UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE

Luciana Vieira Della Santa Souza

Avaliação dos efeitos de complexos de prata com ácido maleâmico em cultura de células

CAMPO GRANDE
2024

Luciana Vieira Della Santa Souza

Avaliação dos efeitos de complexos de prata com ácido maleâmico em cultura de células

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE
2024

Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste

Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Mestrado

Aos seis dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e quatro, às dezenove horas, na videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS), Debora Marchetti Chaves Thomaz (UFMS) e Henrique Rodrigues Scherer Coelho (HUMAP), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **LUCIANA VIEIRA DELLA SANTA SOUZA**, CPF 543.***.***-49, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS DE PRATA COM ÁCIDO MALEÂMICO EM CULTURA DE CÉLULAS**" e orientação de Rodrigo Juliano Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR(A)	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Interno) **Presidente da Banca Examinadora**	gov.br Documento assinado digitalmente RODRIGO JULIANO OLIVEIRA Data: 06/09/2024 21:32:59-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☑ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Henrique Rodrigues Scherer Coelho (Externo)	gov.br Documento assinado digitalmente HENRIQUE RODRIGUES SCHERER COELHO Data: 06/09/2024 22:04:37-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☑ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Debora Marchetti Chaves Thomaz (Externo)	gov.br Documento assinado digitalmente DEBORA MARCHETTI CHAVES THOMAZ Data: 06/09/2024 21:36:13-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☑ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Juliano Rodrigues de Oliveira (Externo) (Suplente)		☐ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação

RESULTADO FINAL: ☑ APROVAÇÃO ☐ APROVAÇÃO COM REVISÃO ☐ REPROVAÇÃO

OBSERVAÇÕES:_____

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCIANA VIEIRA DELLA SANTA SOUZA
Data: 05/09/2024 12:26:31-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do(a) Aluno(a)

Nada mais havendo a ser tratado, o(a) Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

À minha amada família, que é a base de tudo. Meu marido Marcelo e meus filhos, Julia e João Marcelo.

Agradecimento

A Deus que me dá oportunidades e coragem para superar todos os desafios, me fortalecendo a cada dia com seu amor fraterno.

Aos meus pais, que através do amor, me mostram os caminhos certos, sempre apoiando nas minhas decisões, nunca permitindo que eu desista.

Ao meu marido Marcelo e meus filhos Júlia e João Marcelo, que são meu alicerce e sempre me incentivaram em tudo o que eu quero fazer. Por eles eu busco o meu melhor.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira, pela orientação neste trabalho, minha sincera admiração e respeito, suas aulas me inspiram e incentivam a evoluir sempre, gratidão profunda pela atenção e compreensão para comigo durante esses anos e por sua paciência na construção dessa dissertação.

Aos amigos Marcelino Chehoud Ibrahim, Simone Zacalusni e Andrea Alarcom de Souza, que me encorajam aos estudos e acreditaram que seria possível. Com vocês, a jornada ficou mais leve! Obrigada amigos!

Aos amigos Dr. Henrique Rodrigues Scherer Coelho e Dra. Débora Marchetti Chaves Thomaz por torcerem e me ajudarem a evoluir.

A Silvia Cordeiro das Neves, que com sua paciência e carinho sempre esteve disposta em ajudar e ensinar em todo o processo do mestrado, minha eterna gratidão.

Aos servidores do Ambulatório de Dermatologia que compreenderam os momentos de ausência e sempre me apoiaram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, através dos seus professores e funcionários.

E todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram e me incentivaram.

Eu aprendi que para se crescer como
pessoa é preciso me cercar de gente
mais inteligente do que eu.

Confúcio

Resumo

No ano de 2020, foram registrados mais de 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo. Nesse mesmo período registrou-se cerca de 10 milhões de óbitos. Soma-se a isso aos altos custos de tratamento da doença e a resistência que os tumores apresentam aos medicamentos comerciais. Assim, é de primaz necessidade a descoberta e/ou o desenho/construção de novas moléculas com atividade anticâncer sejam elas como emprego quimioterápico e/ou adjuvante. Neste estudo, avaliou-se os efeitos citotóxicos de quatro complexos de prata com ácido maleâmicos em sistema *in vitro*. Utilizou-se células tumorais da linhagem B16F10 tratadas com diferentes concentrações de Composto 1 (C1): Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 2 (C2): Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4- oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 3 (C3): Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); e Composto 4 (C4): Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4- yl)amino)-4-oxobut-2-anoyl) oxy) adicionados ao complexo de prata. A avaliação da citotoxicidade foi realizado pelo teste colorimétrico de MTT. Os resultados demonstraram que o C1 é citotóxico a partir das concentrações de 3,9 µg/mL para os tempos de 24 e 48h e de 1,9 µg/mL para o tempo de 72h. Já o C2 é citotóxico a partir da concentração de 7,8, 15,6 e 3,9 µg/mL para os tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Os resultados demonstram que o C3 é citotóxico a partir das concentrações de 3,9 µg/mL para os tempos de 24 e 48h e de 7,8 µg/mL para o tempo de 72h. Já para o C4, os resultados indicam citotoxicidade de 1,9 µg/mL para o tempo de 24h e de 7,8 µg/mL para os tempos de 48 e 72h. A IC_{50} do C1, C2, C3 e C4 foram de 5,01; 9,87; 5,21 e 5,78 µg/mL, respectivamente. Esses resultados sugerem que os complexos de prata com ácido maleâmicos tem potencial terapêutico para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Melanoma. Câncer. Compostos orgânicos.

Abstract

In 2020, more than 19.3 million new cases of cancer were recorded worldwide. During the same period, around 10 million deaths were recorded. Added to this are the high costs of treating the disease and the resistance that tumors present to commercial medicines. Therefore, the discovery and/or design/construction of new molecules with anticancer activity, whether used as chemotherapy and/or adjuvant, is of utmost importance. In this study, the cytotoxic effects of four silver complexes with maleamic acid were evaluated in an in vitro system. We used tumor cells of the B16F10 lineage treated with different concentrations of Compound 1 (C1): Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut 2-enoyl) oxy); Compound 2 (C2): Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Compound 3 (C3): Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); and Compound 4 (C4): Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H pyrazol-4-yl)amino)- 4-oxobut-2-anoyl)oxy) added to the silver complex. Cytotoxicity assessment was performed using the MTT colorimetric test. The results demonstrated that C1 is cytotoxic at concentrations of 3.9 µg/mL for 24 and 48h and 1.9 µg/mL for 72h. C2 is cytotoxic at concentrations of 7.8, 15.6 and 3.9 µg/mL for 24, 48 and 72 hours, respectively. The results demonstrate that C3 is cytotoxic at concentrations of 3.9 µg/mL for 24 and 48h and 7.8 µg/mL for 72h. As for C4, the results indicate cytotoxicity of 1.9 µg/mL for 24h and 7.8 µg/mL for 48 and 72h. The IC50 of C1, C2, C3 and C4 were 5.01; 9.87; 5.21 and 5.78 µg/mL, respectively. These results suggest that silver complexes with maleamic acid have therapeutic potential for the treatment of cancer.

Keywords: Cytotoxicity; Melanoma. Cancer. Organic compounds

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 OBJETIVOS 17
2.1 Objetivo geral 17
2.2 Objetivos Específicos 17
3 MATERIAL E MÉTODOS 18
3.1 Linhagem celular, condições de cultivo celular e agentes químicos 18
3.2 Ensaio de citotoxicidade (MTT- *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) 18
3.3 Integridade de Membranas 19
3.4 Morte Celular por Apoptose 20
3.5 Análise estatística 20
4 RESULTADOS 21
5 DISCUSSÃO 31
6 REFERÊNCIAS 35

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo que abrange um grande grupo de doenças malignas que podem se originar em quase todos os órgãos ou tecido do corpo. Isso acontece quando células anormais crescem de forma incontrolável e se espalham para outros órgãos. O espalhamento ou a invasão de outros tecidos trata-se do processo de metástase. A metástase, por sua vez, é uma das principais causas de morte por câncer (WHO, 2023).

O processo de formação do câncer decorre de alterações genéticas e epigenéticas que alteram o comportamento da célula, especialmente em genes envolvidos no processo de divisão e diferenciação celular (COOPER, 2020; CHAVES *et al*., 2021). Essas alterações podem modificar a proliferação celular, que é regulada por centenas de genes, e levam as células a acumularem mutações. O acúmulo das mutações provocam desequilíbrio nos genes e/ou na sua expressão, e assim dão início ao processo de carcinogênese (COOPER, 2020).

As células tumorais têm uma série de caraterísticas que as divergem das células não-tumorais como autonomia nos sinais de crescimento; resistência a sinais inibitórios de crescimento; resistência a morte celular; possibilidade de imortalidade replicativa e a capacidade de indução da angiogênese. Esse crescimento é observado tanto em células tumorais benignas como malignas. No entanto, apenas as células tumorais malignas têm capacidade de invadir outros órgãos e tecidos, levando à metástase (YOKOTA, 2000). Alguns dos fatores que podem predispor ainda mais o organismo à carcinogênese são a hereditariedade, hábitos de vida, exposição à radiação e exposição a substâncias cancerígenas (CHAVES *et al*., 2021).

A incidência do câncer aumenta regularmente no mundo todo, principalmente em países em desenvolvimento. Isso se deve, principalmente, ao envelhecimento populacional. Os tipos de cânceres e as taxas de mortalidade se alteram de acordo com a região em razão das características populacionais, das diferenças socioeconômicas e do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do país (SUNG *et al*., 2021).

O câncer foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018, sendo considerada a segunda principal causa de morte no mundo (WHO, 2023).

A prevalência de câncer em todo mundo exerce uma enorme pressão física, emocional e financeira sobre os indivíduos, famílias, comunidades e sistemas de saúde. Em muitos países é um grave problema de saúde pública, dificultando o acesso a diagnósticos e tratamentos oportunos e de qualidade (PETRYSZYN *et al*., 2020; WHO, 2023).

