, estimado em uma média de 1% ao ano. Entretanto, é possível diminuir as chances de incidência dessa nova lesão simplesmente reduzindo a exposição a este fator de risco citado, independentemente de sua idade (KRIKER et al., 2007; ALI et al., 2013).

O diagnóstico precoce do melanoma traz possibilidade de cura por meio de ressecção cirúrgica em até 80% dos casos. Já o melanoma maligno metastático se mostra agressivo e resistente às terapias existentes, ofertando um prognóstico restrito, com uma taxa média de sobrevida entre 6 a 9 meses e sobrevida global de aproximadamente 5 anos (neste caso, menos de 5%) (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; AROZARENA et al., 2011).

Descobertas na sinalização celular têm proporcionado uma maior compreensão da biologia do melanoma. Os principais subtipos de melanoma estão associados a diferentes mutações, e envolvem genes frequentemente mutados, sendo eles: *BRAF*, *CDKN2A*, *NRAS* e *TP53* no melanoma cutâneo; *BRAF*, *NRAS*, *NF1* e *KIT* no melanoma acral (embora com

frequências mais baixas do que no melanoma cutâneo), *SF3B1* no melanoma de mucosa (MICHELIN et al., 2019)

Uma das mutações importantes observadas no melanoma ocorre no gene *TP53*. Uma das principais funções desta proteína é manter a transdução de sinais na morte celular programada (apoptose) (HAUPT et al., 2003; HUSSEIN et al., 2003). Danos celulares causados pela luz ultravioleta, radiação ionizante, hipóxia e estresse oxidativo levam à ativação da p53 permitindo que a apoptose ocorra. Mas nos casos em que o gene está mutado, as funções antitumorais são reprimidas, causando desestabilização nas suas atividades transcricionais. Mutações na p53 ocorrem em aproximadamente 50% dos cânceres, inclusive no melanoma (BENJAMIN; ANANTHASWAMY, 2007; BOX; TERZIAN, 2008).

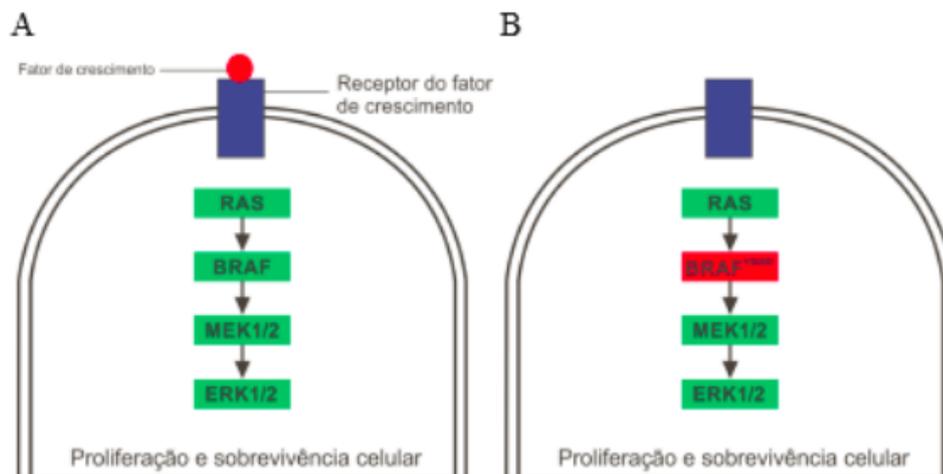
Mutações genéticas que afetam os protagonistas da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (Figura 3), conhecida como via das MAP cinases que contém as proteínas RAS/RAF/MEK/ERK, foram encontradas em muitos tipos de tumor. Essa via de sinalização é ativada pela ligação do ligante a um receptor tirosina quinase (RTK) de superfície celular, que por sua vez ativa o RAS. A família RAS de proteínas consiste em três isoformas, NRAS, KRAS e HRAS, sendo a mais importante delas a NRAS. A ativação do NRAS ativa a família das proteínas RAF, que se dividem em ARAF, BRAF e CRAF. A formação de moléculas de RAF leva, conseqüentemente, à ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que, por sua vez, atua em vários alvos para promover o crescimento e a sobrevivência celular, bem como controlar a sinalização da via MAPK pela indução da expressão de reguladores negativos e inibindo diretamente proteínas como CRAF (JOVANOVIC et al., 2010; ALI et al., 2013; ROSOLEN, 2014).

Os genes *NRAS* e *BRAF* são comumente mutados em melanomas cutâneos primários esporádicos, com frequências de mutação entre 4-50% e 25-80%, respectivamente (JOVANOVIC et al., 2010).

As mutações *NRAS* mais comuns no melanoma envolvem a substituição da glutamina por arginina no códon 61 (Q61R) ou por lisina no códon 181 (Q181R). Já as mutações *BRAF*, em torno de 90% delas, envolvem a substituição do ácido glutâmico por valina (V600E). A BRAFV600E, proteína constitutivamente ativa, promove a ativação da via das MAPK de forma contínua, estimulando a proliferação e sobrevivência (Figura 3), como também, fornecem funções de crescimento e de manutenção essenciais para o tumor, prevenindo a apoptose e

tornando-se um alvo terapêutico para o tratamento do melanoma (JOVANOVIC et al., 2010; ALI et al., 2013; ROSOLEN, 2014).

**Figura 3 – Via das MAPK.**



A) Ativação normal da via. B) BRAF mutante (BRAFFV600E) conduz a ativação da via em aproximadamente 60% dos melanomas. Fonte: Adaptado de Murrel e Board (2013).

### 3.3.Ciclo Celular

O ciclo celular difere-se pelas fases que as células passam no processo de divisão celular, a mitose e a interfase, sendo, esta última, dividida em três fases diferentes: G1, S e G2/M (Figura 4), e, de maneira muito controlada, as transições de fases são realizadas para garantir que não haja erros. A fase G1 caracteriza-se pela síntese de enzimas, RNA e componentes estruturais, além de crescimento celular em tamanho. Na fase S ocorre a duplicação do DNA. Na G2, as células sintetizam RNA e proteínas necessárias para a divisão celular (DALTON, 2015).

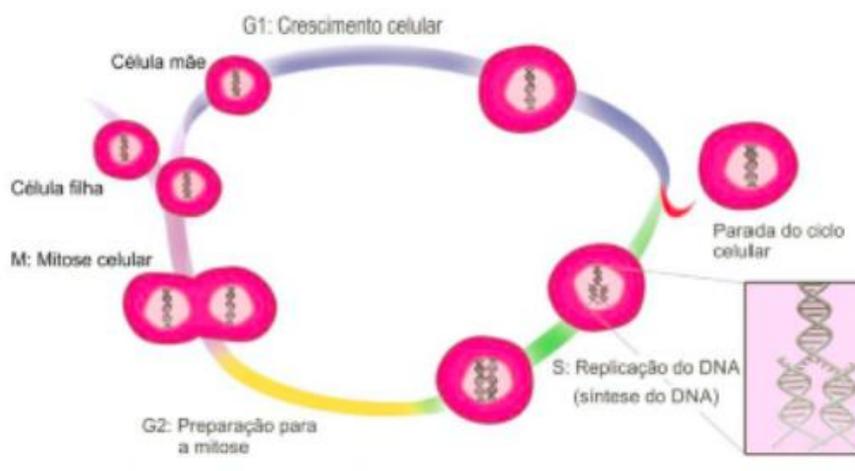
No entanto, a replicação celular não está isenta de erros. Assim, durante o ciclo celular existem pontos de verificações (Checkpoints), entre as fases G1 e S, e fases G2 e Mitose. No ponto de checagem G1, as células identificam a existência de problemas inesperados como tamanho celular, reserva de nutrientes, recepção de sinais de fatores de crescimento e a integridade do DNA, entre outros. No ponto de checagem G2, as células verificam a integridade do DNA e se este foi completamente duplicado durante a fase S. Em caso de existência de erros,

o ciclo celular será retido para reparos, e, na impossibilidade deles, as células ativam a sinalização para apoptose. Caso não tenha sido identificado nenhum erro, as células entram em mitose, processo de divisão das células propriamente dita em células filhas (BARNUM; O'CONNELL, 2014).

As diferentes fases do ciclo celular são controladas por complexos de ciclinas CDK, que são responsáveis por fosforilar substratos chaves para promover a síntese de DNA e a progressão mitótica. Danos ao DNA levam à inibição destas CDKs, retendo o ciclo (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A proliferação celular desordenada, como característica principal do câncer (TORRE, BRAY et al., 2015), torna a avaliação de genes, relacionados ao ciclo celular, como por exemplo *GADD45a*, *ATR*, *TP53*, *CDKN1a*, *CHK1*, *CHK2*, importantes para o entendimento dos mecanismos de inibição de proliferação induzidos pelas novas drogas.

**Figura 4 – Fases do ciclo celular.**



Fonte: Adaptada de Mahmoudi et al (2011).

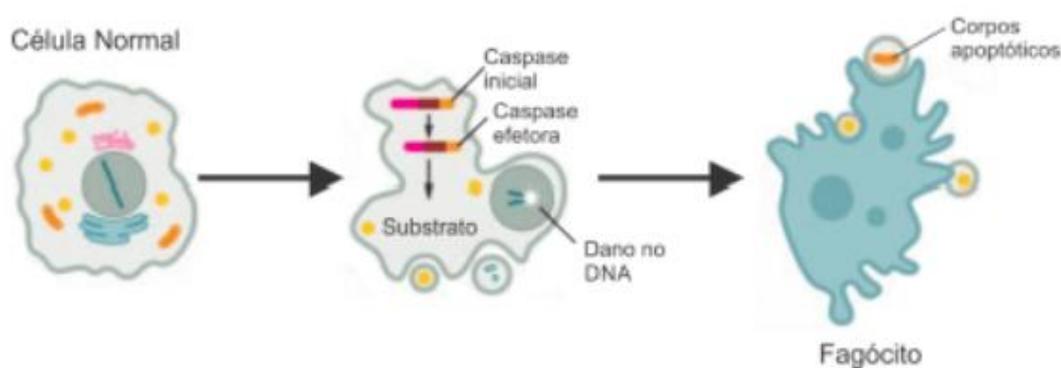
### 3.4.Morte Celular

Entre os diversos tipos de mortes celulares programadas conhecidas, apoptose (Figura 5) e autofagia são as mais comuns e consideradas como mortes controladas, diferentemente da necrose (BOOTH et al., 2014).

A apoptose desempenha o papel de remover células danificadas, envelhecidas, entre outras, e pode ser desencadeada por via extrínseca e intrínseca (Figura 6), sendo que a via intrínseca é caracterizada pela própria célula dar início ao processo de morte, devido a danos, falta de nutrientes ou oxigênio, e é iniciada pela liberação do Citocromo *c* das mitocôndrias que se liga ao fator de ativação da protease apoptótica 1, ativando as pró-caspases iniciadoras e efetoras. Já a via extrínseca é desencadeada por vias de sinalização dos receptores de morte. Existem vários tipos de receptores já conhecidos (OOI; MA, 2013), sendo eles alvos interessantes para novas drogas.

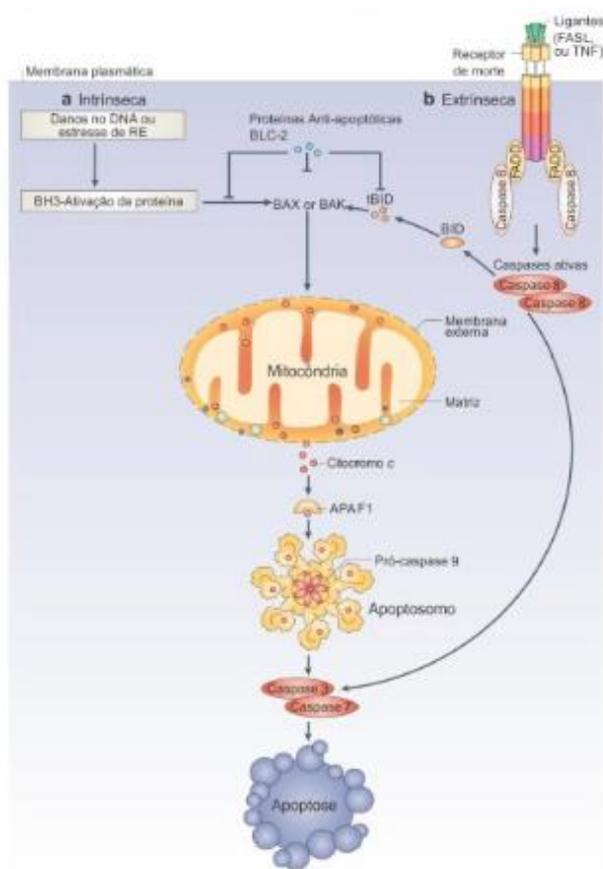
Segundo Gray-Schopfer et al. (2007), as células de melanoma apresentam baixo índice de apoptose espontânea *in vivo*, quando em comparação com outros tipos de células tumorais. O gene supressor de tumor *TP53* é comumente mutado em tumores, podendo inibir a ativação das proteínas de reparo do DNA, levando as células a não entrarem em apoptose, permitindo a divisão e crescimento descontrolados, levando à formação dos cânceres. Além disso, mostraram-se resistentes às drogas que induzem apoptose *in vitro* e, por este motivo, são consideradas muito agressivas.