Para o Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, 483 mil se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Este é estimado como o mais incidente, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelos cânceres de mama, com 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, com 21 mil (3,1%) casos novos. Estima-se que os tipos de câncer mais frequentes em homens serão pele não melanoma, com 102 mil (29,9%) casos novos; próstata, com 72 mil (21,0%); cólon e reto, com 22 mil (6,4%); pulmão, com 18 mil (5,3%); estômago, com 13 mil (3,9%); e cavidade oral, com 11 mil (3,2%). Nas mulheres, os cânceres de pele não melanoma, com 118 mil (32,7%); mama, com 74 mil (20,3%); cólon e reto, com 24 mil (6,5%); colo do útero, com 17 mil (4,7%); pulmão, com 15 mil (4,0%); e tireoide, com 14 mil (3,9%) casos novos figurarão entre os principais (INCA,2023).

O melanoma é um câncer de pele causado por uma malignidade dos melanócitos. A incidência do melanoma está aumentando rapidamente em todo o mundo, o que resulta em problemas de saúde pública. Os melanomas extra cutâneos primários podem ser oculares, gastrointestinais, mucosos, leptomeníngeos, geniturinários e linfáticos. A relação entre a exposição à luz ultravioleta (UV) e o desenvolvimento do melanoma é intensamente aguda e complexa, e a exposição intermitente ao sol aumenta muito o risco de melanoma. É o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o sexto mais comum em mulheres. O diagnóstico do melanoma é feito por meio da avaliação clínica do pigmentado por profissionais de saúde.

Características arquitetônicas do melanoma maligno, incluindo assimetria, confluência de crescimento, celularidade acentuada e má circunscrição. A característica citológica do melanoma maligno inclui uma membrana nuclear irregular e espessa e nucléolos proeminentes. As medidas preventivas incluem a redução da exposição à luz UV e ao sol. A detecção precoce do câncer de pele reduz muito a morbidade e a mortalidade a curto e longo prazo. O tratamento e o acompanhamento com o médico para pacientes com melanoma podem diferir devido ao estágio do tumor

e da lesão primária. A terapia típica para melanoma maligno é a excisão cirúrgica, imunoterapia como interleucina 2 (IL-2), terapia genética e bioquimioterapia (Bilal Ahmed, 2020). É crucial identificar o melanoma em seus estágios iniciais, in situ, pois ele é "curável" neste estágio. No entanto, após a metástase, é difícil de tratar e a sobrevida em cinco anos é de apenas 25%. Nos últimos anos, uma melhor compreensão da etiologia do melanoma e sua progressão tornou possível o desenvolvimento de terapêuticas direcionadas, como vemurafenibe e imunoterapias, para tratar melanomas avançados. Agentes imunoterapêuticos como ipilimumabe, nivolumabe, pembrolizumabe e atezolizumabe, são terapias adotadas com as células T no tratamento do melanoma avançado. (Kevin Eddy -2020).

A cisplatina é um dos quimioterápicos mais utilizados para o tratamento de diversos cânceres, dentre eles o melanoma. Esse composto age por meio de interação com o DNA sendo capaz de inibir a replicação ao mesmo tempo que desencadeia a morte celular (FONSECA *et al.*, 2016; TAKIMOTO *et al*., 2016) mas, tem muitos efeitos colaterais. Portanto, a busca por substâncias naturais que possam reduzir a dose da cisplatina e a toxicidade relacionada a ela é muito desejada.

Luczka e colaboradores estudaram os efeitos anticâncer e antiproliferativo de compostos contendo cisplatina e cumarínicos avaliando seus efeitos terapêuticos e menores efeitos colaterais (LUCZKA *et al*.,2021).

Na última década, as nanopartículas inorgânicas atraíram o interesse de vários grupos de pesquisa devido a suas aplicações na terapia do câncer, como nanocarreadores de fármacos ou agentes terapêuticos. As nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido amplamente estudadas devido suas propriedades físico-químicas para combater o câncer e avaliar seus efeitos adversos. O emprego da polivinilpirrolidona (PVP), como agente de revestimento de AgNPs, produz uma importante diminuição nos efeitos citotóxicos e genotóxicos em comparação com o AgNPs não revestidos. O composto PVP- AgNPs forneceu várias vantagens por meio da seletividade de sua ação antiproliferativa. Salas e colaboradores mostraram melhores efeitos terapêuticos e menores efeitos adversos do composto PVP-AgNPs comparados com a Cisplatina (SALAS *et al.,*2019).

Considerando o número elevado de novos casos de câncer e de altos custos no tratamento dessa doença é importante a realização de estudos para o desenvolvimento e/ou prospecção de novas estruturas moleculares que poderão ser utilizadas no tratamento do câncer ou em terapia adjuvante deste grande problema

de saúde pública (OLIVEIRA *et al*., 2018a).

Um possível ponto de partida para a síntese de moléculas antitumorais eficientes e seletivas são as maleimidas, as anilinas, os radicais farmacofóricos 4-aminoantipirina e 1,4-dioxo-2-butenil e a prata.

As ímidas cíclicas são uma classe de compostos orgânicos que estão descritas como sedativos, hipnóticos, anticonvulsivantes, hipotensiva, diuréticas, bactericidas, fungicidas, inseticidas e anticâncer (ANDRICOPULO et al., 1998; ROSOLEN, 2014). Esses compostos, análogos ao alcalóide natural filantimida isolado da planta *Phyllanthus sellowianus*, possui em sua molécula um grupo - CO-N(R)-CO- sendo o R um átomo de hidrogênio, um grupo alquila ou um grupo arila (TEMPESTA et al., 1988). Esses compostos foram classificados como succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas e maleimidas (CECHINEL FILHO et al., 2003).

As maleimidas são consideradas um potente agente citotóxico, pois apresentam diversas atividades biológicas como a quimioterápica (PESSIN; TAVARES; GRADELLA, 2018). Moléculas derivadas da maleimida com complexos ligantes carboxilados estão descritos na literatura como capazes de inibir a tiorredoxina redutase. Essa enzima é importante para que ocorra o crescimento de células tumorais. Assim, compostos que a inibem tornam-se relevantes para o desenvolvimento de atividade anticâncer em especial devido a sua capacidade de causar citotoxicidade. Essa ação já foi registrada para células MCF-7 (câncer de mama) e HT29 (câncer de intestino), além de células Nalm-6 (leucemia) que são resistentes à vincristina e daunorrubicina (OLIVEIRA et al., 2014). Derivados da maleimida também foram capazes de causar citotoxicidade em células SK-Mel-28 e SK-Mel-103 (melanoma humano) (ALI et al., 2017). Ainda de acordo com Winfield et al. (2018) compostos derivados do indol contendo a maleimida foram capazes de inibir o crescimento de células SNB-75 (glioblastoma – tumor cerebral humano), A498 (câncer renal humano), UO-31 (câncer renal humano), MDA MB435 (melanoma humano).

A 4-aminoantipirina é um composto derivado do metabolismo da dipirona no fígado. A dipirona é metabolizada por isoenzimas da via do citocromo P450. Tal metabólito está descrito com diversas atividades biológicas como analgésica, antipirética e anti-inflamatória (BURDULENE et al., 1999; TURAN-ZITOUNI et al., 2001; PIERRE et al., 2007; VINAGRE E COLLARES, 2007; CHEN E CHEN, 2009; TENG E LIU, 2013; DOS SANTOS et al., 2014; MAIONE et al., 2015; PREMNATH et

al., 2016). A 4-aminoantipirina pertence ao grupo das antipirinas e das imidas cíclicas. Esse composto é inibidor da ciclooxigenase e de suas isoenzimas. Além disso, interferem na síntese de tromboxano nas plaquetas bem como na síntese de prostaglandinas (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; GHORAB, EL-GAZZAR E ALSAID, 2014).

O radical farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil (Bis copper complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2- enoyl) oxy)) está descrito como citotóxico com capacidade de reduzir a proliferação celular e desregular o ciclo celular de células 4T1 (câncer de mama murino) (OLIVEIRA et al., 2018a). Esses autores relataram que além da citotoxicidade, registrou-se efeito genotoxicidade além de induzir parada de 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

Anteriormente, Jha et al. (2010) já havia descrito que um composto contendo maleimida e o radical 1,4-dioxo-2-butenil, semelhante ao composto testado por Oliveira et al. (2018a), apresentou efeito citotóxico em células Molt4/C8 (leucemia), CEM/0 (linfócito T de linfoma) e L1210 (leucemia linfocítica de ratos). Ainda de acordo com o estudo de Oliveira et al. (2018a) o composto contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil, apresentou genotoxicidade sendo evidente os danos genômicos (avaliados pelo teste do cometa) sem a ocorrência de danos cromossômicos (avaliados pelo ensaio de micronúcleos) em camundongos. Portanto, segundo esses autores, ao se avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* é possível sugerir o efeito anticâncer para o composto e ainda recomendar pesquisas no sentido de desenvolver um medicamento baseado nessa prospecção.

Além disso, foi descrito por Oliveira et al. (2018b) que um outro composto contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil e a 4-aminoantipirina ((Z)-4-((1,5-dimethyl 3-oxo-2-phenyl-2,3dihydro-1H-pyrazol-4-yl)) apresentou atividade quimioprotetora contra agentes quimioperáticos comerciais o que desaconselha o seu uso como agente adjuvante. No entanto, o composto isolado foi capaz de induzir dano genômico sem causar dano cromossômico, aumentar a fagocitose esplênica e a frequência de linfócitos. Além disso, induz a morte celular tanto no fígado quanto nos rins. Esses resultados sugerem que o composto isolado tem efeito quimioterápico com baixa indução de danos no DNA, o que sugere seletividade da molécula.

Outro estudo com um éster contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil e a 4-aminoantipirina ((Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoate) demonstrou que o composto isolado não é genotóxico e não aumentou a fagocitose esplênica. No entanto, pode induzir a morte celular no fígado e nos rins. Quando administrado em combinação com agentes quimioterápicos comerciais apresentou atividade antigenotóxica,diminuiu a fagocitose esplênica e reduziu a frequência de morte celular no fígado e nos rins. Danos contra indicam o seu uso como um adjuvante quimioterápico e sugerem efeito quimioterápico seletivo se utilizado isoladamente (OLIVEIRA *et al*. 2019).