**Figura 5– Características morfológicas do processo de morte celular por apoptose.**



Fonte: Adaptada de Fink e Cookson (2005).

**Figura 6 – Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.**



Fonte: Adaptada de Tait e Green (2010).

RE - Retículo endoplasmático.

### 3.5. Tratamento do Melanoma

Como referenciado anteriormente, o tratamento cirúrgico permanece como "padrão ouro" no caso do melanoma. Entretanto, avanços recentes em imunoterapia e terapia molecular alvo, para doenças metastáticas, têm mostrado resultados bastante promissores (PAVRI et al., 2016).

Algumas mutações genéticas já são conhecidas e associadas com lesões melanocíticas e envolvem os seguintes genes: *BRAF*, *KIT*, *NRAS*, *HRAS*, *GNAQ*, *PTEN*, *TERT*, *NF1*, *ARID2*, *CDKN2A*. Neste sentido, combinações de imunoterapia com inibidores de *BRAF* e *NRAS* são alvos terapêuticos validados e drogas são desenvolvidas com atuação direcionada a estes genes (PAVRI et al., 2016; GRAY-SCHOPFER et al., 2007; BHATIA et al., 2009).

O foco do tratamento tem se voltado ao sistema imunológico do hospedeiro, no intuito de mobilizar células imunes para reconhecer e, eventualmente, eliminar o câncer. Uma marca registrada da imunoterapia é a durabilidade das respostas, provavelmente devido à memória do sistema imune adaptativo, que se traduz em sobrevivência a longo prazo. Inúmeros testes clínicos culminaram na aprovação do Ipilimumabe, em 2011, para o tratamento do melanoma avançado, sendo o primeiro inibidor de checkpoint CTLA-4 aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (SHARMA et al., 2017).

Anticorpos que bloqueiam a o eixo inibitório de PD-1 e PD-L1 podem levar à ativação de células T reativas à tumor e induzir respostas antitumorais duráveis em um número crescente de diferentes tipos de câncer. Assim, após uma série de estudos clínicos desenvolvidos, foram aprovados dois anticorpos anti-PD-1 (Pembrolizumabe e Nivolumabe) e um anticorpo anti-PD-L1 (Atezolimumabe) para o tratamento do melanoma avançado. Inúmeros outros estudos clínicos seguem em andamento para o desenvolvimento de novas drogas (SHARMA et al., 2017).

Entretanto, a ótima combinação ainda não foi determinada e o padrão de tratamento continua sendo o uso de agentes isolados. Somado a isso, as drogas quimioterápicas ainda são consideradas indispensáveis ao tratamento, dentre elas Carboplatina, Cisplatina, Paclitaxel e Dacarbazina, são as mais comumente utilizadas no sistema público de saúde (PAVRI et al., 2016; GRAY-SCHOPFER et al., 2007; BHATIA et al., 2009; AN et al., 2021).

Em estudos mais recentes, a aplicação de nanotecnologia na produção de nanomedicamentos tem exercido grande contribuição no tratamento do melanoma e apresentado vantagens em relação às drogas de pequenas moléculas, como tempo prolongado de circulação sanguínea e aumento do acúmulo nos tumores devido ao efeito de maior permeabilidade e retenção, amplificando os efeitos antitumorais e diminuindo as toxicidades sistêmicas dos quimioterápicos (AN et al., 2021).

A identificação de caminhos de sinalização para a iniciação e progressão do melanoma é a chave para o eficiente tratamento deste tipo de câncer. Logo, ressalta-se a importância das pesquisas no campo do desenvolvimento de terapias-alvo e adaptação destes tratamentos aos pacientes de acordo com a individualidade genética de cada um (GRAY-SCHOPFER et al., 2007).

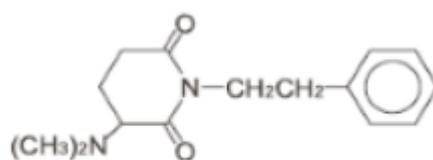
### 3.6. Grupo Maleimida

O desenvolvimento de agentes terapêuticos derivados de produtos naturais e sintéticos impulsiona as pesquisas com o intuito de buscar novos fármacos que proporcionem maior eficácia, segurança e menores efeitos adversos para o tratamento de algumas doenças, inclusive o câncer (ANDRICOPULO et al., 1998; CECHINEL FILHO et al., 2003).

Neste sentido, as imidas cíclicas mostraram ser uma classe de compostos orgânicos interessantes e que possuem diferentes propriedades farmacológicas, tais como: sedativos, hipnóticos, anticonvulsivantes, hipotensivas, diuréticas, carcinostáticas e antimetabólicas, além de outras importantes atividades biológicas, principalmente como bactericidas, fungicidas e inseticidas (ANDRICOPULO et al., 1998; ROSOLEN, 2014).

As imidas cíclicas são compostos que contêm o grupo  $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$ , sendo R um átomo de hidrogênio, grupo alquila ou grupo arila. Estas, são análogas ao alcalóide natural filantimida (Figura 7), isolado das partes aéreas da planta *Phyllanthus sellowianus* (TEMPESTA et al., 1988). Tais compostos podem ser divididos em subclasses, incluindo as succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas, maleimidas e seus respectivos derivados (CECHINEL FILHO et al., 2003).

**Figura 7 – Estrutura química do alcalóide natural filantimida.**



Fonte: Cechinel Filho et al. (2003)

Dentre as razões para a evolução e continuidade dos estudos químicos e biológicos das imidas cíclicas, destaca-se a facilidade de obtenção das mesmas, com bons rendimentos e rotas sintéticas viáveis. Entretanto, ainda há muito a se progredir na determinação de perfil toxicológico, bem como na elucidação dos mecanismos moleculares de ação envolvidos nas propriedades farmacológicas já descobertas (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Complexos com ligantes carboxilados, também contendo estruturas parciais derivadas de maleimida foram investigados quanto à inibição da tioredoxina redutase, enzima que é relevante para o crescimento tumoral e efeitos antiproliferativos em células cancerígenas. Segundo Oliveira et al. (2014) a ação inibidora de tioredoxina redutase desencadeia fortes efeitos citotóxicos em células de câncer de mama MCF-7 e de carcinoma do cólon HT-29, além do mais, demonstrou ser altamente ativa em células Nalm-6 resistentes à vincristina e à daunorrubicina.

Em um outro estudo, realizado por Ali et al. (2017), foram sintetizados novos compostos derivados de maleimida e testados quanto à toxicidade em duas linhagens celulares de melanoma humano (SK-Mel-28 e SK-Mel-103) com resultados satisfatórios contra as células tumorais. Por este desfecho, os autores sugeriram novas pesquisas envolvendo a síntese de novos compostos, contendo o grupo maleimida, para serem testados em diferentes linhagens de células tumorais como tratamento primário ou agente coadjuvante de toxicidade celular.

Winfield et al. (2018) também descreveram a síntese e avaliação biológica de uma série de novos derivados de indol, contendo maleimida em sua composição, como agentes anticâncer (bisindolilmaleimida). Foi utilizada a triagem de células NCI-60, revelando a descoberta de perfis de inibição de crescimento para uma série de linhagens de células, tais como SNB-75 CNS câncer, A498 e UO-31 renal, MDA MB435 melanoma e um painel de linhagens celulares de leucemia.

Como resultado da pesquisa de Mizote et al. (2014), o efeito imunopotenciador do NPCMD (N-propionil cisteaminilfenol-maleimida-dextrano), um substrato de tirosinase tóxico desenvolvido para tratar o melanoma, foi mediado pela ativação do inflamassoma TLR4 e NLRP3 e poderá ser útil para induzir respostas imunes adaptativas eficazes, tanto contra o melanoma, como para outros tumores.

Muito estudados atualmente, os conjugados anticorpo-droga (ADCs), uma classe potente de terapêutica anticâncer, compreendem anticorpos ligados a drogas altamente potentes usando uma variedade de tecnologias de associação. Como terapêuticas, combinam a especificidade dos anticorpos, permitindo a discriminação entre tecido saudável e doente, com a capacidade das drogas citotóxicas de matar células. Esta classe poderosa e estimulante de terapia direcionada mostra-se uma promessa considerável no tratamento de vários cânceres e já apresenta algumas medicações aprovadas pelos órgãos regulamentadores americanos, além de uma série de pesquisas clínicas em andamento (CHUDASAMA et al., 2016; SAU et al., 2017).

### 3.7. Fragmento Farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil

Este radical farmacofórico, considerado como um agente citotóxico, tem a habilidade de reduzir a proliferação celular, características necessárias em agentes quimioterápicos, que podem ser associados a agentes reguladores de ciclo celular e causar eliminação de células por danos ao DNA (OLIVEIRA et al., 2018a).

Inúmeros estudos ao longo dos anos utilizaram este radical em séries de compostos, com o intuito de avaliar seu potencial de citotoxicidade. Jha et al. (2010) o utilizaram em associação com o grupo maleimida para testes em células humanas (Molt4/C8 de leucemia e CEM linfócitos T de linfoma) e em células de murino (L1210 de leucemia linfocítica em ratos) e observaram o efeito citotóxico.

Um novo complexo de cobre contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil foi avaliado quanto sua atividade antitumoral em células de adenocarcinoma mamário de murino 4T1 e seu efeito toxicogênico em camundongos *Swiss*. Os autores observaram citotoxicidade e genotoxicidade para células 4T1, além de indução de parada do ciclo celular em fase G1 que ocorreu pelo aumento da expressão de ATM e P21. O composto também levou as células tumorais à apoptose devido ao aumento de expressão de BAX e da caspase-7. *In vivo*, o composto apresentou genotoxicidade em camundongos, sem apresentar, no entanto, danos permanentes, o qual foi observado pela ausência de formação de micronúcleos. Além do mais, não induziu alterações nos parâmetros biométricos dos animais. Isso demonstra que moléculas contendo o grupo 1,4-dioxo-2-butenil apresentam potencial terapêutico para o câncer sem trazer grandes danos ao organismo (OLIVEIRA et al., 2018b).

Outro estudo testou novo composto contendo 1,4-dioxo-2-butenil que apresentou efeito quimioprotetor, com potencial para prevenir danos genotóxicos, não aumentou a fagocitose esplênica e induziu morte celular. Entretanto, quando utilizado em adjuvância com quimioterápicos (doxorubicina, cisplatina e ciclofosfamida), apresentou interferência na efetividade destes agentes, demonstrando diminuição na fagocitose e na capacidade de causar morte celular. Sendo assim, estes resultados, não indicaram a utilização destes compostos em associação com os quimioterápicos testados (OLIVEIRA et al., 2019).

### 3.8.Elemento Químico Enxofre

De acordo com Shankar et al. (2018) o elemento químico enxofre e sua gama de compostos orgânicos e inorgânicos são conhecidos por suas diversas atividades biológicas, dentre elas, ação antioxidante, propriedades antimicrobianas e até propriedades anticâncer. Entretanto, por ser uma partícula de tamanho grande, ter baixa atividade reativa e ser tóxica o seu uso torna-se limitado no desenvolvimento de um agente de entrega de drogas. Assim, os autores associaram nanopartículas de enxofre com quitosana (biopolímero natural) para testes *in vitro*. Esses compostos apresentaram efeitos antibacterianos contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de inibir a proliferação e migração de células tumorais, com mínimo de efeito tóxico em células normais. Esses resultados demonstram potencial para aplicações médicas, incluindo indicações como antibacterianos e agentes quimioterápicos (SHANKAR et al., 2018).

Ainda utilizando nanotecnologia, Liu et al. (2016) mencionaram, em seu estudo, que tecidos cancerosos apresentam cobre em sua composição e que a privação deste metal do soro mostrou inibir efetivamente a promoção do câncer. Sendo assim, baseado na afinidade entre o enxofre e o cobre, foram sintetizadas nanopartículas de enxofre (Nano-S) que detiveram cobre, atingindo, assim, restrição no crescimento tumoral e inibição da proliferação de células tumorais de melanoma (A375) e de câncer de mama (MCF-7) com mínima toxicidade para células normais, por meio da inativação da via MEK-ERK. Além disso, menores concentrações de Nano-S e menor exposição estimularam a expressão de um transportador de cobre como compensação, o que aumentou ainda mais a captação celular e as atividades anticâncer da cisplatina.

Zeslawska et al. (2018) testaram compostos de enxofre em células T de linfoma de camundongos e demonstraram que, com modificações estruturais na posição de anéis aromáticos, foi possível potencializar a atividade inibitória de efluxo de drogas citotóxicas das células, amenizando um problema que ocorre quando há superexpressão de ABCB1 (P-glicoproteína-P-gp), comum em células tumorais.