A literatura ainda registra um outro estudo com um composto inédito contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil e a 4-aminoantipirina (2-(1,5-Dimethyl-3- oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7 methanoisoindole-1,3(2H)-dione) (OLIVEIRA et al., 2023). Esse composto isolado aumentou a frequência de danos genômicos e cromossômicos, de fagocitose esplênica e de morte celular no fígado e nos rins. Em associação com agentes quimioterápicos, apresentou efeito quimiopreventivo e, portanto, reduziu a frequência de danos ao DNA, morte celular (no fígado e nos rins) e fagocitose esplênica. Ainda em associação com os quimioterápicos comerciais aumentou a frequência de linfócitos em comparação com apenas agentes quimioterápicos. O acoplamento molecular demonstrou que o ZIM tem alta afinidade pelo DNA do que seus precursores incluindo o 4-AA e os compostos descritos por Oliveira *et al* (2018b) e Oliveira et al. (2019). Assim, demonstrou-se que o ZIM pode quebrar o DNA e, portanto, o seu efeito antitumoral é mediado por danos no DNA.

O íon prata está descrito na literatura como um efetivo agente antimicrobiano e citotóxico. Sabe-se que íon prata pode induzir morte celular por ser capaz de interagir com diferentes componentes celulares e interagir com grupos sulfidrilas substituindo átomos de hidrogênio, impedindo a transferência de elétrons, e determinando o bloqueio na cadeia respiratória o que determina a morte celular e/ou do microorganismo. Além disso, os íons de prata se ligam a ácidos nucléicos impedindo, por exemplo, a replicação do DNA. Os íons ainda se ligam fortemente a aminoácidos, peptídeos e proteínas formando complexos, principalmente, com grupos tiol e fosfato, o que altera a estrutura da proteína e por consequência a sua função incluindo as funções enzimáticas (MIJNENDONCKX et al., 2013; MÉDICI et al., 2016; MÉDICI et al., 2019).

Com base nesses medicamentos é cada vez mais comum encontrar grupos de pesquisa que buscam o desenvolvimento de novas moléculas com efeito anticâncer contendo a prata. Os pesquisadores buscam ainda medicamentos com menores efeitos colaterais (SHAHSAVANI et al., 2016; SHARMA; AMETA; SINGH, 2016; ANASAMY et al., 2016; WANG et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de complexos de prata com ácido maleâmico em culturas de células.

2.2 Objetivos Específicos

Triar compostos por viabilidade celular pelo ensaio de citotoxicidade – MTT.

Avaliar danos em membrana por citometria de fluxo induzidos pelo composto selecionado.

Avaliar morte celular por apoptose utilizando citometria de fluxo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular, condições de cultivo celular e agentes químicos

As células da linhagem de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em frasco de cultura de 25cm^2, em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®) e 0,1% de antibiótico (Solução Antibiótica/Antimicótica (100x) Estabilizado; Sigma®), em incubadora de CO_2 (5%) com ambiente umidificado e a 37ºC.

Como controle positivo utilizou-se a Dacarbazina (Europharma®; Lote: 377942A) na concentração de 1.400µg/mL (Baharara et al., 2016) solubilizada em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). As substâncias Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2- enoyl) oxy); Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) - 4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5- dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoyl)oxy) foram testadas em concentrações que variaram de 1,19 a 1.000 µg/mL, solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO 1%) (Synth®) e, posteriormente, em meio de cultura. Como controle negativo utilizou-se DMSO 1%.

3.2 Ensaio de citotoxicidade (MTT- *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*)

A avaliação da citotoxicidade das substâncias Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo 2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoyl) oxy) foi determinada pelo teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide). De acordo com Rodrigues et al. (2023), com modificações, foram semeadas 5 x 10^3 células B16F10 por poço em placas de 96 poços. As culturas foram mantidas por 24h, em incubadora com 5% de CO2 e à temperatura de 37ºC, para estabilização. Os

tratamentos foram realizados por 24, 48 e 72 horas (Navarro et al., 2018; Oliveira et al., 2018) com as concentrações de 1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500 e 1.000 µg de complexos 1 a 4 de prata com ácido maleâmico. O controle negativo e o controle positivo foram cultivados da mesma forma e em substituição às substâncias testadas foram utilizados DMSO 1% e Dacarbazina (1.400µg/mL), respectivamente. Ao final dos tratamentos, o meio de cultura foi descartado e as placas foram incubadas com 100µL de MTT, na concentração de 0,3 mg/mL, por 4h. Após essa incubação a solução de MTT foi descartada e adicionou-se 100µL DMSO. Procedeu-se à homogeneização das placas e fez-se a leitura da absorbância em espectrofotómetro em filtro de 540nm. Para cada experimento foram realizadas três repetições independentes em quintuplicatas. A viabilidade celular (expressa em porcentagem) foi calculada pela fórmula: viabilidade celular = [(Absorbância média do grupo de tratamento)/(Absorbância média do grupo sem tratamento) x 100].

3.3 Integridade de Membranas

A verificação de integridade de membranas de células foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. As células B16F10 (2.10^5/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos nas concentrações do IC_{50} 5,01; 9,87; 5,21; 5,78 µg/mL das substâncias Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) - 4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4- methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol -4- yl) amino) -4-oxobut-2-anoyl) oxy) respectivamente e como controle positivo foi utilizado 50 µL/mL de Cisplatina. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e ressuspendidas em 300 µL de PBS. Para avaliação da integridade de membrana, 25 µL de Iodeto de Propídio (2 µg/mL) foi adicionado em 100 µL da suspensão, após 5 minutos foi realizada a leitura da população celular (população celular determinada por SSC e FSC devidamente separadas de restos celulares ou células duplicadas). Ao mesmo tempo, foi determinada sua concentração em células/µL e, posteriormente, células por poço.

3.4 Morte Celular por Apoptose

A morte celular por apoptose foi avaliada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. As células B16F10 (2.10^5/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos nas concentrações do IC_{50} 5,01; 9,87; 5,21; 5,78 µg/mL das substâncias Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2- enoyl) oxy); Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) - 4-oxobut-2-enoyl) oxy); Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5- dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoyl) oxy) respectivamente e como controle positivo foi utilizado 50 µL/mL de Cisplatina.. Após 24 h de tratamento, as células foram centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e ressuspendidas em 100 µL de PBS. Foi utilizado o kit BD Pharmingen™ – FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (CAT-556547) segundo o protocolo do fabricante, onde foram avaliados 10000 eventos por tratamento. Foram estimadas as porcentagens de células viáveis em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose. As células com ausência de marcação por FITC e Iodeto Propídio foram consideradas viáveis. Marcadas somente com a anexina foram consideradas em apoptose inicial e células com dupla marcação ou apenas marcadas com Iodeto de Propídio foram consideradas em apoptose tardia/necrose. Esse experimento foi realizado em triplicata.

3.5 Análise estatística

Os valores mensurados foram comparados por ANOVA/Tukey ($p<0,05$). Os resultados foram expressos como Média ± EPM. A concentração citotóxica necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC_{50}) foi calculada no software GraphPad Prism.

4 RESULTADOS

Os resultados apresentados indicam que os compostos C1, C2, C3 e C4 possuem diferentes níveis de citotoxicidade em relação ao tempo de exposição e à concentração necessária para induzir efeitos citotóxicos. Vamos analisar cada um dos aspectos destacados:

O composto C1 foi citotóxico ($p<0,05$) nas concentrações de 3,9 a 1.000 µg/mL para os tempos de 24, 48 e 72h de exposição. A dose de 1,9 µg/mL só foi citotóxica no tempo de 72h a citotoxicidade ($p<0,05$) (Figura 1).

Na comparação entre os tempos, observou-se que a citotoxicidade aumentou ($p<0,05$) em 48h se comparado com 24h para as concentrações de 7,8 a 62,5 e 1.000 µg/mL, Na comparação de 24h e 72h, a citotoxicidade aumentou ($p<0,05$) para a concentração de 1,9 e 15,5 a 1.000 µg/mL. Na comparação de 48 e 72h observou-se aumento ($p<0,05$) de citotoxicidade para as concentrações de 15,6 a 1.000 µg/mL (Figura 1). A IC_{50} para (C1), em 24h, foi de 5,01 µg/mL (Figura 2).

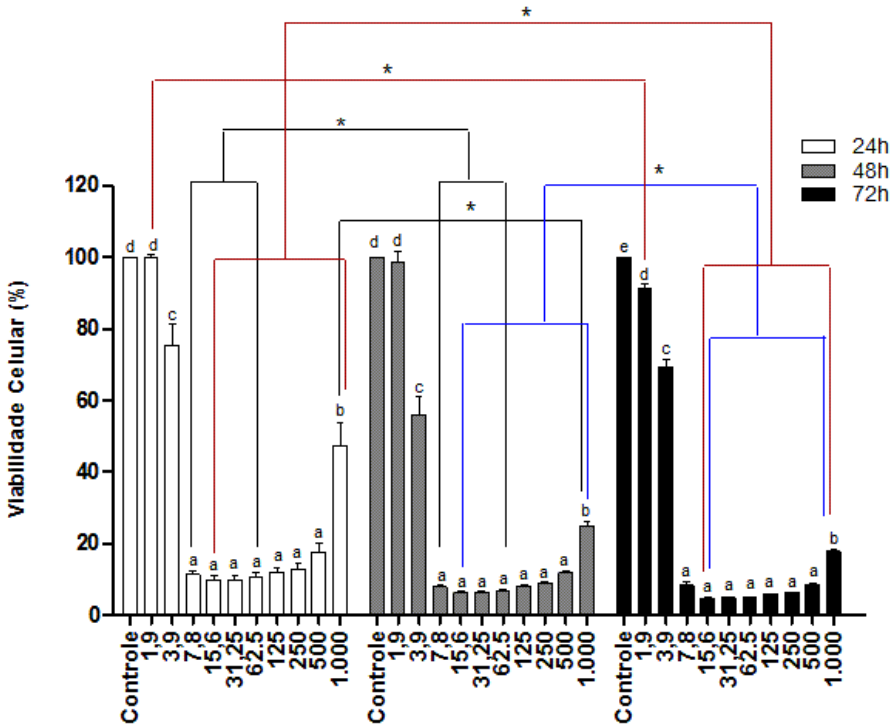

Figura 1. Viabilidade celular em células B16F10 tratadas com Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 -((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy) (C1). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações. (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p<0,05$). *Indica diferença estatisticamente significativa para uma mesma concentração nos diferentes tempos de análise (24, 48 e 72h) (Teste Estatístico: *t*-Student; $p<0,05$).