Recentemente, An et al. (2021) sintetizaram um pró-fármaco de polímero de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), projetado como um gerador de SO<sub>2</sub> responsivo à glutathiona intracelular (GSH) e um carreador de doxorubicina (DOX) para ser utilizado no tratamento de melanoma subcutâneo e metastático. *In vitro*, as nanopartículas de PDDN-DOX sintetizadas foram internalizadas por células B16F10 e, simultaneamente, liberaram DOX e SO<sub>2</sub> dentro das células

tumorais, reforçando o efeito antitumoral sinérgico por conta das propriedades de estresse oxidativo de SO<sub>2</sub> e dos efeitos tóxicos da DOX. Além disso, os experimentos *in vivo* apresentaram grande potencial para tratamento dessa doença, confirmando os ensaios *in vitro* realizados.

A alimentação também apresenta inúmeros benefícios quando se fala em prevenção de doenças. Substâncias contendo enxofre, como os isotiocianatos (ITCs) chamaram a atenção da comunidade científica por suas propriedades na prevenção e tratamento do câncer. Inúmeras evidências epidemiológicas em estudos científicos sustentam a hipótese de que uma dieta rica em vegetais crucíferos, que são ricos em enxofre, como, por exemplo, agrião, couve, rúcula, couve-flor, brócolis, nabo e rabanete está associada com redução no risco de desenvolvimento de vários tipos de cânceres, em virtude de uma série de efeitos, tais como: ativação metabólica e detoxificação, inflamação, prevenção de angiogênese, prevenção de metástases e regulação do maquinário epigenético. No caso do melanoma, os estudos sugerem que os ITCs podem causar parada de ciclo celular, estresse oxidativo e também induzir apoptose em células de melanoma humano e, por isso, poderão servir como agentes quimioterápicos promissores, podendo ser utilizados para potencializar a eficácia das terapias já existentes (MITSIOGIANNI et al., 2019).

#### 4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, B.; MUHAMMAD, I. Q.; SABA, G. Malignant Melanoma: Skin Cancer – Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 30, n. 4, p. 291-297, 2020.

ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 11, n. 2, p. 81-91, 2013.

ALI, Bakat et al. Cytotoxic effects of a novel maleimide derivative on epithelial and tumor cells. **Bioorganic chemistry**, v. 72, p. 199-207, 2017.

AN, Lin, et al. A sulfur dioxide polymer prodrug showing combined effect with doxorubicin in combating subcutaneous and metastatic melanoma. **Bioactive materials**, v. 6, n. 5, p. 1365-1374, 2021.

ANDRICOPULO, Adriano Defini et al. Synthesis and antibacterial activity of cyclic imides: 3, 4 dichloromaleimides and 3-chloro-4-substituted-maleimides. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 573-577, 1998.

ARAZARENA, Imanol, et al. Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. **Cancer cell**, v. 19, n.1, p. 45-57, 2011.

BARNUM, K. J.; M. J. O'CONNELL. Cell cycle regulation by checkpoints. **Cell Cycle Control**, Springer: 29-40, 2014.

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 241-248, 2007.

BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. **Oncology (Williston Park)**, v. 23, p. 488-496, 2009.

BOOTH, L.A. et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. **Cellular signalling**, v. 26, n. 3, p. 549-555, 2014.

BOX, N. F.; TERZIAN, T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 5, p. 525-533, 2008.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CARVALHO, Pamela Castilho et al. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 715-721, 2015.

CECHINEL FILHO, Valdir et al. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.

CHUDASAMA, Vijay; MARUANI, Antoine; CADDICK, Stephen. Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates. **Nature chemistry**, v. 8, n. 2, p. 114-119, 2016.

COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

DALTON, Stephen. Linking the cell cycle to cell fate decisions. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 10, p. 592-600, 2015.

ERNFORS, P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1397-1407, 2010.

FIGUEIREDO, Licia Caldas, et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Rev Bras de Cancerologia**, v. 49, n.3, p. 179-183, 2003.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.

HAUPT, S. et al. Apoptosis - the p53 network. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 20, p. 4077-4085, 2003.

HAYASHI, Makoto et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. **Eur J Cancer Prev**, v. 12, p. 93-100, 2003.

JHA, Amitabh et al. Derivatives of aryl amines containing the cytotoxic 1, 4-dioxo-2-butenyl pharmacophore. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 5, p. 1510-1515, 2010.

JOVANOVIC, Braslav, et al. Coexisting NRAS and BRAF mutations in primary familial melanomas with specific CDKN2A germline alterations. **The Journal of investigative dermatology**, v. 130, n.2, p. 618-620, 2010.

KRICKER, Anne, et al. Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas. **Cancer Causes & Control**, v. 18, n.3, p. 295-304, 2007.

LIU, Hao, et al. Detention of copper by sulfur nanoparticles inhibits the proliferation of A375 malignant melanoma and MCF-7 breast cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 477, n. 4, p. 1031-1037, 2016.

MAHMOUDI, M. et al. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 5, p. 3407-3432, 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M.. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MEF. Melanoma Education Foundation. Lesões cutâneas do melanoma. Disponível em: <<http://www.skincheck.org/Page4.php>>. 2021. Acessado em: 20/07/2021.

MICHIELIN, O., et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 30, n.12, p. 1884-1901, 2019.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MITSIOSIANNI, Melina, et al. The role of isothiocyanates as cancer chemo-preventive, chemo-therapeutic and anti-melanoma agents. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 106, 2019.

MIZOTE, Yu, et al. TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimide-dextran (NPCMD). **Journal of dermatological science**, v. 73, n. 3, p. 209-215, 2014.

MURRELL, J.; BOARD, R. The use of systemic therapies for the treatment of brain metastases in metastatic melanoma: Opportunities and unanswered questions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 8, p. 833-838, 2013.

NAVARRO, Stephanie Dynczuki et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European journal of medicinal chemistry**, v. 75, p. 132-142, 2014.

NOONAN, Frances P., et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. **Nature communications**, v. 3, n.1, p. 1-10 2012.

OLIVEIRA, Edwin José Torres et al. New Bis copper complex ((Z)-4-((4-chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 356, p. 127-138, 2018b.

OLIVEIRA, Kely Navakoski et al. Organotin complexes containing carboxylate ligands with maleimide and naphthalimide derived partial structures: TrxR inhibition, cytotoxicity and activity in resistant cancer cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 87, p. 794-800, 2014.

OLIVEIRA, Rodrigo Juliano et al. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. **Genetics and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 154-166, 2018a.

OLIVEIRA, Rodrigo Juliano et al. Assessment of the toxicogenic effects and cell death potential of the ester (Z)-methyl 4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoate in combination with cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin. **Genetics and molecular biology**, v. 42, p. 399-410, 2019.

OOI, Hsu Kiang; MA, Lan. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway. **BMC systems biology**, v. 7, n. 1, p. 65, 2013.

PAVRI, Sabrina N. et al. Malignant melanoma: beyond the basics. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 138, n. 2, p. 330e-340e, 2016.

RASTRELLI, Marco et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 2014.

ROSOLEN, D. Citotoxicidade de derivados maleimídicos: relação entre a atividade antitumoral e antiadipogênica. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2014.

SAU, Samaresh et al. Advances in antibody–drug conjugates: a new era of targeted cancer therapy. **Drug discovery today**, v. 22, n. 10, p. 1547-1556, 2017.

SHANKAR, Shiv, et al. Preparation of sulfur nanoparticles and their antibacterial activity and cytotoxic effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 508-517, 2018.

SHARMA, P. et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 707-723, 2017.

TAIT, Stephen WG; GREEN, Douglas R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 621-632, 2010.

TEMPESTA, M. S. et al. Phyllanthimide, a New Alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 3, p. 617-618, 1988.

TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

WAGNER, Jeffrey D., et al. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 5, p. 1774-1799, 2000.

WINFIELD, Hannah J., et al. Synthesis and anticancer activity of novel bisindolyhydroxymaleimide derivatives with potent GSK-3 kinase inhibition. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 14, p. 4209-4224, 2018.

ZESLAWSKA, Ewa, et al. Exocyclic sulfur and selenoorganic compounds towards their anticancer effects: Crystallographic and biological studies. **Anticancer Research**, v. 38, n. 8, p. 4577-4584, 2018.

**ARTIGO****AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, APOPTÓTICOS E DO CICLO CELULAR NA EXPOSIÇÃO AOS COMPOSTOS CONTENDO GRUPO MALEIMIDA E 1,4-DIOXO-2-BUTENIL LIGADOS AO ENXOFRE EM LINHAGEM B16F10**

**Mayara Rodrigues Mota<sup>1,2</sup>, Adrivanio Baranoski<sup>1,2</sup>, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva<sup>1,2</sup>, Cristiane Regina Winck Hortelan<sup>3</sup>, Ingridhy Ostaciana Maia Freitas da Silveira<sup>4</sup>, Rafael Germano Santana<sup>4</sup>, Roberto da Silva Gomes<sup>5</sup>, Rodrigo Juliano Oliveira<sup>1,2,6</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Estudos em Células-Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian – HUMAP, Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares – EBSEH, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta – FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. <sup>3</sup>Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. <sup>4</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. <sup>5</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, North Dakota State University, Fargo, ND, United States. <sup>6</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Paraná, Brasil.

**Resumo**

O melanoma avança em números no mundo e enfatiza-se a importância do estudo de novas estruturas moleculares que poderão ser utilizadas na terapia desta doença. Realizou-se triagem de cinco compostos que combinam o grupo maleimida, 1,4-dioxo-2-butenil e enxofre em sua estrutura, em células B16F10 quanto à citotoxicidade, surgindo dois compostos com resultados mais significativos em inibição de proliferação celular, denominados Composto 3 e Composto 5. Em avaliação em citômetro de fluxo quanto à integridade de membranas e contagem celular, demonstraram redução do número de células em todas as concentrações testadas, sem alteração significativa em integridade de membranas. O perfil de ciclo celular evidenciou retenção na fase G1, principalmente no Composto 3, e aparecimento de população sub-G1. Houve indução de apoptose inicial em ambos os compostos e concentrações testadas. Observou-se aumento de EROs a partir da concentração de 125 µM em ambos os compostos. O estudo de genotoxicidade identificou o Composto 5 como mais eficiente que o Composto 3, aumentando tanto o comprimento do cometa, quanto a quantidade de DNA na cauda. Na expressão gênica, obteve-se aumento de GADD45a, ATR, TP53, CDKN1a, CHK2, COX2 e CASP3, nas concentrações de 125 µM e 500 µM. A ativação de GADD45a indica que os danos causados por ambos compostos são sinalizados por ativação da via p38/JNK, sendo neste caso, possivelmente independente de ativação de P53. Estes resultados, somados, indicam possibilidade terapêutica futura dos mesmos no enfrentamento do melanoma.

**Palavras-chave:** Melanoma; Citotoxicidade; Estresse Oxidativo

## 1.INTRODUÇÃO

O câncer é a doença com expectativa de ser classificada como a principal causa de morte, bem como um dos fatores impeditivos mais importantes no aumento da expectativa de vida no mundo no século XXI. Segundo dados do último relatório da GLOBOCAN, ligada a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2018, a incidência foi de 17 milhões de novos casos de câncer no mundo, levando a óbito quase 9,5 milhões de pessoas (BRAY et al., 2018). Apesar dos números ainda significativos, é possível visualizar queda na incidência de alguns tipos de cânceres, entretanto, quando se fala em melanoma, um tipo de câncer de pele mais agressivo, houve aumento no número de casos no século 21. Estes números, por vezes contraditórios em alguns estudos, são três vezes maiores em homens quando estudamos uma população acima de 75 anos de idade, enquanto que, até a faixa etária dos 40 anos, a incidência é maior em mulheres (RASTRELLI et al., 2014). Ahmed et al. (2020), reforça que este é o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o sexto mais comum em mulheres.

Quanto aos fatores de risco relacionados ao melanoma, a exposição aos raios ultravioleta mostra ser o principal fator modificável relacionado ao ambiente, devido ao seu potencial genotóxico, além do número de nevos melanocíticos presentes, história familiar da doença e susceptibilidade genética. A raça parece ser fator de influência na incidência, evidenciando que a população branca tem risco dez vezes maior em relação à população negra, asiática ou hispânica (RASTRELLI et al., 2014). A maioria dos novos casos de câncer poderiam ter sido evitados pela eliminação ou redução da exposição à fatores de risco ambientais e alteração no estilo de vida (BRAY et al., 2018).

Levando em consideração esses desafios e os altos custos de tratamento da doença, podemos destacar a importância do estudo de novas estruturas moleculares e a reatividade de compostos orgânicos, dentro do contexto de avanços em química orgânica, onde podemos construir substâncias raras ou inéditas que poderão ser utilizadas na terapia adjuvante deste problema de saúde pública. Futuramente, esses compostos orgânicos possibilitarão a descoberta de novas drogas que influenciarão, inclusive, no tratamento de diversas outras doenças (OLIVEIRA et al., 2018a).

Estudos *in vitro* apresentam-se bastante interessantes, por serem rápidos, baratos, possibilitarem a triagem de inúmeras drogas novas e, ainda, identificar os mecanismos de ação, as vias moleculares de atuação, dentre outras necessidades.