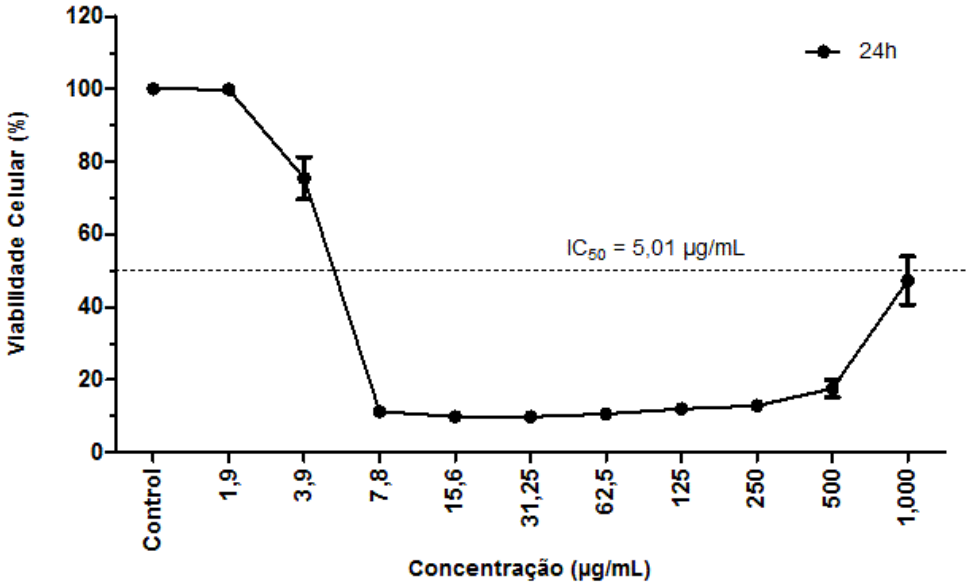

Figura 2. Concentração do Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4- oxobut-2-enoyl) oxy) (C1) que causa a morte ou a inibição do crescimento de 50% (IC_{50}) das células B16F10 expostas por 24h.

Na avaliação da integridade de membranas não foi observada diferença significativa da integridade de membranas da concentração testada de C1 (P<0,05) e do controle positivo (cisplatina) (P<0,05) em relação ao controle negativo (Figura 3).

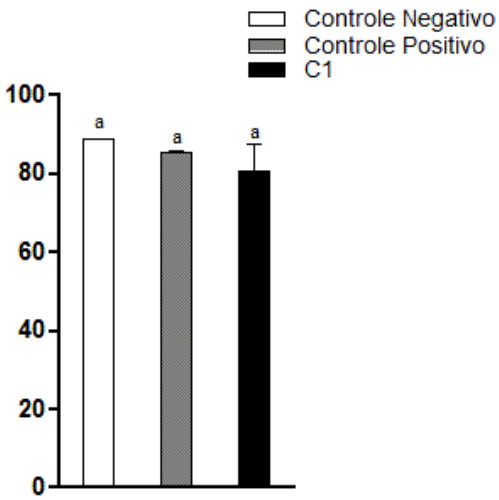

Figura 3. Integridade de Membranas de células B16F10 tratadas com Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy) (C1) após 24h. CN: controle negativo. CP: Cisplatina 50 µL/mL.

Na viabilidade celular houve uma diminuição significativa do grupo tratado com C1 em relação ao grupo controle (P<0,05). Além disso, foi possível observar um aumento de apoptose inicial na concentração testada com o C1 em relação ao grupo controle (P<0,05) (Figura 4).

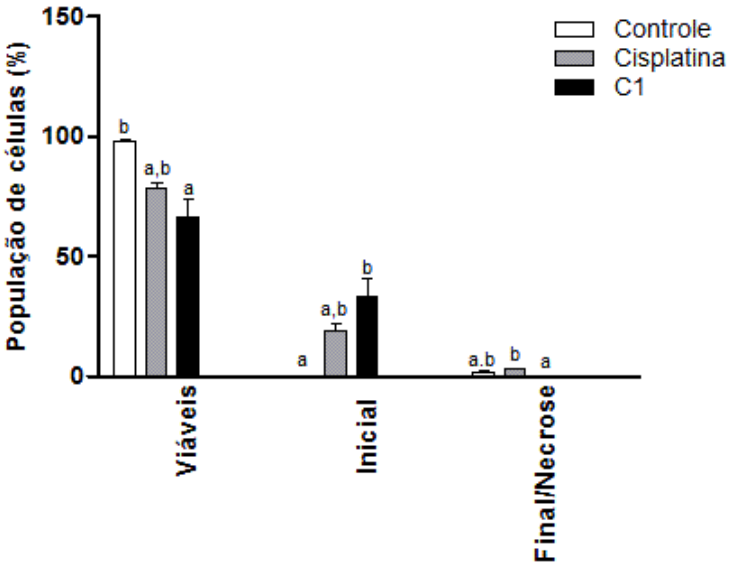

Figura 4. Perfil de morte celular por Apoptose após 24h de tratamento com Composto 1: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy) (C1); Cisplatina 50 µL/mL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; p<0,05).

O composto C2 foi citotóxico (p<0,05) a partir da concentração de 7,8 µg/mL para o tempo de 24h; de 15,6 µg/mL para o tempo de 48h e de 3,9 µg/mL para o tempo de 72h (Figura 5).

Na comparação entre os tempos, observou-se que a citotoxicidade aumentou (p<0,05) em 48h se comparado com 24h para as concentrações de 16,5 e 31,5 µg/mL. Além disso, houve redução da citotoxicidade para a concentração de 7,8 µg/mL. Na comparação de 24h e 72h, a citotoxicidade aumentou (p<0,05) para a concentração de 15,6 a 1.000 µg/mL. Na comparação de 48 e 72h observou-se aumento (p<0,05) de citotoxicidade para as concentrações de 31,5 a 1.000 µg/mL (Figura 5). A IC_{50} para (C2), em 24h, foi de (Figura 6).

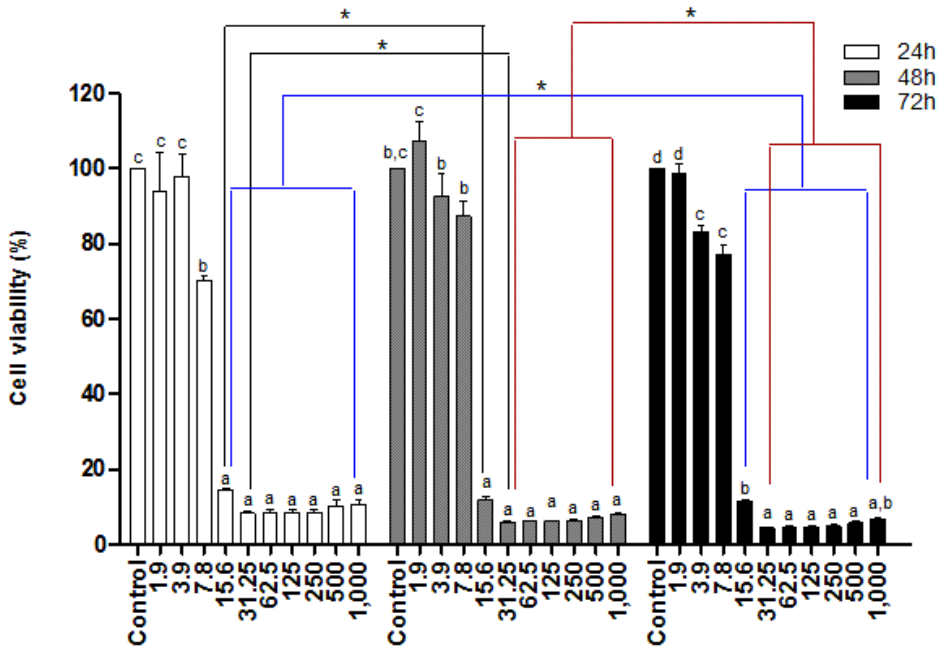

Figura 5. Viabilidade celular em células B16F10 tratadas com Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy);. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações. (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; p<0,05). *Indica diferença estatisticamente significativa para uma mesma concentração nos diferentes tempos de análise (24, 48 e 72h) (Teste Estatístico: *t*-Student; p<0,05).

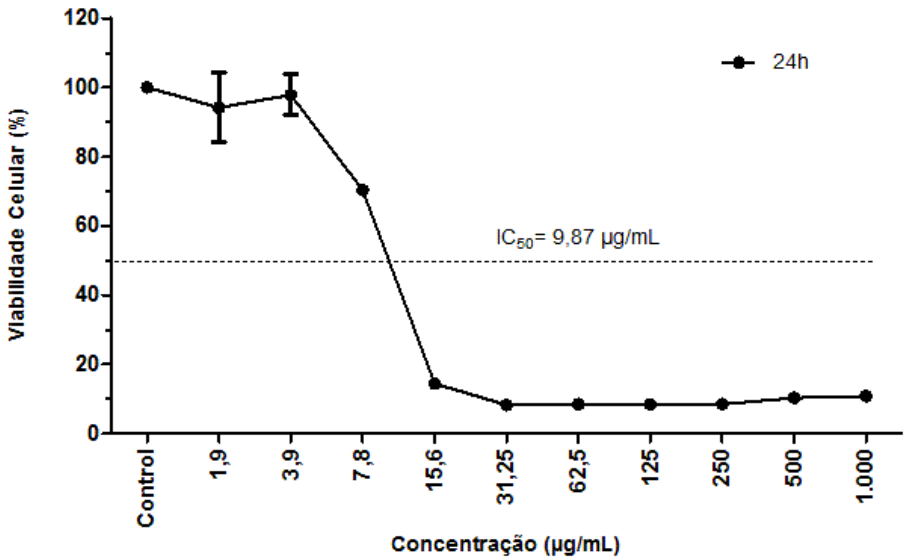

Figura 6. Concentração do Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) - 4-oxobut-2-enoyl) oxy) que causa a morte ou a inibição do crescimento de 50% (IC_{50}) das células B16F10 expostas por 24h.