Nesse contexto, compostos que apresentam em sua estrutura os grupos maleimida, 1,4-dioxo-2-butenil e enxofre, já demonstraram resultados importantes na inibição de diferentes tipos de células tumorais (ROSOLEN, 2014; OLIVEIRA et al., 2014), atividade antibacteriana, antifúngica (ANDRICOPULO et al., 1998), elevação de EROs (AN et al., 2021), entre outros, demonstrando sua importância como candidatos a futuros agentes anticâncer ou contra outras enfermidades. No entanto, são pouco conhecidos, ainda, muitos de seus mecanismos moleculares.

Desta maneira, este estudo teve como objetivo avaliar compostos que combinam o grupo maleimida e 1,4-dioxo-2-butenil, contendo enxofre em sua estrutura, em células tumorais de melanoma de camundongo (B16F10) com relação à citotoxicidade, sendo os mais efetivos, avaliados quanto à retenção de proliferação celular, danos ao DNA e membranas, interferência no perfil do ciclo celular, indução de estresse oxidativo, morte celular por apoptose, além dos níveis de expressão gênica de genes relacionados a estes aspectos.

## 2.MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Agentes Químicos e Cultivo de Células

Diferentes compostos (5), contendo maleimida, 1,4-dioxo-2-butenil e enxofre foram sintetizadas e cedidas pelo professor Dr. Roberto da Silva Gomes. Foram inicialmente triados nas concentrações de 1,95 a 500  $\mu\text{M}$  quanto a inibição de proliferação de células tumorais de camundongos B16F10 pelo teste MTT. Posteriormente, os compostos 3 e 5 foram escolhidos para aprofundamento de estudos devido a sua maior citotoxicidade. Para os testes, foram utilizados, como controle positivo, a Doxorubicina (5  $\mu\text{M}$ ) (DXR – Pharmacia - CAS 23214-92-8) na avaliação da genotoxicidade, Peróxido de Hidrogênio (0,2  $\mu\text{M}$ ) (SYNTH 01P2233.01.BJ) na avaliação de EROs, a Camptotecina (2  $\mu\text{M}$ ) (CPT – Merck Millipore - CAS 7689-03-4) na avaliação de perfil de morte celular por apoptose e Dacarbazina (1,4 mg/mL) (Eurofarma registro 1.0043.0636) para as demais avaliações. Neste trabalho foi utilizada a linhagem de melanoma B16F10, de *Mus musculus*, livre de micoplasma. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Gibco, CAT- 12800-017), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, CAT - 12657-029) e 0,1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen Cat 15240-096), e mantidas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> à 37° C. Anterior a todos os experimentos, as células foram plaqueadas e mantidas durante 24 h para estabilização prévia até receber os tratamentos.

### 2.2. Viabilidade Celular e Triagem de Compostos

A viabilidade celular e triagem de compostos foi realizada pelo ensaio do MTT, segundo Mosmann (Mosmann 1983). O experimento foi realizado em placas de 96 poços sendo semeadas 10<sup>4</sup> células/poço. Após a estabilização, as células foram tratadas separadamente com 5 diferentes compostos contendo maleimida, 1,4-dioxo-2-butenil e enxofre em sua composição. Os tratamentos foram realizados nas concentrações de 1,95; 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500  $\mu\text{M}$  de cada composto durante 24 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com Phosphate buffered saline - PBS e incubadas com meio contendo MTT (500  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 4 h. Posteriormente, os cristais formazan foram diluídos em Dimetilsulfóxido (100  $\mu\text{L}$ ) e realizado leitura em comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro. A viabilidade celular (%) foi obtida utilizando o cálculo: [(absorbância média do tratado/ absorbância média

do controle) \* 100]. Os experimentos foram realizados em três repetições contendo seis réplicas/tratamento. Os demais experimentos foram realizados apenas com os compostos 3 e 5.

### **2.3.Integridade de Membranas e Contagem Celular**

A verificação de integridade de membranas e contagem numérica de células foram realizadas em citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter). As células ( $2 \times 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos constituídos por: 31,25; 125 e 500  $\mu\text{M}$ , 1.4 mM de Dacarbazina foi utilizado como controle positivo. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 200 G durante 5 minutos e ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Para avaliação da integridade de membrana, 25  $\mu\text{L}$  de Iodeto de Propídio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi adicionado em 100  $\mu\text{L}$  da suspensão, sendo feita leitura após 5 minutos onde a população celular (população celular determinada por SSC e FSC devidamente separadas de restos celulares ou células duplicadas) foi avaliada. Ao mesmo tempo, foi determinado sua concentração em células/ $\mu\text{L}$  e, posteriormente, células por poço.

### **2.4.Perfil de Ciclo Celular e população Sub-G1**

O perfil do ciclo celular foi realizado em citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter). As células ( $2 \times 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos constituídos por 31,25; 125 e 500  $\mu\text{M}$ , dos compostos 3 e 5, 1.4 mM de Dacarbazina foi utilizado como controle positivo. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 200 G durante 5 minutos e ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de RNase (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Invitrogen - CAT: 12091-021) em 100  $\mu\text{L}$  de suspensão celular e mantido à 37° C durante 30 minutos. Para a lise celular e marcação do DNA foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de Iodeto de Propídio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 100  $\mu\text{L}$  de solução de lise (2 mg citrato de sódio, 2  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 e 20 mL de PBS). Foram avaliados 10000 eventos por tratamento para determinar as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M). Também foi avaliada a presença de população Sub-G1(indicativo de corpúsculos apoptóticos) na população celular determinada. Foram realizados 3 experimentos.

## 2.5. Morte Celular por Apoptose

A morte celular por apoptose foi avaliada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. As células ( $2 \times 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos constituídos por 31,25; 125 e 500  $\mu\text{M}$ , dos compostos 3 e 5, 2  $\mu\text{M}$  de CPT foram adicionados. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 250 G durante 5 minutos e ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Foi utilizado o kit BD Pharmingen™ – PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (CAT- 559763) segundo o protocolo do fabricante, onde foram avaliados 10000 eventos por tratamento. Foram estimadas as percentagens de células viáveis em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose. As células com ausência de marcação por anexina e 7-AAD foram consideradas viáveis. Marcadas somente com a anexina foram consideradas em apoptose inicial e células com dupla marcação ou apenas marcadas com 7-AAD foram consideradas em apoptose tardia/necrose. Foram realizados 3 experimentos.

## 2.6. Avaliação de EROs por H<sub>2</sub>DCFDA

A avaliação de estresse oxidativo por geração de espécies reativas de oxigênio - EROs foi realizada em citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter). As células ( $2 \times 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos constituídos por 31,25; 125 e 500  $\mu\text{M}$ , dos compostos 3 e 5 durante 3 h, 300 nM de Peróxido de Hidrogênio (durante 2 h) foi utilizado como controle positivo. Após os tratamentos, 25  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>DCFDA foi adicionado durante 20 minutos. Posteriormente, as células foram colhidas, centrifugadas a 200 G, durante 5 minutos, e ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Foram avaliados 10000 eventos/células por tratamento. Foram realizados 3 experimentos.

## 2.7. Genotoxicidade

A genotoxicidade foi avaliada através do ensaio do Cometa conforme descrito por Collins e colaboradores (Collins et al. 2008). As células ( $2 \times 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos constituídos por 31,25; 125 e 500  $\mu\text{M}$ , dos compostos 3 e 5, 5  $\mu\text{M}$  de Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo, durante 3 h. Após o tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 200 G

durante 5 minutos e ressuspendidas, 20  $\mu\text{L}$  desta suspensão foram diluídos em 120  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e distribuídos em lâminas pré-gelatinizadas com agarose (1,5%). As células foram lisadas (NaCl 2,25 M, EDTA 90 mM, Tris-HCl 9 mM, DMSO a 10% e Triton X-100 a 1%) durante 60 minutos à 4° C e submetidas a condições alcalinas (EDTA Titriplex 1 mM, NaOH 0,3 N) durante 20 minutos, a eletroforese foi realizada em pH >13, 25 V, 300 mA, durante 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 N pH 7,5 corrigido com HCl), fixadas com etanol absoluto, secadas e estocadas à 4° C. Para a análise, 100  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram utilizados para corar o DNA. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Leica, DMI8) com uma ampliação de 200X. Posteriormente, foram analisados 200 nucleóides por repetição, utilizando o programa CometScore 2.0.0.38 TriTek, e avaliados os parâmetros de comprimento do cometa e DNA na cauda (%).

## 2.8. Expressão Gênica

Para avaliação de expressão gênica foi utilizada a técnica RT-qPCR. As células ( $2 \times 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos constituídos por 125 e 500  $\mu\text{M}$ , dos compostos 3 e 5 durante 24 h. Posteriormente, o RNA total foi extraído utilizando Trizol Invitrogen (Cat15596018), segundo o protocolo do fabricante. O RNA foi estocado em freezer -80° C. As amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro (Nanovue Plus) e sua pureza foi estimada com base na razão de absorvância a 260 nm/280 nm, sendo aceitas somente amostras com razão entre 1,8 e 2,1. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1000 ng de RNA total em reação com volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Para a síntese, o RNA total diluído em água DEPC livre de RNase, 2  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM) e 10 pMol de oligo dT<sub>12-18</sub>, e incubados em termociclador T100™ Thermal Cycler BIO-RAD à 65° C/ 5 min. Posteriormente, foi adicionado 0,1  $\mu\text{L}$  RNase out (5 unidades), 4  $\mu\text{L}$  de tampão M-MLV 5x, 0,5  $\mu\text{L}$  M-MLV-RT (100 unidades) e mantidas por 37° C/50', 70° C/15' e a etapa final à 10° C. O cDNA foi diluído à concentração de 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para a utilização na PCR em tempo real. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador Rotor Gene Q (Qiagen), utilizando 11  $\mu\text{L}$  de solução contendo 250 ng de cDNA, 5  $\mu\text{L}$  de GoTaq® qPCR Master Mix Promega (Cat A6002) e 5 pmol de cada oligonucleotídeos, sob as seguintes condições: 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C/15 segundos, 60° C/20 segundos e 72° C/20 segundos. A análise da curva de *Melting* foi realizada no final de cada

reação com temperatura de 55° C à 95° C a cada 0,5 grau por 5 segundos. Como controle endógeno, foi utilizado o gene  $\beta$ -Actina. Foram avaliados os genes envolvidos com danos ao DNA (ATR, GADD45a e TP53), proliferação e ciclo celular (CDKN1a, CHK1 e CHK2), estresse oxidativo (COX2) e morte celular por apoptose (CASP3).

## **2.9. Análise Estatística**

Os valores mensurados para a viabilidade e proliferação celular, genotoxicidade, ciclo celular, integridade de membranas, contagem numérica celular e estresse oxidativo foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett ( $p < 0,05$ ) através do programa GraphPad Prism 5. As análises dos dados de expressão gênica foram realizadas com o método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* inserido no programa Rest 2009 (Pfaffl, Horgan, and Dempfle 2002) tendo significância estatística estabelecida em  $p < 0,05$ .

### 3.RESULTADOS

#### 3.1.Viabilidade Celular e Triagem de Compostos

A viabilidade celular e triagem de compostos foram realizadas pelo ensaio do MTT. Os resultados demonstraram que todos os compostos têm capacidade de inibição celular abaixo de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 1). Observou-se que os compostos apresentam os seguintes IC50, Composto 1: 335,4  $\mu\text{M}$ , com inibição significativa a partir de 31,25  $\mu\text{M}$ ; Composto 2: não atingiu o IC50, com inibição significativa a partir de 62,5  $\mu\text{M}$ ; Composto 3: 192,2  $\mu\text{M}$  com inibição significativa a partir de 1,95  $\mu\text{M}$ ; Composto 4: 441,6  $\mu\text{M}$ , com inibição significativa a partir de 125  $\mu\text{M}$ ; Composto 5: 271,3  $\mu\text{M}$ , com inibição significativa a partir de 62,5  $\mu\text{M}$ . Assim, foram escolhidos os compostos 3 e 5 para os demais experimentos.

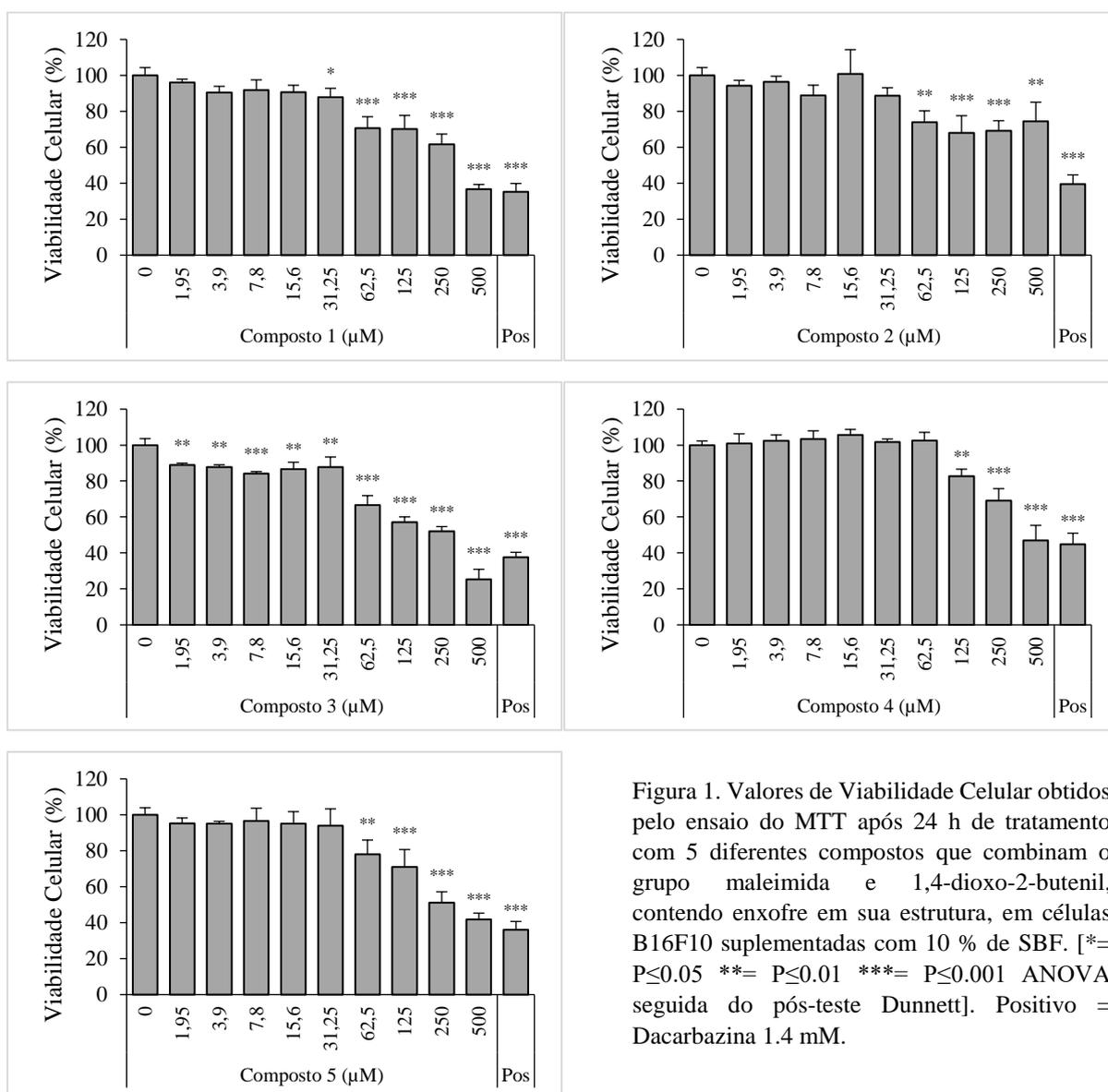


Figura 1. Valores de Viabilidade Celular obtidos pelo ensaio do MTT após 24 h de tratamento com 5 diferentes compostos que combinam o grupo maleimida e 1,4-dioxo-2-butenil, contendo enxofre em sua estrutura, em células B16F10 suplementadas com 10 % de SBF. [\*= P < 0.05 \*\*= P < 0.01 \*\*\*= P < 0.001 ANOVA seguida do pós-teste Dunnett]. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

### 3.2. Integridade de Membranas e Contagem Celular

A integridade de membranas e contagem celular foram realizadas por citometria de fluxo. Observou-se que as células apresentaram redução significativa de integridade de membranas após 24 h de tratamento com os compostos 3 e 5, em todas as concentrações testadas (Figura 2a). Além disso, observou-se significativa redução de número de células no tratamento com ambos compostos, em todas as concentrações testadas, sendo ambas reduções concentração dependente (Figura 2b).

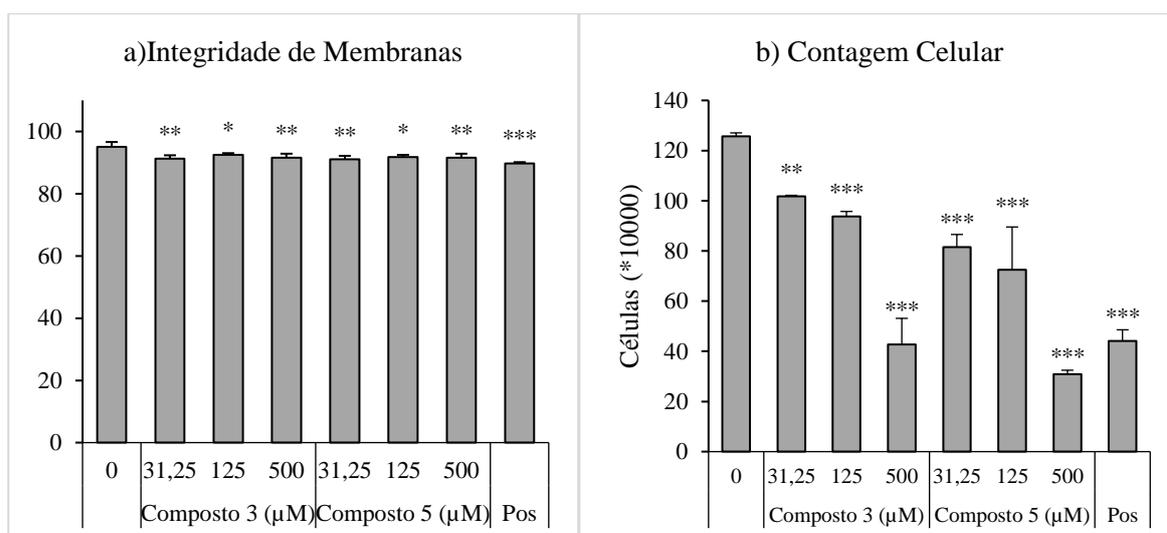


Figura 2. Integridade de Membranas e Contagem celular. a) Percentagem de células com membranas danificadas após o tratamento com compostos 3 e 5 durante 24 h. b) Número de células contadas após o tratamento com compostos 3 e 5 durante 24 h. [\*=  $P \leq 0.05$  \*\*=  $P \leq 0.01$  \*\*\*=  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett]. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

### 3.3. Perfil de Ciclo Celular e população Sub-G1

O perfil de ciclo celular e população sub-G1 foram determinados por citometria de fluxo. Observou-se que ambos compostos, em todas as concentrações testadas, induziram retenção de ciclo na fase G1 de maneira significativa, sendo que o composto 3 apresentou retenção concentração dependente (Figura 3). A avaliação da população sub-G1, um indicativo de morte celular controlada, mostrou aumento dessa população em ambos compostos, sendo significativo nos tratamentos com 500 µM (Figura 4).

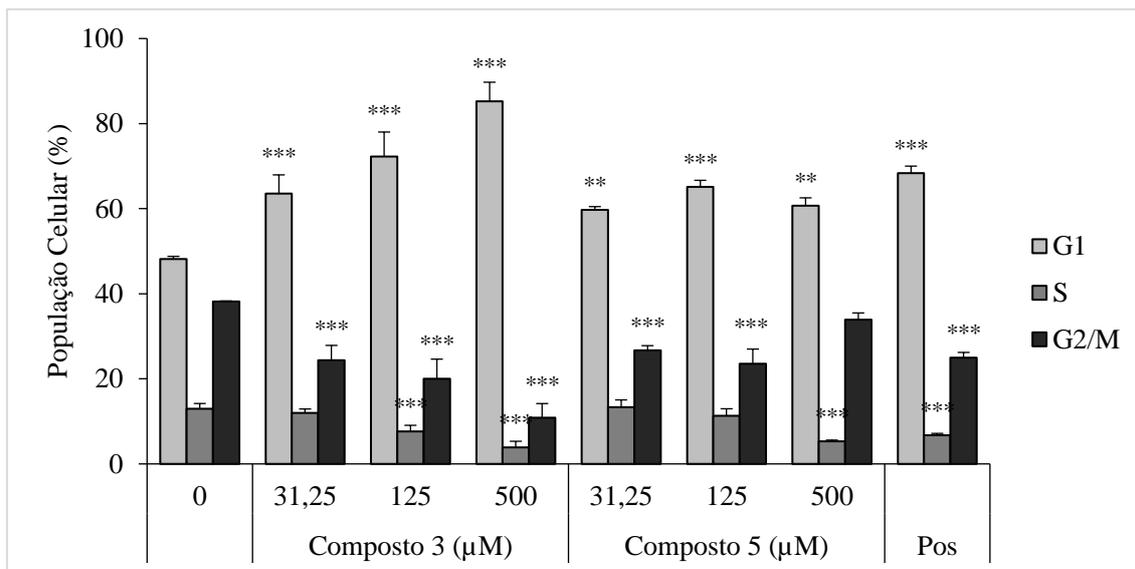


Figura 3. Perfil de ciclo celular após o tratamento com compostos 3 e 5 durante 24 h. [\*=  $P \leq 0.05$  \*\*=  $P \leq 0.01$  \*\*\*=  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett]. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

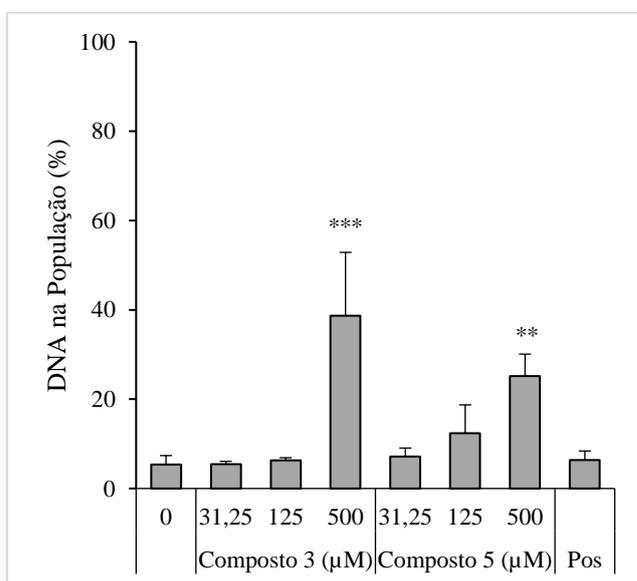


Figura 4. Perfil de população sub-g1 após o tratamento com compostos 3 e 5 durante 24 h. [\*=  $P \leq 0.05$  \*\*=  $P \leq 0.01$  \*\*\*=  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett]. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

### 3.4.Morte Celular por Apoptose

O perfil de morte celular foi determinado por citometria de fluxo. Observou-se que ambos compostos, em todas as concentrações testadas, induziram aumento de morte celular, apresentando apoptose inicial. A apoptose final foi observada somente no composto 5, na concentração mais alta, de 500  $\mu\text{M}$ , com valor de 6,67%.

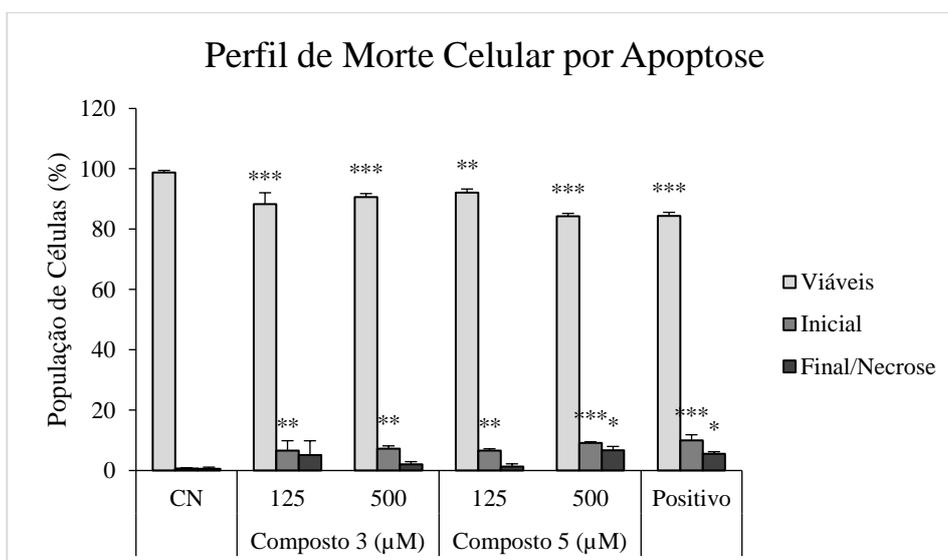


Figura 5. Perfil de Morte Celular por Apoptose no tratamento com os compostos 3 e 5 durante 24h. [ $*$  =  $P \leq 0.05$   $**$  =  $P \leq 0.01$   $***$  =  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett]. Pos = Camptotecina 2  $\mu\text{M}$

### 3.5.Avaliação de EROs por H<sub>2</sub>DCFDA

A avaliação de EROs foi realizada por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que ambos compostos, a partir da concentração 125  $\mu\text{M}$ , induziram aumento de estresse oxidativo por elevação de EROs após 3 h de tratamento (Figura 6).