Na avaliação da integridade de membranas não foi observada diferença significativa da integridade de membranas da concentração testada de C2 (P<0,05) e do controle positivo (cisplatina) (P<0,05) em relação ao controle negativo (Figura 7).

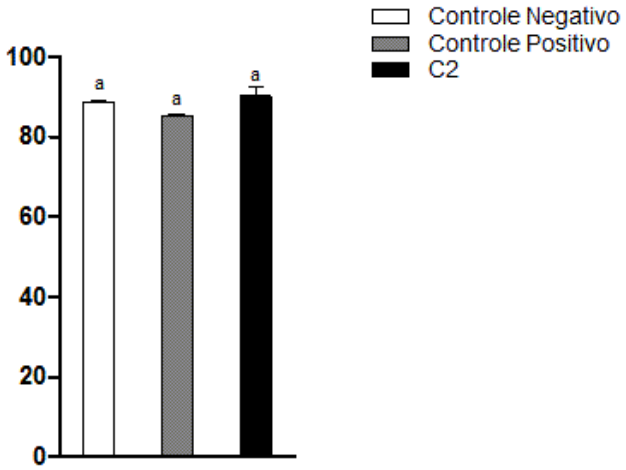

Figura 7. Integridade de Membranas de células B16F10 tratadas com Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy) após 24h. CN: controle negativo. CP: Cisplatina 50 µL/mL.

Na viabilidade celular houve uma diminuição significativa do grupo tratado com C2 em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Além disso, foi possível observar um aumento de apoptose inicial na concentração testada com o C2 em relação ao grupo controle ($p<0,05$) (Figura 8). O controle positivo (Cisplatina) também reduziu a viabilidade celular significativamente e um aumento na apoptose inicial em relação ao grupo controle ($p <0,05$) (Figura 8).

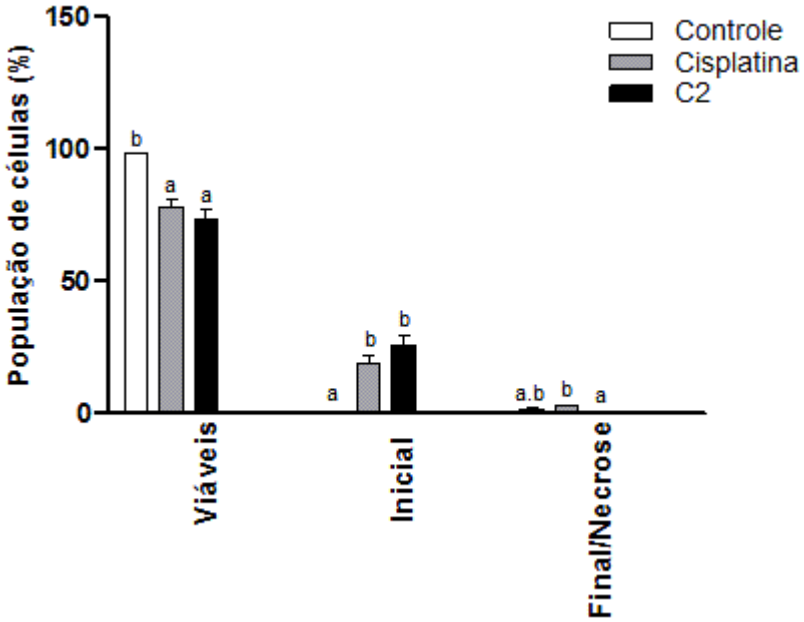

Figura 8. Perfil de morte celular por Apoptose após 24h de tratamento com Composto 2: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-methoxyphenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Cisplatina 50 µL/mL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p<0,05$).

O composto 3 foi citotóxico (p<0,05) a partir da concentração de 3,9 µg/mL para os tempos de 24 e 48h e a partir de 7,8 µg/mL para o tempo de 72h (Figura 9).

Na comparação entre os tempos, observou-se que a citotoxicidade aumentou (p<0,05) em 48h se comparado com 24h para a concentração de 62,5. Na comparação de 24h e 72h, a citotoxicidade aumentou (p<0,05) para a concentração de 15,6 a 62,5 e de 250 a 1.000 µg/mL. Na comparação de 48 e 72h não foram observadas variações na viabilidade celular (Figura 9). A IC_{50} para composto 3, em 24h, foi de 5,21 µg/mL (Figura 10).

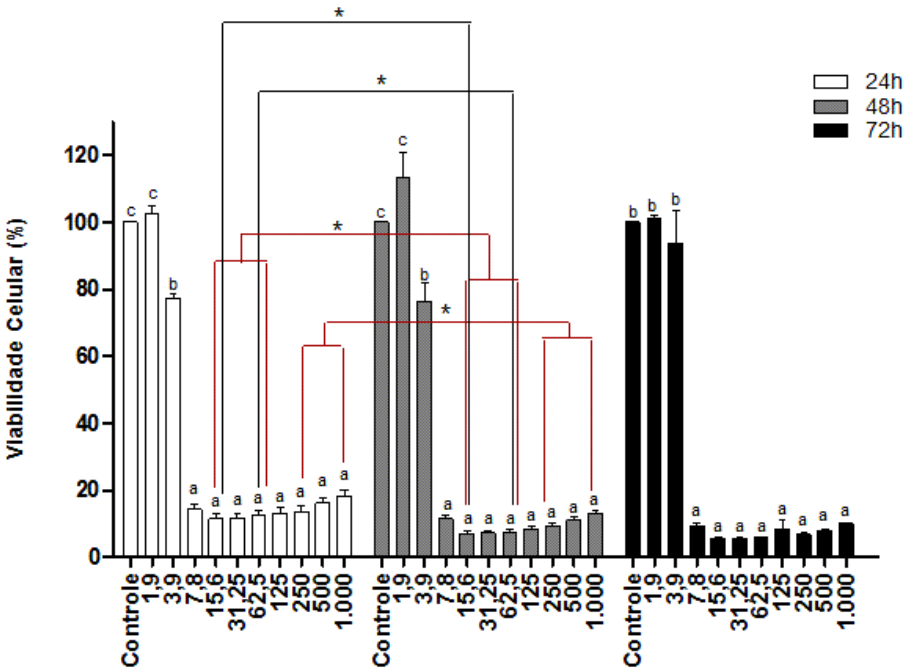

Figura 9. Viabilidade celular em células B16F10 tratadas com Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 -((4-bromophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações. (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; p<0,05). *Indica diferença estatisticamente significativa para uma mesma concentração nos diferentes tempos de análise (24, 48 e 72h) (Teste Estatístico: *t*-Student; p<0,05).

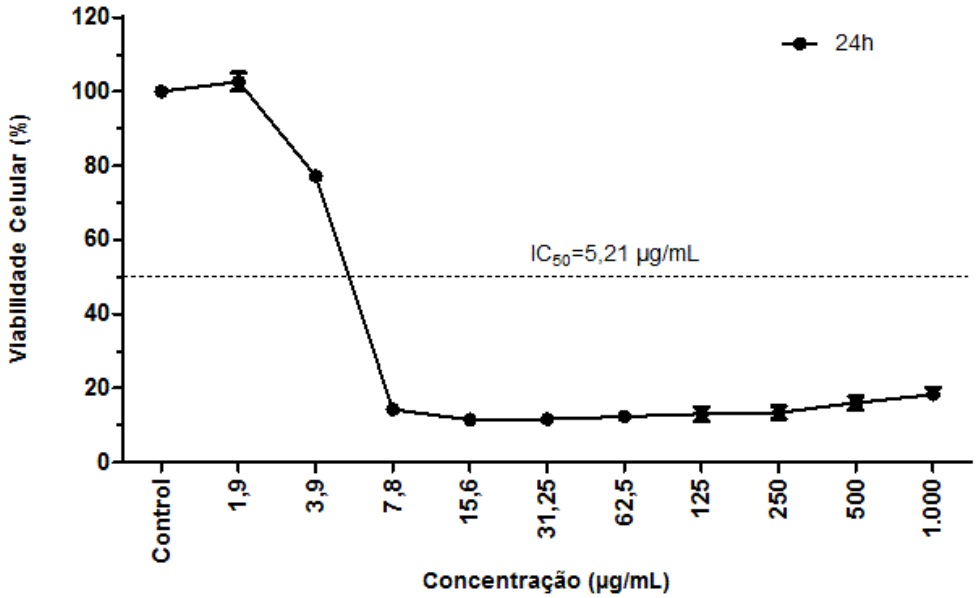

Figura 10. Concentração do Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) - 4-oxobut-2-enoyl) oxy) que causa a morte ou a inibição do crescimento de 50% (IC_{50}) das células B16F10 expostas por 24h.

Na avaliação da integridade de membranas foi observado um aumento significativo da integridade de membranas na concentração testada do composto C3 (P<0,01) em relação ao controle negativo (Figura 11).

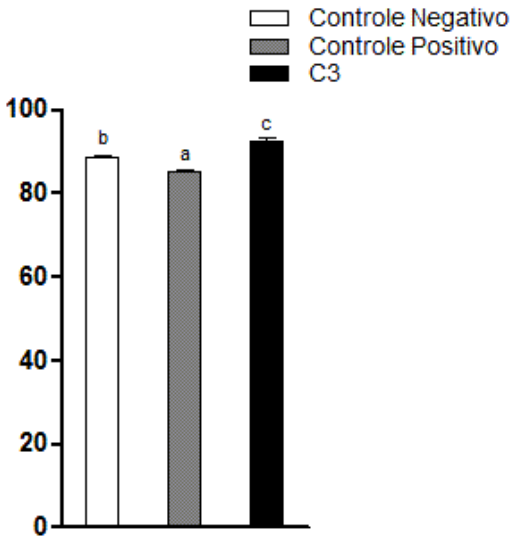

Figura 11. Integridade de Membranas de células B16F10 tratadas com Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy) após 24h. CN: controle negativo. CP: Cisplatina 50 µL/mL.