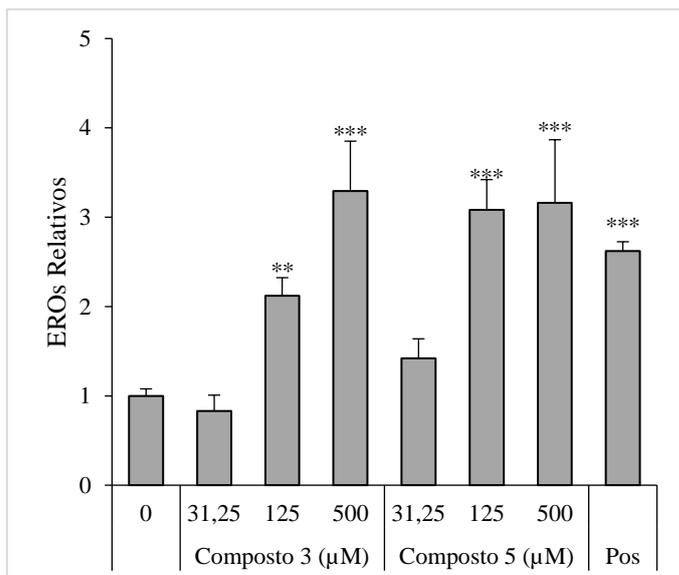


Figura 6. Valores relativos de EROs obtidos por degradação da sonda H<sub>2</sub>DCFDA após o tratamento com os compostos 3 e 5 durante 3 h. [\*= P≤0.05 \*\*= P≤0.01 \*\*\*= P≤0.001 ANOVA seguida do pós-teste Dunnett]. Positivo = Peróxido de Hidrogênio 200 nM

### 3.6. Genotoxicidade

A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do Cometa. Os resultados demonstraram que ambos compostos apresentaram indução de danos ao DNA após 3 h de tratamento, sendo mais efetivo o Composto 5. O Composto 3 apresentou aumento de comprimento significativo de nucleóide (cometa) apenas na concentração de 125 µM (figura 7a), e, na concentração de 500 µM, apresentou somente aumento significativo de DNA na cauda (figura 7b). O Composto 5 apresentou aumento significativo de comprimento do nucleóide (cometa) e porcentagem de DNA na cauda em todas as concentrações testadas, sendo concentração dependente (Figura 7).

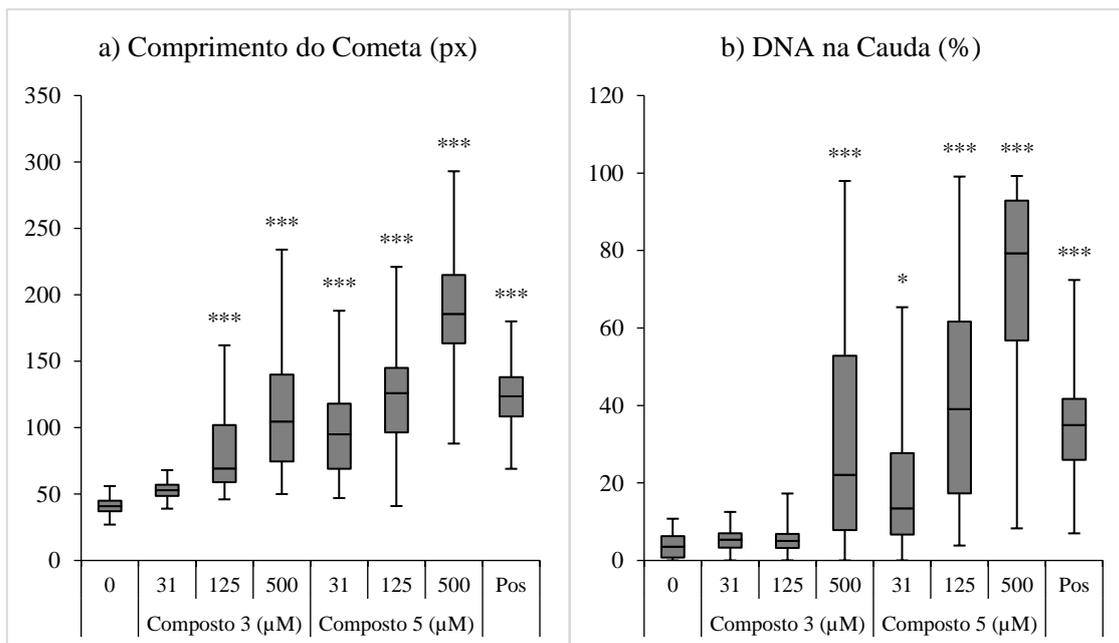


Figura 7. a) Comprimento total do cometa e b) porcentagem de DNA na cauda após o tratamento com os compostos 3 e 5 durante 3 h. [\*=  $P \leq 0.05$  \*\*=  $P \leq 0.01$  \*\*\*=  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett]. Pos = Doxorubicina 5  $\mu\text{M}$

### 3.7. Expressão Gênica

A expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR em tempo real. Os resultados demonstraram que ambos compostos tem a capacidade de modular a expressão de diferentes genes importantes em diferentes rotas de sinalização. No tratamento com o Composto 3, a concentração mais baixa (125  $\mu\text{M}$ ) induziu aumento de expressão de mRNA do gene *GADD45a* (2,65 vezes), no entanto, na concentração mais alta (500  $\mu\text{M}$ ), houve indução de aumento de expressão de mRNA dos genes *ATR* (3,28 vezes), *GADD45a* (168 vezes), *TP53* (2,19 vezes), *CDKN1a* (10,39 vezes), *CHK2* (2,24 vezes), *COX2* (5,62 vezes) e *CASP3* (2,95 vezes). No tratamento com o Composto 5, a concentração mais baixa (125  $\mu\text{M}$ ) induziu aumento de expressão de mRNA dos genes *GADD45a* (8,92 vezes), *CDKN1a* (1,73 vezes) e *COX2* (6,33 vezes) entretanto, na concentração mais alta (500  $\mu\text{M}$ ), houve indução de aumento de expressão de mRNA dos genes *GADD45a* (230 vezes), *CDKN1a* (7,34 vezes) e *CASP3* (1,9 vezes) e indução de redução de mRNA do gene *CHK1* (2,51 vezes). A Figura 8 apresenta os resultados de expressão gênica para ambos compostos.

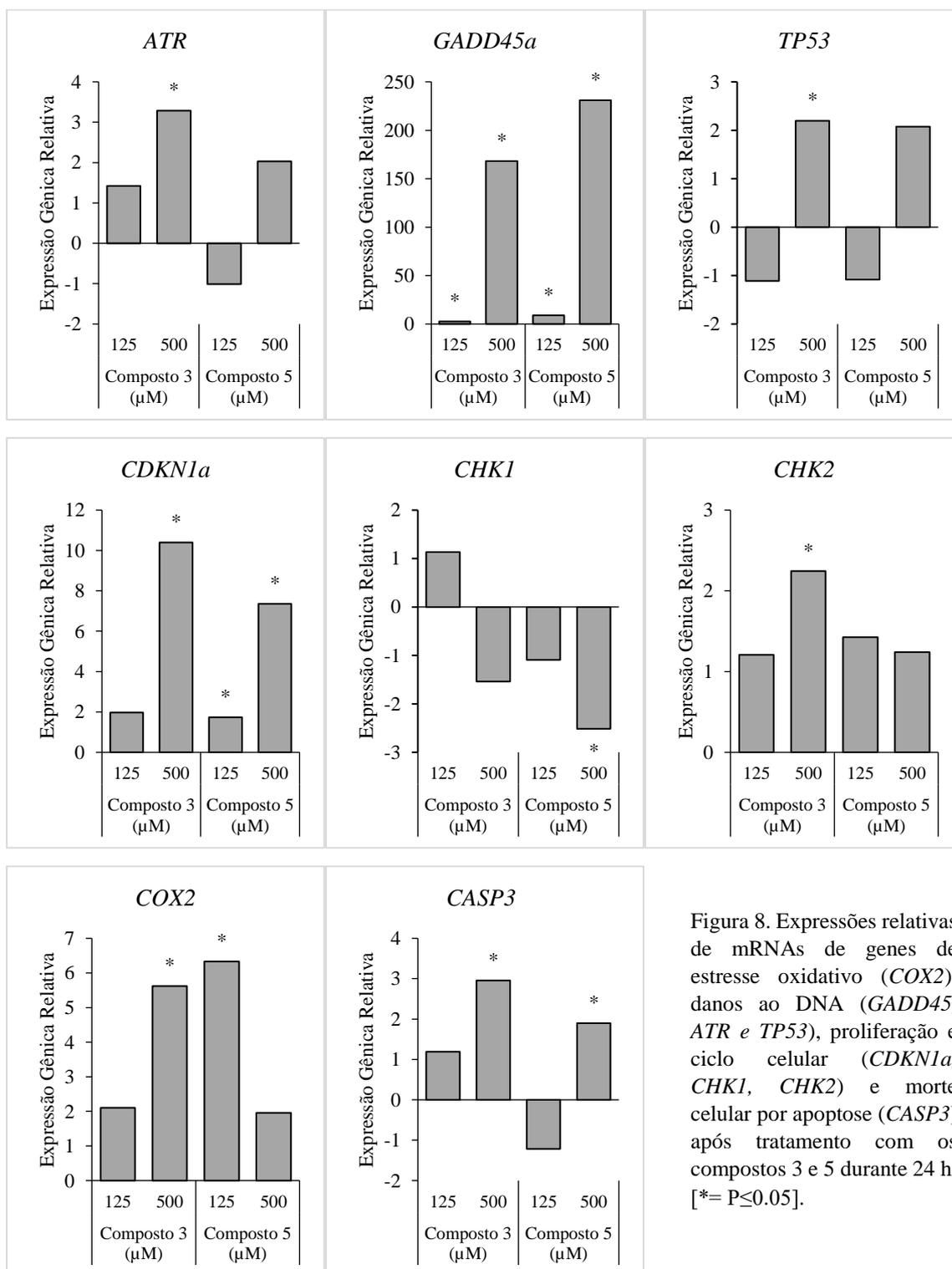


Figura 8. Expressões relativas de mRNAs de genes de estresse oxidativo (*COX2*), danos ao DNA (*GADD45*, *ATR* e *TP53*), proliferação e ciclo celular (*CDKN1a*, *CHK1*, *CHK2*) e morte celular por apoptose (*CASP3*) após tratamento com os compostos 3 e 5 durante 24 h. [\*= $P \leq 0.05$ ].

#### 4.DISCUSSÃO

O melanoma é um dos mais letais tumores de pele, com números elevados em morbidade e mortalidade e uma ameaça à saúde humana. Diante disso, a identificação de modalidades efetivas de tratamento é de extrema importância (AHMED et al., 2020; AN et al., 2021). A exposição aos raios ultravioleta mostra ser o principal fator modificável relacionado ao ambiente, devido ao seu potencial genotóxico. Os demais fatores englobam: número de nevos melanocíticos presentes, história familiar da doença e susceptibilidade genética (ALI et al., 2013; RASTRELLI et al., 2014).

Descobertas na sinalização celular têm proporcionado uma maior compreensão da biologia do melanoma. Desta forma, torna-se importante a busca pelo entendimento das vias moleculares e mutações desta doença. Neste sentido, avaliamos cinco compostos, contendo o grupo maleimida, 1,4-dioxo-2-butenil e enxofre em sua estrutura, em células B16F10, com relação à citotoxicidade, sendo os mais efetivos, avaliado quanto à retenção de proliferação celular, danos ao DNA e membranas, interferência no perfil do ciclo celular, indução de estresse oxidativo, além dos níveis de expressão gênica de genes relacionados a estes aspectos.

De acordo com os resultados apresentados, observou-se citotoxicidade pelo ensaio do MTT, sendo possível identificar dois compostos mais eficientes neste sentido, os quais foram denominados como Composto 3 e Composto 5. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado por Ali et al (2017), onde compostos foram sintetizados utilizando maleimida e submetidos ao MTT com linhagens de melanoma humano (SK-Mel-28 e SK-Mel-103), demonstrando citotoxicidade em concentrações acima de 25  $\mu$ M em 14 horas de incubação. Quando foram associados ao antineoplásico paclitaxel, a toxicidade mostrou-se presente até em concentrações inferiores, de 1  $\mu$ M. Compostos com o radical farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil, testados em células 4T1 de adenocarcinoma mamário de murino, demonstraram atividade antitumoral *in vitro*, observando-se também citotoxicidade (OLIVEIRA et al., 2018b). Jha et al (2010) também reforça a atividade citotóxica deste radical, somando-o à habilidade de redução na proliferação celular. Liu et al (2016) descreve a síntese de nanopartículas (Nano-S), contendo enxofre em sua composição, as quais demonstraram capacidade de inibição de proliferação de células tumorais de melanoma (A375) e de câncer de mama (MCF-7), com mínima toxicidade para as células normais, demonstrando grande capacidade desse radical na inibição de proliferação celular.

No que tange à contagem celular, observou-se redução significativa do número de células no tratamento com ambos os compostos, corroborando com os resultados do MTT e, demonstrando efeito similar ao visualizado por Ali et al (2017), onde a associação de paclitaxel com maleimida induziu morte celular da linhagem SK-Mel-28, reduzindo o número de células viáveis em comparação ao grupo controle.

Em relação à retenção de ciclo celular, avaliado por citometria de fluxo, o estudo demonstrou acentuada retenção na fase G1, principalmente no composto 3, indicando interferência na síntese de enzimas, RNA e componentes estruturais, além de crescimento celular em tamanho (DALTON, 2015), além disso, observou-se ativação de CDKN1a, possivelmente mediada por CHK2 e TP53 no composto 3. Evidências demonstram que, substâncias contendo enxofre, como os Isotiocianatos – ITCs - chamaram a atenção da comunidade científica por suas propriedades na prevenção e tratamento do câncer. No caso do melanoma, os estudos envolvendo ITCs causaram parada de ciclo celular e, também indução de apoptose em células de melanoma humano, por modulação dos níveis de expressão de reguladores de ciclo, incluindo as ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs) (MITSIOGIANNI et al., 2019). O radical 1,4-dioxo-2-butenil também demonstrou atividade neste sentido, induzindo retenção de ciclo celular em fase G1, aumentando a expressão dos genes ATM e p21 (CDKN1a) (OLIVEIRA et al., 2018b).

Observou-se também a marcação de população sub-G1, com a presença de corpúsculos apoptóticos que carregam parte do DNA das células lisadas, evidenciando que a redução em viabilidade e contagem celular não se trata apenas de retenção de ciclo, mas também nos fornece indícios de ocorrência de morte celular, confirmados pela indução de apoptose inicial em ambos os compostos e concentrações testadas, e, molecularmente, observou-se ativação de CASP3 em ambos compostos, indicando que a redução de número de células e marcação de população sub-G1 se devem a indução de morte celular por apoptose inicial.

A elevação de estresse oxidativo causa peroxidação lipídica (BI, QU et al., 2015). Observou-se que o tratamento aplicado induziu redução de integridade de membranas devido aumento de estresse oxidativo após 24 horas, reduzindo sua viabilidade, causado pela peroxidação lipídica e, conseqüente, danos em membranas, pela elevação de estresse oxidativo.

Na avaliação de estresse oxidativo, observou-se aumento de EROs a partir da concentração de 125 µM, em ambos os compostos, após 3 horas de tratamento. Elevação de duas a três vezes, significativas, porém pouco expressivas, sugerindo que, concentrações mais

baixas das soluções destes compostos não consigam gerar estresse suficiente para causar peroxidação lipídica de membranas. Entretanto, houve resultado positivo, mesmo que pequeno, indicando ser este um dos mecanismos responsáveis de dano ao DNA das células B16F10. Neste sentido, também foi observada ativação de COX2 em ambos compostos, a não significância de COX2 no composto 5, no tratamento mais alto, pode indicar que a oxidação ocorreu em menos tempo.

Recentemente, An et al. (2021) sintetizaram um pró-fármaco de polímero de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), projetado como um gerador de SO<sub>2</sub> responsivo à glutatona intracelular (GSH) e um carreador de doxorubicina (DOX) para ser utilizado no tratamento de melanoma subcutâneo e metastático. *In vitro*, as nanopartículas de PDDN-DOX sintetizadas foram internalizadas por células B16F10 e, simultaneamente, liberaram DOX e SO<sub>2</sub> dentro das células tumorais, reforçando o efeito antitumoral sinérgico por conta das propriedades de estresse oxidativo de SO<sub>2</sub> e dos efeitos tóxicos da DOX. Neste sentido, pode-se considerar que o enxofre possa ter sido o protagonista nos resultados deste ensaio.

O estudo de genotoxicidade, realizado após 3 horas de tratamento, identificou resultados expressivos em ambos os compostos. O composto 5 mostrou-se ainda mais eficiente em danos genotóxicos que o composto 3, aumentando tanto o comprimento do cometa, quanto a quantidade de DNA na cauda, molecularmente, observou-se ativação massiva de GADD45a, um dos principais indicadores de danos, além de aumento em ATR para o composto 3. A proteína codificada por GADD45a responde a estresses ambientais mediando a ativação da via p38/JNK por MTK1/MEKK4 quinase, funcionando dependente ou independente de ativação de P53 (Balliet et al. 2003), sugerindo ativação da via p38/JNK por ambos compostos. Compostos sintetizados, contendo 1,4-dioxo-2-butenil, quando submetidos a 4 horas de tratamento em concentração de IC<sub>50</sub>, apresentaram resultados semelhantes no ensaio do cometa, realizado por Oliveira et al, 2018b, em células 4T1 de carcinoma mamário murino.

Assim, conclui-se que, após a seleção dos compostos que apresentaram os menores IC<sub>50</sub>, denominados Compostos 3 e 5; observou-se redução significativa do número de células em ambos os compostos (concentração-dependente), sem alteração significativa em integridade de membranas. Houve retenção em fase G1, maior no Composto 3 na concentração de 500 µM, possivelmente pela ativação de CDKN1A, mediada por CHK2 e TP53. Observou-se aparecimento de população sub-G1, além de apoptose inicial e ativação de CASP3, induzida principalmente pelo Composto 3. Resultados, estes, induzidos pelo aumento de EROs em

ambos os compostos (concentração-dependente), confirmados molecularmente por aumento de COX2, causando danos genotóxicos observados por aumento no comprimento do cometa e quantidade de DNA na cauda, comprovados pelo aumento de expressão de mRNA de GADD45a. A ativação de GADD45a indica que os danos causados por ambos compostos são sinalizados por ativação da via p38/JNK, sendo neste caso, possivelmente independente de ativação de P53.

## **5.AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia (FUNDECT), pelo financiamento da pesquisa.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, B.; MUHAMMAD, I. Q.; SABA, G. Malignant Melanoma: Skin Cancer – Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 30, n. 4, p. 291-297, 2020.

ALI, Bakat et al. Cytotoxic effects of a novel maleimide derivative on epithelial and tumor cells. **Bioorganic chemistry**, v. 72, p. 199-207, 2017.

ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 11, n. 2, p. 81-91, 2013.

AN, Lin, et al. A sulfur dioxide polymer prodrug showing combined effect with doxorubicin in combating subcutaneous and metastatic melanoma. **Bioactive materials**, v. 6, n. 5, p. 1365-1374, 2021.

ANDRICOPULO, Adriano Defini et al. Synthesis and antibacterial activity of cyclic imides: 3, 4 dichloromaleimides and 3-chloro-4-substituted-maleimides. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 573-577, 1998.

AROZARENA, Imanol, et al. Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. **Cancer cell**, v. 19, n.1, p. 45-57, 2011.

BALLIET, A. G. et al. Comparative analysis of the genetic structure and chromosomal location of the murine MyD118 (GADD45 $\beta$ ) gene. **DNA and cell biology**, v. 20, n. 4, p. 239-247, 2001.

BARNUM, K. J.; M. J. O'CONNELL. Cell cycle regulation by checkpoints. **Cell Cycle Control**, Springer: 29-40, 2014.

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 241-248, 2007.

BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. **Oncology (Williston Park)**, v. 23, p. 488-496, 2009.

BI, Y. et al. Neuroprotective effects of alkaloids from Piper longum in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 10, p. 1516-1524, 2015.

BOOTH, L.A. et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. **Cellular signalling**, v. 26, n. 3, p. 549-555, 2014.

BOX, N. F.; TERZIAN, T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 5, p. 525-533, 2008.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CARVALHO, P. C. et al. Diaryl sulfide analogs of combretastatin A-4: Toxicogenetic, immunomodulatory and apoptotic evaluations and prospects for use as a new chemotherapeutic drug. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 715-721, 2015.

CECHINEL FILHO, V. et al. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.

CHUDASAMA, Vijay; MARUANI, Antoine; CADDICK, Stephen. Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates. **Nature chemistry**, v. 8, n. 2, p. 114-119, 2016.

COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

DALTON, Stephen. Linking the cell cycle to cell fate decisions. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 10, p. 592-600, 2015.

ERNFORS, P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1397-1407, 2010.

FIGUEIREDO, Licia Caldas, et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Rev Bras de Cancerologia**, v. 49, n.3, p. 179-183, 2003.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.

HAUPT, S. et al. Apoptosis - the p53 network. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 20, p. 4077-4085, 2003.

HAYASHI, Makoto et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. **Eur J Cancer Prev**, v. 12, p. 93-100, 2003.

JHA, Amitabh et al. Derivatives of aryl amines containing the cytotoxic 1, 4-dioxo-2-butenyl pharmacophore. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 5, p. 1510-1515, 2010.

JOVANOVIC, Braslav, et al. Coexisting NRAS and BRAF mutations in primary familial melanomas with specific CDKN2A germline alterations. **The Journal of investigative dermatology**, v. 130, n.2, p. 618-620, 2010.

KRICKER, Anne, et al. Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas. **Cancer Causes & Control**, v. 18, n.3, p. 295-304, 2007.

LIU, Hao, et al. Detention of copper by sulfur nanoparticles inhibits the proliferation of A375 malignant melanoma and MCF-7 breast cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 477, n. 4, p. 1031-1037, 2016.

MAHMOUDI, M. et al. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 5, p. 3407-3432, 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M.. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MEF. Melanoma Education Foundation. Lesões cutâneas do melanoma. Disponível em: <<http://www.skincheck.org/Page4.php>>. 2021. Acessado em: 20/07/2021.

MICHIELIN, O., et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 30, n.12, p. 1884-1901, 2019.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MITSIOSIANNI, Melina, et al. The role of isothiocyanates as cancer chemo-preventive, chemo-therapeutic and anti-melanoma agents. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 106, 2019.

MIZOTE, Yu, et al. TLR4 and NLRP3 inflammasome activation in monocytes by N-propionyl cysteaminyphenol-maleimide-dextran (NPCMD). **Journal of dermatological science**, v. 73, n. 3, p. 209-215, 2014.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURRELL, J.; BOARD, R. The use of systemic therapies for the treatment of brain metastases in metastatic melanoma: Opportunities and unanswered questions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 8, p. 833-838, 2013.

NAVARRO, Stephanie Dynczuki et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European journal of medicinal chemistry**, v. 75, p. 132-142, 2014.

NOONAN, Frances P., et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. **Nature communications**, v. 3, n.1, p. 1-10 2012.

OLIVEIRA, Edwin José Torres et al. New Bis copper complex ((Z)-4-((4-chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 356, p. 127-138, 2018b.

OLIVEIRA, Kely Navakoski et al. Organotin complexes containing carboxylate ligands with maleimide and naphthalimide derived partial structures: TrxR inhibition, cytotoxicity and activity in resistant cancer cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 87, p. 794-800, 2014.

OLIVEIRA, Rodrigo Juliano et al. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. **Genetics and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 154-166, 2018a.

OLIVEIRA, Rodrigo Juliano et al. Assessment of the toxicogenic effects and cell death potential of the ester (Z)-methyl 4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-anoate in combination with cisplatin, cyclophosphamide and doxorubicin. **Genetics and molecular biology**, v. 42, p. 399-410, 2019.

OOI, Hsu Kiang; MA, Lan. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway. **BMC systems biology**, v. 7, n. 1, p. 65, 2013.

PAVRI, Sabrina N. et al. Malignant melanoma: beyond the basics. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 138, n. 2, p. 330e-340e, 2016.

PFAFFL, Michael W.; HORGAN, Graham W.; DEMPFLER, Leo. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002.

RASTRELLI, Marco et al. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 2014.

ROSOLEN, D. Citotoxicidade de derivados maleimídicos: relação entre a atividade antitumoral e antiadipogênica. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2014.

SAU, Samaresh et al. Advances in antibody–drug conjugates: a new era of targeted cancer therapy. **Drug discovery today**, v. 22, n. 10, p. 1547-1556, 2017.

SHANKAR, Shiv, et al. Preparation of sulfur nanoparticles and their antibacterial activity and cytotoxic effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 508-517, 2018.

SHARMA, P. et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 707-723, 2017.

TAIT, Stephen WG; GREEN, Douglas R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 621-632, 2010.

TEMPESTA, M. S. et al. Phyllanthimide, a New Alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 3, p. 617-618, 1988.

TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

WAGNER, Jeffrey D., et al. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 5, p. 1774-1799, 2000.

WINFIELD, Hannah J., et al. Synthesis and anticancer activity of novel bisindolyhydroxymaleimide derivatives with potent GSK-3 kinase inhibition. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 26, n. 14, p. 4209-4224, 2018.

ZESLAWSKA, Ewa, et al. Exocyclic sulfur and selenoorganic compounds towards their anticancer effects: Crystallographic and biological studies. **Anticancer Research**, v. 38, n. 8, p. 4577-4584, 2018.