Na viabilidade celular houve uma diminuição significativa do grupo tratado com C3 em relação ao grupo controle (p<0,05). Além disso, foi possível observar um

aumento de apoptose inicial na concentração testada com o C3 em relação ao grupo controle (p<0,05) (Figura 12). O controle positivo (Cisplatina) também reduziu a viabilidade celular significativamente e um aumento na apoptose inicial em relação ao grupo controle (p <0,05) (Figura 12).

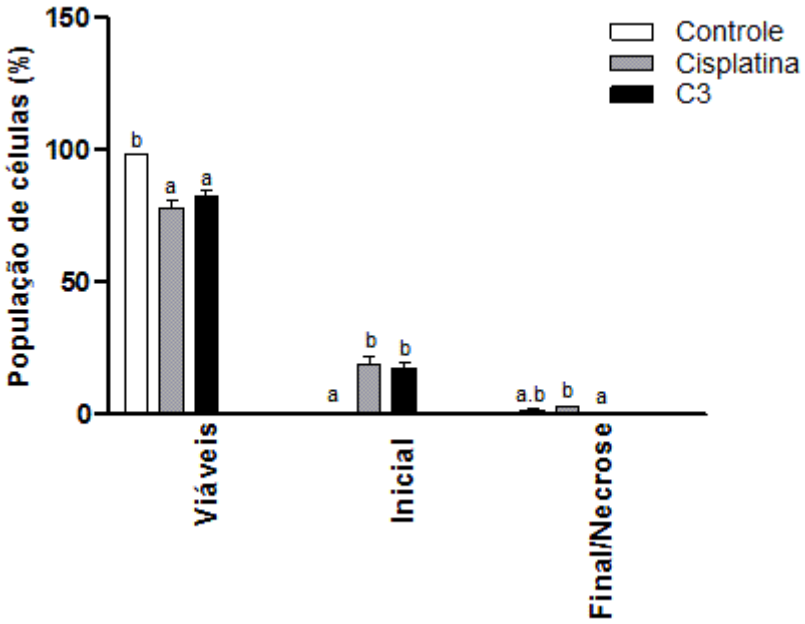

Figura 12. Perfil de morte celular por Apoptose após 24h de tratamento com Composto 3: Bis silver complex ((Z) -4 - ((4-bromophenyl) amino) -4-oxobut-2-enoyl) oxy); Cisplatina 50 µL/mL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; p<0,05).

O composto 4 foi citotóxico (p<0,05) a partir de 1,9 µg/mL no tempo de 24h e a partir de 7,8 µg/mL para os tempos de 48 e 72h. No tempo de 48h a dose de 1,9 µg/mL aumentou (p<0,05) da proliferação celular (Figura 13).

Na comparação entre os tempos, observou-se que a citotoxicidade reduziu (p<0,05) em 48h se comparado com 24h para as concentrações de 1,9 e 3,9 µg/mL. Na comparação de 24h e 72h, a citotoxicidade aumentou (p<0,05) para a concentração de 7,8 a 1.000 µg/mL e reduziu (p<0,05) somente para a concentração de 3,9 µg/mL. Na comparação de 48 e 72h observou-se aumento (p<0,05) de citotoxicidade para todas as concentrações (Figura 13). A IC_{50} para composto 4, em 24h, foi de 5,78 µg/mL (Figura 14).

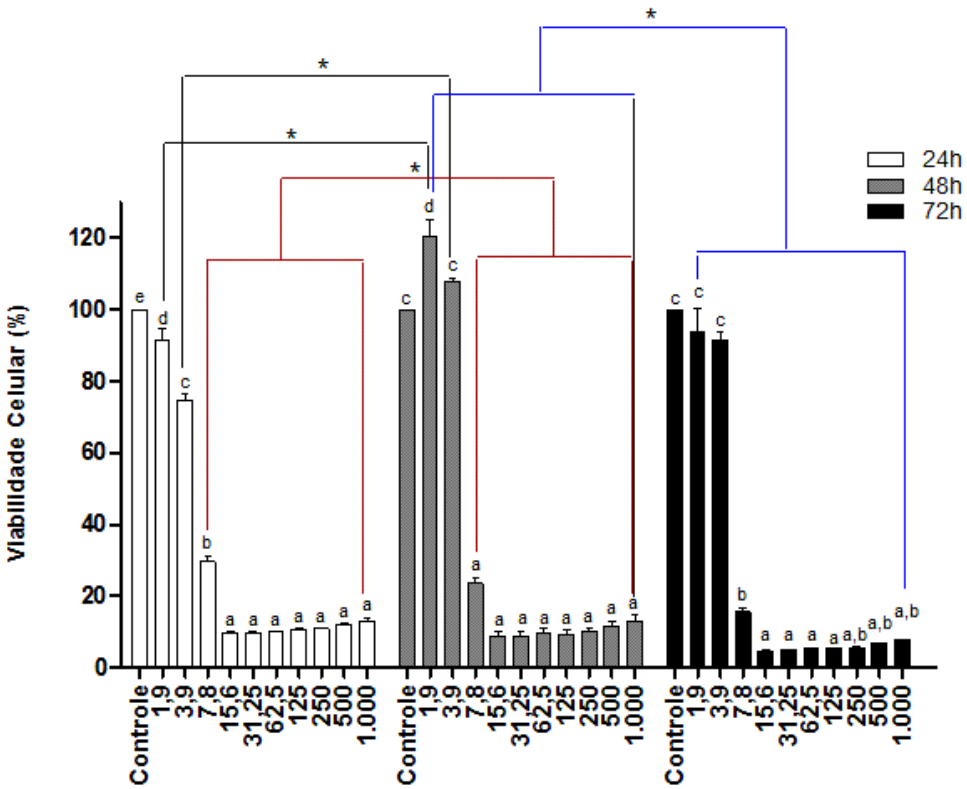

Figura 13. Viabilidade celular em células B16F10 tratadas com Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2- anoyl) oxy). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações. (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; p<0,05). *Indica diferença estatisticamente significativa para uma mesma concentração nos diferentes tempos de análise (24, 48 e 72h) (Teste Estatístico: *t*-Student; p<0,05).

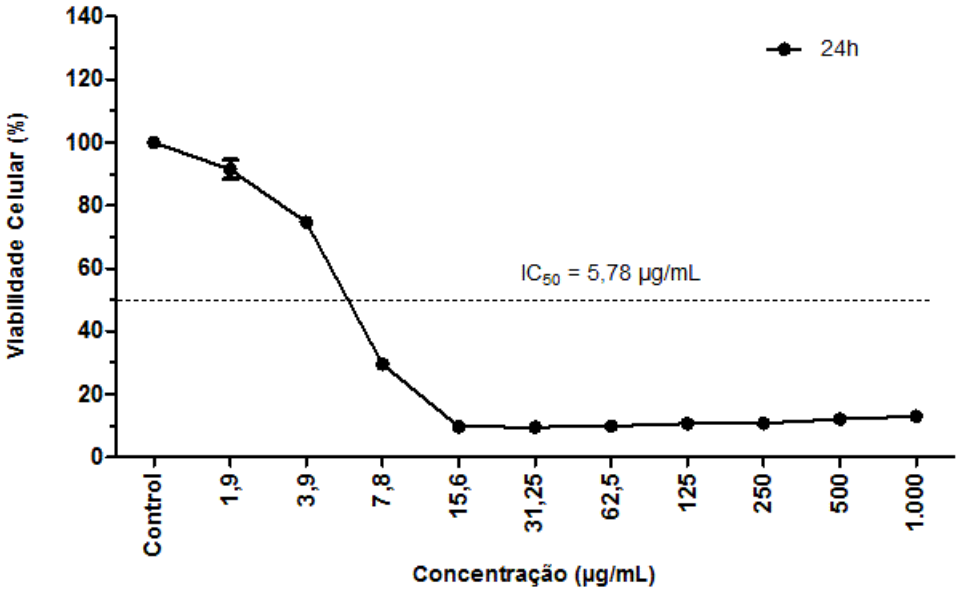

Figura 14. Concentração do Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo 2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoyl) oxy) que causa a morte ou a inibição do crescimento de 50% (IC_{50}) das células B16F10 expostas por 24h.

Na avaliação da integridade de membranas não foi observado uma diferença

significativa da integridade de membranas na concentração testada do composto C4 (P<0,01) em relação ao controle negativo (Figura 15).

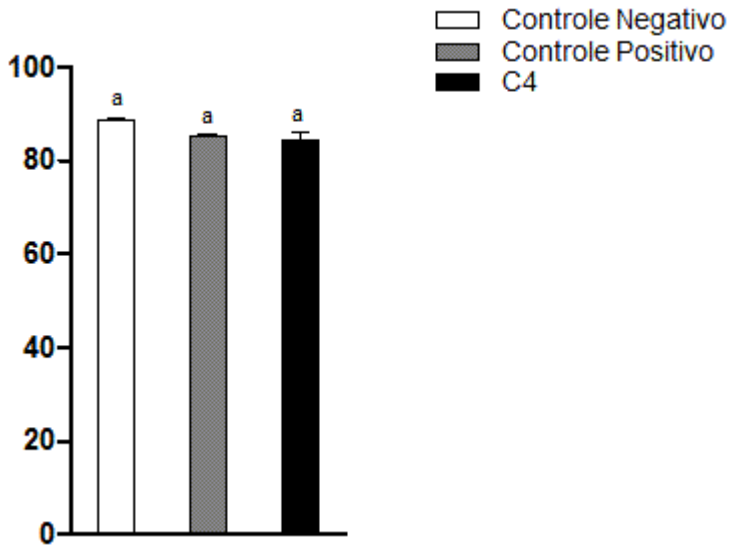

Figura 15. Integridade de Membranas de células B16F10 tratadas com Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4- oxobut-2-anoyl) oxy) após 24h. CN: controle negativo. CP: Cisplatina 50 µL/mL.

Na viabilidade celular houve uma diminuição significativa do grupo tratado com C4 em relação ao grupo controle (P<0,05). Além disso, foi possível observar um aumento de apoptose inicial na concentração testada com o C4 em relação ao grupo controle (P<0,05) (Figura 16).

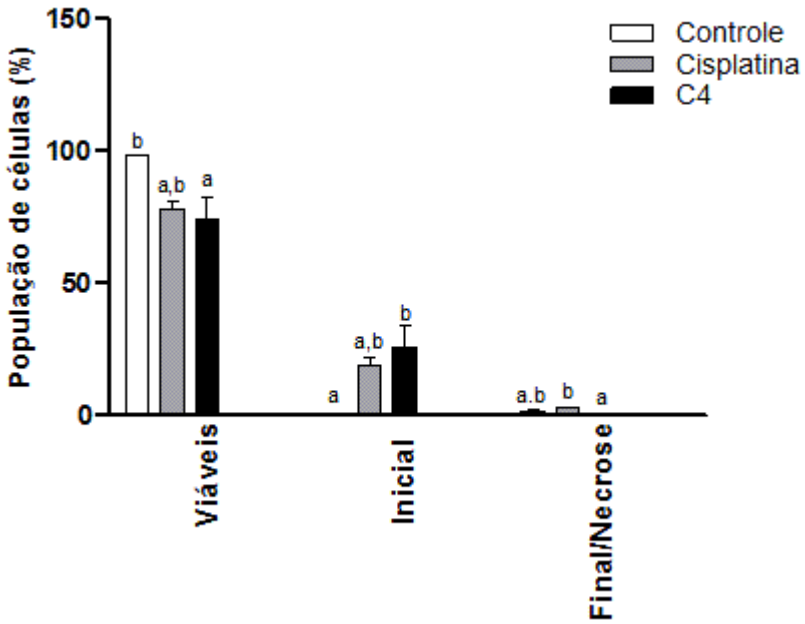

Figura 16. Perfil de morte celular por Apoptose após 24h de tratamento com Composto 4: Bis Silver complex (Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4- oxobut-2-anoyl) oxy); Cisplatina 50 µL/mL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p<0,05$).

5 DISCUSSÃO

Há uma constante busca por novos medicamentos e, portanto, vários compostos são desenhados e/ou sintetizados com o intuito de desenvolver produtos citotóxicos para as células tumorais sendo esses mais seletivos e com menos efeitos adversos. Os compostos citotóxicos são considerados como agentes com a habilidade de reduzir a proliferação celular. Esta característica é necessária 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), por exemplo.

Na presente pesquisa nós optamos por testar o efeito citotóxico de quatro compostos desenhados e sintetizados por nosso grupo no intuito de desenvolvimento de compostos mais efetivos e seletivos. Assim, as moléculas foram baseadas em maleimidas que é um composto sabidamente citotóxico para células tumorais (ALI et al., 2017). Nessa molécula básica foi reunido o radical farmacofório 1,4-dioxo-2-butenil que também é sabidamente citotóxico (JHA et al., 2010). Por fim, complexou-se aos compostos uma íon prata. O íon prata também está descrito como citotóxico (MIJNENDONCKX et al., 2013; MÉDICI et al., 2016; MÉDICI et al., 2019) e ele é parte integrante de diferentes quimioterápicos comerciais que são vastamente usados (HARPER et al., 2010). Dentre os quimioterápicos que contêm prata cita-se a cisplatina e seus análogos como a carboplatina, a oxaliplatina, nedplatina, lobaplatina e heptaplatina (NEVES; VARGAS, 2011). Apesar desses compostos serem anticancerígenos comprovados e vastamente usados, todos eles são pouco seletivos e, portanto, há diversos efeitos colaterais associados ao uso. Esses fatos descritos anteriormente foram a base para a criação das quatro moléculas que foram avaliadas nesse estudo (FREITAS, 2018).

Os nossos resultados demonstraram que ambos os complexos de prata com ácido maleâmico possuem efeito citotóxico e demonstraram que a IC_{50} do C1, C2, C3 e C4 são de 5,01; 9,87; 5,21; 5,78 µg/mL. Esses resultados indicam que esses compostos têm um importante efeito de indução de morte celular em células de

melanoma. Assim, infere-se que eles são um importante candidato para o desenvolvimento de quimioterápicos específicos para o tratamento desse câncer. Destaca-se ainda que os compostos C1, C2 e C4 foram capazes de reduzir a viabilidade celular (tanto no ensaio de MTT quanto no ensaio de citometria de fluxo) sem interferir na integridade da membrana. Esse fato sugere que a via de morte celular não é mediada por lesão de membrana plasmática e assim infere se que não seja por necrose. Esse fato foi confirmado visto que o ensaio de morte celular indicou aumento da frequência de células apoptóticas. Essas células foram identificadas devido à extrusão da proteína Anexina V, isso acontece na observação do início do apoptose, quando as células translocam a fosfatidilserina da face interna da membrana plasmática para a superfície celular. Uma vez na superfície celular a fosfatidilserina pode ser facilmente detectada por coloração com um conjugado fluorescente de Anexina V, uma proteína que tem uma alta afinidade pela fosfatidilserina. Ainda no mesmo que se avaliou o aumento da frequência de apoptose observou ausência da frequência de célula em necrose. Nesse teste a necrose é evidenciada pela junção da Anexina V e do Iodeto de Propídio. Assim, quando a célula apresentar somente apoptose inicial será Anexina V positiva, e observada no quadrante três, mas se a célula estiver em apoptose tardia ou necrose ela será duplamente positiva sinalizada com Anexin V e Iodeto de Propídio e observada no quadrante 1 e 2. No entanto, quando a membrana celular estiver íntegra nenhum dos corantes penetra a célula, permanecendo a mesma não marcada (duplo negativa) (GIRALDO, 2020).

Para o Composto 3 observou-se efeito semelhante. No entanto, ocorreu uma melhora da viabilidade em decorrência de uma ação protetora da membrana celular. Esse dado é importante porque além desse composto causar morte celular somente por apoptose (não causar necrose) ele ainda exibe um efeito protetor na membrana. Em geral, compostos quimioterápicos lesam, membranas como pode ser identificado para a cisplatina usado como controle positivo neste teste. A cisplatina induz uma combinação de eventos, que levam a lesões no DNA, estresse oxidativo na membrana celular, disfunção mitocondrial e inibe a síntese de proteínas, resultando assim na indução de apoptose (LUDWIG; OBERLEITHNER, 2004).

Assim, sugere-se que essa ação protetora da membrana possa indicar um diferencial importante em relação aos outros compostos testados e também em relação a quimioterápicos comerciais.

A literatura consultada não possui nenhum estudo com essas moléculas ou

com moléculas similares que nos permitam fazer comparações diretas. No entanto, a literatura possui outras moléculas que contém o radical 1,4-dioxo-2- butenil e derivados do ácido maleâmico.

Estudo anteriores de nosso grupo de pesquisa já demonstraram que quatro compostos derivados de maleimidas e contendo o radical 1,4-dioxo-2- butenil associados não à 4-aminoantipirina possuem características desejadas para o desenvolvimento de quimioterápicos (OLIVEIRA et al., 2018a; OLIVEIRA et al., 2018b; OLIVEIRA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2023). Porém, não devem ser associados a outros quimioterápicos (ciclosfosfamida, cisplatina e doxorrubicina) porque podem reduzir os seus efeitos devido à presença da 4-aminoantipirina. A redução dos efeitos quimioterápicos se devem ao efeitos antigenotóxico que podem ser observados na 4-aminoantipirina isolada ou contida em outras moléculas (BERNO et al et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018b; OLIVEIRA et al., 2019).

De acordo com Jha et al. (2010) composto contendo maleimida e o radical 1,4-dioxo-2-butenil, é citotóxico em células Molt4/C8 (leucemia), CEM/0 (linfócito T de linfoma) e L1210 (leucemia linfocítica de ratos). Posteriormente, Oliveira et al. (2018a) relatou que outro composto também contendo maleimida e o radical 1,4-dioxo-2-butenil (Bis copper complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino) -4- oxobut-2- enoyl) oxy)) foi citotóxico e genotóxico em células 4T1. Esse composto ainda induziu a parada de ciclo celular em fase G1 com aumento da expressão de ATM e P21. Os autores ainda sugeriram que as células tumorais 4T1 morrem por apoptose, já que foi registrado aumento de expressão de BAX e da caspase 7. Ainda em modelo pré-clínico (camundongos Swiss) esses autores demonstram que o composto foi genotóxico já que causou os danos genômicos (avaliados pelo teste do cometa). No entanto, não induziu danos cromossômicos (avaliados pelo ensaio de micronúcleos) em camundongos. Destaca-se ainda que esse composto aumentou a fagocitose esplênica.

Já Oliveira et al. (2018b), que testou um outro composto contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil e a 4-aminoantipirina ((Z)-4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2- phenyl-2,3dihydro-1H-pyrazol-4-yl)), demonstrou que esse composto induziu dano genômico sem causar dano cromossômico, aumentou a fagocitose esplênica e a frequência de linfócitos. Além disso, induziu morte celular tanto no fígado quanto nos rins. Esses resultados sugerem que o composto tem efeito quimioterápico com baixa indução de danos no DNA, o que sugere seletividade da molécula.

Outro estudo com um éster contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil e a 4-aminoantipirina ((Z)-methyl 4-((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H pyrazol-4-yl)amino)-4-oxobut-2-anoate) demonstrou que o composto não é genotóxico e não aumentou a fagocitose esplênica. No entanto, induziu morte celular no fígado e nos rins (OLIVEIRA et al. 2019).

A literatura especializada ainda registrou um outro estudo com um composto inédito contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil e a 4-aminoantipirina (2-1,5-Dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)-3a,4,7,7a-tetrahydro1H-4,7 methanoisoindole-1,3 (2H)- dione) (OLIVEIRA et al., 2023). Esse composto isolado aumentou a frequência de danos genômicos e cromossômicos, de fagocitose esplênica e de morte celular no fígado e nos rins. O estudo in sílico publicado nesse mesmo artigo demonstrou o acoplamento molecular, no composto em teste (ZIM) com a molécula de DNA. Esse acoplamente demonstrou mais afinidade para o ZIM do que para os seus precursores incluindo o 4-AA e os compostos descritos por Oliveira et al (2018b) e Oliveira et al. (2019). Assim, demonstrou-se que o ZIM pode quebrar o DNA e, portanto, o seu efeito antitumoral é mediado por danos no DNA, que foram confirmados biologicamente pela sua capacidade de induzir danos genômicos.