## 7.APENDICES

**Tabela S1** - Viabilidade Celular obtidos pelo ensaio do MTT em 24 horas de tratamento com os compostos 3 e 5 em diferentes concentrações. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

	Composto 1	Composto 2	Composto 3	Composto 4	Composto 5
<b>0 <math>\mu</math>M</b>	100 $\pm$ 4,3	100 $\pm$ 4,3	100 $\pm$ 3,5	100 $\pm$ 2,2	100 $\pm$ 3,9
<b>1,95 <math>\mu</math>M</b>	96 $\pm$ 1,8	94,2 $\pm$ 3	88,8 $\pm$ 1,1 **	100,8 $\pm$ 5,4	95,2 $\pm$ 2,9
<b>3,9 <math>\mu</math>M</b>	90,5 $\pm$ 3,3	96,3 $\pm$ 3,1	87,7 $\pm$ 1,3 **	102,3 $\pm$ 3,2	95,1 $\pm$ 1,2
<b>7,8 <math>\mu</math>M</b>	91,7 $\pm$ 5,7	88,8 $\pm$ 5,6	84,2 $\pm$ 1 ***	103,3 $\pm$ 4,5	96,6 $\pm$ 7,05
<b>15,6 <math>\mu</math>M</b>	90,5 $\pm$ 3,9	100,8 $\pm$ 13,4	86,6 $\pm$ 3,7 **	105,6 $\pm$ 3,1	95,1 $\pm$ 6,6
<b>31,25 <math>\mu</math>M</b>	87,9 $\pm$ 4,8 *	88,63 $\pm$ 4,4	87,7 $\pm$ 5,6 **	101,6 $\pm$ 1,7	93,9 $\pm$ 9,3
<b>62,5 <math>\mu</math>M</b>	70,5 $\pm$ 6,4 ***	73,8 $\pm$ 6,3 **	66,6 $\pm$ 5,2 ***	102,5 $\pm$ 4,5	78,1 $\pm$ 7,8 **
<b>125 <math>\mu</math>M</b>	70,1 $\pm$ 7,5 ***	67,9 $\pm$ 9,5 ***	57,1 $\pm$ 2,9 ***	82,7 $\pm$ 3,9 **	71 $\pm$ 9,6 ***
<b>250 <math>\mu</math>M</b>	61,6 $\pm$ 5,6 ***	69 $\pm$ 5,6 ***	51,9 $\pm$ 2,6 ***	69 $\pm$ 6,6 ***	51,1 $\pm$ 6 ***
<b>500 <math>\mu</math>M</b>	36,7 $\pm$ 2,5 ***	74,4 $\pm$ 10,6 **	25,2 $\pm$ 5,6 ***	47 $\pm$ 8,3 ***	41,8 $\pm$ 3,4 ***
<b>C+</b>	35,2 $\pm$ 4,5 ***	39,4 $\pm$ 5,1 ***	37,5 $\pm$ 2,7 ***	44,9 $\pm$ 6 ***	35,9 $\pm$ 4,6 ***

[\*= P $\leq$ 0.05 \*\*= P $\leq$ 0.01 \*\*\*= P $\leq$ 0.001 ANOVA seguida do pós-teste Dunnett].

**Tabela S2** – Integridade de Membrana. Percentual de células com membranas integras obtidos por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações dos compostos 3 e 5. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

Integridade de Membranas		
Negativo		95,06 $\pm$ 1,56
Composto 3 ( $\mu$ M)	31,25	91,25 $\pm$ 1,09 **
	125	92,5 $\pm$ 0,54 *
	500	91,58 $\pm$ 1,27 **
Composto 5 ( $\mu$ M)	31,25	91,02 $\pm$ 1,15 **
	125	91,81 $\pm$ 0,67 *
	500	91,58 $\pm$ 1,27 **
Positivo		89,76 $\pm$ 0,37 ***

[\*= P $\leq$ 0.05 \*\*= P $\leq$ 0.01 \*\*\*= P $\leq$ 0.001 ANOVA seguida do pós-teste Dunnett].

**Tabela S3** – Contagem Celular. Número de células por mL (\*10000) obtidos por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações dos compostos 3 e 5. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

Contagem Celular (x10000)		
Negativo		125,72 ± 1,32
Composto 3 (µM)	31,25	101,73 ± 0,41 **
	125	93,79 ± 1,94 ***
	500	42,68 ± 10,44 ***
Composto 5 (µM)	31,25	81,57 ± 4,99 ***
	125	72,43 ± 17,09 ***
	500	30,84 ± 1,6 ***
Positivo		44,1 ± 4,46 ***

[\*= P≤0.05 \*\*= P≤0.01 \*\*\*= P≤0.001 ANOVA seguida do pós-teste Dunnett].

**Tabela S4** – Ciclo Celular e População Sub G1. Percentual de população Sub G1 e percentual de células em fase G1, S e G2/M obtidos por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações dos compostos 3 e 5. Positivo = Dacarbazina 1.4 mM.

		Sub G1	G1	S	G2/M
Negativo		5,36 ± 2,01	48,2 ± 0,59	13 ± 1,2	38,2 ± 0,09
Composto 3 (µM)	31,25	5,46 ± 0,62	63,56 ± 4,38 ***	12 ± 0,91	24,4 ± 3,46 ***
	125	6,29 ± 0,59	72,26 ± 5,76 ***	7,63 ± 1,43 ***	20,03 ± 4,6 ***
	500	38,7 ± 14,16 ***	85,23 ± 4,5 ***	3,91 ± 1,4 ***	10,86 ± 3,32 ***
Composto 5 (µM)	31,25	7,12 ± 1,93	59,73 ± 0,75 **	13,33 ± 1,71	26,7 ± 1,1 ***
	125	12,37 ± 6,35	65,13 ± 1,53 ***	11,33 ± 1,62	23,56 ± 3,43 ***
	500	25,13 ± 4,94 **	60,7 ± 1,85 **	5,32 ± 0,27 ***	33,93 ± 1,55
Positivo		6,37 ± 2,01	68,33 ± 1,67 ***	6,73 ± 0,43 ***	24,96 ± 1,24 ***

[\*= P≤0.05 \*\*= P≤0.01 \*\*\*= P≤0.001 ANOVA seguida do pós-teste Dunnett].

**Tabela S5** –Perfil de Morte Celular por Apoptose no tratamento com os compostos 3 e 5 durante 24h. Positivo = Camptotecina 2  $\mu$ M

	CN	Composto 3 ( $\mu$ M)		Composto 5 ( $\mu$ M)		Positivo
		125	500	125	500	
Viáveis	98,76 $\pm$ 0,7	88,26 $\pm$ 3,8 ***	90,63 $\pm$ 1,15 ***	92,06 $\pm$ 1,24 **	84,23 $\pm$ 1 ***	84,4 $\pm$ 1,17 ***
A. Inicial	0,63 $\pm$ 0,27	6,56 $\pm$ 3,32 **	7,28 $\pm$ 0,88 **	6,56 $\pm$ 0,63 **	9,1 $\pm$ 0,45 ***	10,02 $\pm$ 1,83 ***
A. Final/Necrose	0,59 $\pm$ 0,52	5,16 $\pm$ 4,69	2,07 $\pm$ 0,85	1,36 $\pm$ 0,85	6,67 $\pm$ 1,3 *	5,57 $\pm$ 0,64 *

[\*=  $P \leq 0.05$  \*\*=  $P \leq 0.01$  \*\*\*=  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett].

**Tabela S6** – Geração de EROs por H<sub>2</sub>DCFDA. Valores relativos de fluorescência (RFU) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações dos compostos 3 e 5. Positivo = Peróxido de Hidrogênio 200 nM

Estresse Oxidativo		
Negativo		1 $\pm$ 0,07
Composto 3 ( $\mu$ M)	31,25	0,82 $\pm$ 0,17
	125	2,12 $\pm$ 0,2 **
	500	3,29 $\pm$ 0,55 ***
Composto 5 ( $\mu$ M)	31,25	1,42 $\pm$ 0,21
	125	3,08 $\pm$ 0,33 ***
	500	3,16 $\pm$ 0,7 ***
Positivo		2,62 $\pm$ 0,1 ***

[\*=  $P \leq 0.05$  \*\*=  $P \leq 0.01$  \*\*\*=  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett].

**Tabela S7** – Genotoxicidade. Comprimento total do Cometa e percentagem de DNA na cauda obtidos pelo ensaio do Cometa após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações dos compostos 3 e 5. Positivo = Doxorubicina 5  $\mu$ M

		Comprimento do Cometa (px)	DNA na Cauda (%)
Negativo		41,4	3,8
Composto 3 ( $\mu$ M)	31	54	5,2
	125	83,7 ***	10,7
	500	110,9 ***	32,0 ***
Composto 5 ( $\mu$ M)	31	96,6 ***	20,8 *
	125	123,5 ***	42,4 ***
	500	190,9 ***	72,3 ***
Positivo		123,8 ***	37,3 ***

[\*=  $P \leq 0.05$  \*\*=  $P \leq 0.01$  \*\*\*=  $P \leq 0.001$  ANOVA seguida do pós-teste Dunnett].

**Tabela S8** – Valores de expressão relativas de genes relacionados a danos ao DNA (a), proliferação e ciclo celular (b), estresse oxidativo (c) e morte celular por apoptose (d) no tratamento com os compostos 3 e 5 durante 24 h nas concentrações de 125 e 500  $\mu$ M.

		Composto 3 ( $\mu$ M)		Composto 5 ( $\mu$ M)	
		125	500	125	500
Danos ao DNA	<i>ATR</i>	1,42	3,28 *	-1,01	2,03
	<i>GADD45a</i>	2,65 *	168,1 *	8,92 *	230,91 *
Proliferação e ciclo celular	<i>TP53</i>	-1,1	2,19 *	-1,08	2,07
	<i>CDKN1a</i>	1,96	10,39 *	1,73 *	7,34 *
	<i>CHK1</i>	1,13	-1,54	-1,09	-2,51 *
	<i>CHK2</i>	1,2	2,24 *	1,42	1,24
Estresse oxidativo	<i>COX2</i>	2,1	5,62 *	6,33 *	1,95
Morte celular por apoptose	<i>CASP3</i>	1,19	2,95 *	-1,21	1,9 *

(\*) indica estatisticamente significativo  $p \leq 0,05$

**Tabela S9** – Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

GENE	FORWARD (5' → 3')	REVERSE (5' → 3')
<i>β-Actin</i>	ATATCGCTGCGCTGGTCGTC	AGGATGGCGTGAGGGAGAGC
<i>ATR</i>	AGGACACTCCAAAGCACCCTG	GCAGCCCTGTTACTCTATTTCCG
<i>GADD45a</i>	GAAGACCGAAAGGATGGACA	TGAGGGTGAAATGGATCTGC
<i>TP53</i>	GCTTCTCCGAAGACTGGATGACT	CATGCAGTGAGGTGATGGCAGGA
<i>CDKN1a</i>	CATTCCCTGCCTGGTTCCTT	CCTGTTCTAGGCTGTGACTGCTT
<i>CHK1</i>	AACAGGGCTTTCCTTGTGGG	GGCATTGGTAAGATTTGTCCGC
<i>CHK2</i>	CAGGAAAAGAACTCGGTGACCC	ATTGGAGCGTGGAAGGAAGC
<i>COX2</i>	CCAGTATCAGAACCGCATTG	AGGATGGAGTTGTTGTAGAG
<i>CASP3</i>	AGCAGCTTTGTGTGTGTGATTCT	CCAGTCAGACTCCGGCAG

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compostos que apresentam em sua estrutura os grupos maleimida, 1,4-dioxo-2-butenil e enxofre, já demonstraram resultados importantes na inibição de diferentes tipos de células tumorais (ROSOLEN, 2014; OLIVEIRA et al., 2014), atividade antibacteriana, antifúngica (ANDRICOPULO et al., 1998), elevação de EROs (AN et al., 2021), entre outros, demonstrando sua importância como candidatos a futuros agentes anticâncer ou contra outras enfermidades.

Neste trabalho, avaliamos cinco diferentes compostos que combinaram o grupo maleimida e 1,4-dioxo-2-butenil, contendo enxofre em sua estrutura, em células tumorais B16F10 (linhagem de melanoma de camundongos) com relação à citotoxicidade, sendo que, os mais efetivos, foram avaliados quanto à retenção de proliferação celular, danos ao DNA e membranas, interferência no perfil do ciclo celular, indução de estresse oxidativo, morte celular por apoptose, além dos níveis de expressão gênica de genes relacionados a estes aspectos.

Nossos resultados demonstraram resultados mais significativos em inibição de proliferação celular dos compostos denominados Composto 3 e Composto 5. Houve redução significativa do número de células no tratamento com ambos os dois compostos, em todas as concentrações testadas, sem alteração significativa em integridade de membranas. Evidenciou-se acentuada retenção na fase G1 e ativação de CDKN1a, possivelmente mediada por CHK2 e TP53, principalmente no Composto 3, além do aparecimento de população sub-G1, fornecendo indícios de morte celular, confirmados pela indução de apoptose inicial em ambos os compostos e concentrações testadas e, molecularmente, pela ativação de CASP3 em ambos compostos também. Observou-se aumento de EROs a partir da concentração de 125  $\mu\text{M}$  em ambos os compostos. O Composto 5 mostrou-se mais eficiente em danos genotóxicos que o Composto 3, aumentando tanto o comprimento do cometa, quanto a quantidade de DNA na cauda. Finalizou-se o estudo com a expressão gênica, obtendo-se aumento considerável de GADD45a, marcador de danos generalizados, aumento de ATR, TP53, CDKN1a, CHK2, COX2 e CASP3, em ambos os compostos, nas concentrações de 125  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ .

Estes resultados nos chamam a atenção para os efeitos interessantes obtidos na linhagem de células tumorais testadas *in vitro*. Sugere-se continuidade dos testes em outras linhagens celulares e seguimento da pesquisa para testagem *in vivo*.