Diante do exposto, considera-se que os complexos de prata com ácido maleâmico (C1, C2, C3 e C4) têm características importantes para a prospecção de um quimioterápico eficiente e eficaz para o tratamento do câncer de melanoma. Além disso, destaca-se que C4 apresenta capacidade de prevenção de lesão de membrana, o que pode ser uma importante propriedade a ser explorada. Essa propriedade pode indicar seletividade e/ou um efeito desejado para quimioterápicos em desenvolvimento. Ainda são necessários mais estudos para se descrever os mecanismos de ação desses compostos. Também é importante que os compostos sejam avaliados, futuramente, em modelos pré clínicos de xenoenxerto de camundongos induzidos ao desenvolvimento de melanoma com células B16F10. Se os efeitos também se comprovarem in vitro ter-se-á em mãos importantes candidatos para a bioprospecção de medicamento para o tratamento do melanoma.

6 REFERÊNCIAS

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

ANASAMY, T.; THY, C. K.; LO, K. M.; CHEE, C. F.; YEAP, S. K.; KAMALI DEHGHAN, B.; CHUNG, L.Y. Tribenzyltin carboxylates as anticancer drug candidates: Effect on the cytotoxicity, mobility and invasiveness of breast cancer cell lines. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 125, p. 770-783, 2016

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.

BILAL Ahmed; Muhammad Imran Qadir; Saba Ghafoor ; **Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment.**Crit Rev Eukaryot Gene Expr .. **2020;30(4):291-297.**

BERNO, C. R., DE TOLEDO RÓS, B., DA SILVEIRA, I. O. M. F., COELHO, H. R., ANTONIOLLI, A. C. M. B., BEATRIZ, A., ... & OLIVEIRA, R. J. (2016). 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. *Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, *805*, 19-24.

BURDULENE, D. et al. Synthesis and antiinflammatory activity of 4- aminoantipyrine derivatives of succinamides. **Pharmaceutical Chemistry Journal,** v. 33, n. 4, p. 191-193, 1999.

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.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 99, n. 21, p. 13926-13931,2002.

CHEN, Y.-M.; CHEN, Y.-P. Measurements for the solid solubilities of antipyrine, 4-aminoantipyrine and 4-dimethylaminoantipyrine in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria,** v. 282, n. 2, p. 82-87, 2009.

CHIDAMBARAM, M., MANAVALAN, R., KATHIRESAN, K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 14, nº1, p. 67-77, 2011,

COOPER, G. The Development and Causes of Cancer. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sunderland (MA): **Sinauer Associates**; 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/

DOS SANTOS, G. G. et al. The analgesic effect of dipyrone in peripheral tissue involves two different mechanisms: Neuronal KATP channel opening and CB1 receptor activation. **European Journal of Pharmacology,** v. 741, p. 124-131, 2014.

FONSECA, T.G.; MORAIS, M. B.; ROCHA, T.; ABESSA, D. M.; AURELIANO, M.; BEBIANNO, M. J. Ecotoxicological assessment of the anticancer drug cisplatin in the polychaete Nereis diversicolor. Science of The Total Environment. v. 575, p. 162-172, 2016.

FREITAS, R. O. N. D. (2018). Prospecção química e biológica de novos complexos de Cu2+ e Ag+ baseados em ligantes contendo o grupo farmacofórico 1, 4-dioxo-butenil.

GIRALDO, Catalina Isabel Quilindo et al. Avaliação da viabilidade de espermatozoides humanos após liofilizaçãos utilizando a técnica de citometria de

fluxo. 2020.
GHORAB, M. M.; EL-GAZZAR, M. G.; ALSAID, M. S. Synthesis, Characterization and Anti-Breast Cancer Activity of New 4-Aminoantipyrine-Based Heterocycles. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 15, n. 5, p. 7539-7553, 2014.
Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativa 2023.
JHA, A.; MUKHERJEE, C.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; VADAPARTI, M.; DAS, U.; CLERCQ, E. D.; BALZARINI, J.; STABLES, J. P.; SHRIVASTAV, A.; SHARMA, R. K.; DIMMOCK, J. R. 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.
ŁUCZKA, P. W.; GRABARSKA, A.; LUSZCZKI. M.F.; PLEWA. Z.; LUSZCZKI, J. Synergy, Additivity, and Antagonism between Cisplatin and Selected Coumarins in Human Melanoma Cells. **Int J Mol Sci**. 2021 Jan 7;22(2):537.
LUDWIG, Thomas; OBERLEITHNER, Hans. Platinum complex toxicity in cultured renal epithelia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 14, n. 4-6, p. 431-440, 2004.
LUKIANOVA-HLEB, E. Y., REN, X., ZASADZINSKI, J. A., WU, X., & LAPOTKO, D. O. (2012). Plasmonic Nanobubbles Enhance Efficacy and Selectivity of Chemotherapy Against Drug-Resistant Cancer Cells. *Advanced Materials*, *24*(28), 3831-3837.
LUNDQVIST, E. A.; FUJIWARA, K.; SEOUD, M. Principles of chemotherapy. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, n. 12, p. S146- S149, 2015.
MAIONE, S. et al. Effects of metabolites of the analgesic agent dipyrone (metamizol) on rostral ventromedial medulla cell activity in mice. **European Journal of Pharmacology,** v. 748, p. 115-122, 2015.
MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. **Radiology and oncology**, v. 53, nº 2, p. 148-158, 2019.
MANZARI, M. T., SHAMAY, Y., KIGUCHI, H., ROSEN, N., SCALTRITI, M., & HELLER, D. A. (2021). Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nature Reviews Materials*, *6*(4), 351-370.
MEDICI, S. et al. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. Coordination Chemistry Reviews, v. 327–328, p. 349–359, 2016.
MEDICI, S. et al. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. Journal of Medicinal Chemistry, v. 62, n. 13, p. 5923–5943, 2019.
MIJNENDONCKX, K. et al. Antimicrobial silver: Uses, toxicity and potential for resistance. BioMetals, v. 26, n. 4, p. 609–621, 2013.
MIN, J., CHIN, L. K., OH, J., LANDEROS, C., VINEGONI, C., LEE, J., ... & WEISSLEDER, R. (2020). CytoPAN—Portable cellular analyses for rapid point of-care cancer diagnosis. *Science translational medicine*, *12*(555), eaaz9746.
NAVARRO, S. D., PESSATTO, L. R., MEZA, A., DE OLIVEIRA, E. J. T., AUHAREK, S. A., VILELA, L. C., ... & MARTINES, M. A. U. (2018). Resorcinolic lipid 3-heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one is a strategy for melanoma treatment. *Life sciences*, *209*, 300-312.
NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). **Cancer treatment.** Disponível em: http: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment. Acesso em: 22 dez. 2021.
OLIVEIRA, E. J. T.; PESSATO, L. R.; FREITAS, R. O. N.; PELIZARO, B. I.; RABACOW, A. P. M.; VANI, J. M.; MONREAL, A. C. D., MANTOVANI, M. S., AZEVEDO, R. B.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; GOMES, R. S.; OLIVEIRA, R. J.

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, 2018a.

OLIVEIRA, R. J.; SANTOS, N. C. L.; PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, B. C.; BERNO, C. R.; ARAÚJO, F. H. S.; SILVEIRA, I. O. M. F.; NASCIMENTO, R. O.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; MONREAL, A. C. D.; BEATRIZ, A.; LIMA, D.
P.; GOMES, R. S. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, p. 154-166, 2018b.

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.

OLIVEIRA, R. J., MANTOVANI, M. S., DA SILVA, A. F., PESARINI, J. R., MAURO, M. O., & RIBEIRO, L. R. (2014). Compounds used to produce cloned animals are genotoxic and mutagenic in mammalian assays in vitro and in vivo. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *47*, 287-298.

OLIVEIRA, R. J., DA SILVEIRA, I. O. M. F., DAS NEVES, S. C., MITSUYASU, B., MARTINS, A. C., BERNO, C., ... & DA SILVA GOMES, R. (2022). ZIM, a Norbornene Derived from 4-Aminoantipyrine, Induces DNA Damage and Cell Death but in Association Reduces the Effect of Commercial Chemotherapeutics. *Chemical Research in Toxicology*, *36*(1), 66-82.

PESSIN, J. V.; TAVARES, L.; GRADELLA, D. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MALEIMIDAS E SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS ÂMICOS. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 15, n. 28, 2018.

PETRYSZYN, Pawel; CHAPELLE, Nicolas; MATYSIAK-BUDNIK, Tamara. Gastric cancer: where are we heading?. **Digestive Diseases**, v. 38, n. 4, p. 280- 285, 2020.

PIERRE, S. C. et al. Inhibition of Cyclooxygenases by Dipyrone. **British Journal of Pharmacology,** v. 151, n. 4, p. 494-503,2007.

PREMNATH, D. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of fluorescent 4-aminoantipyrine analogues: Molecular docking and in vitro cytotoxicity studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** v. 153, p. 118-123, 2016.

ROSOLEN, Daiane. **Citotoxicidade de derivados maleimídicos: relação entre a atividade antitumoral e antiadipogênica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Fármacia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/123405. 13 dez. 2021.

SALAS, L.M.V.; VÁZQUEZ, N.G.G.; RAMOS, J.C.G.; BUGARIN, O. T.; GÓMEZ, C.; PESTRYAKOV, A.;GÓMEZ, L. J.V.; MAGAÑA, Y.T.; OGDANCHIKOVA, N. Antiproliferative and Antitumour Effect of Nongenotoxic Silver Nanoparticles on Melanoma Models.**Oxidative Medicine and Cellular Longevity** .Volume 2019,

SHAHSAVANI, M. B.; AHMADI, S.; ASEMAN, M. D.; NABAVIZADEH, S. M.; RASHIDI, M.; ASADI, Z.; ERFANI, N.; GHASEMI, A.; SABOURY, A. A.; NIAZI, A.; BAHAODDINI, A.; YOUSEFI, R. Anticancer activity assessment of two novel binuclear platinum (II) complexes. Journal of Photochemistry and Photobiology. v. 161, p. 345-354, 2016.

SHARMA, N. K., AMETA R. K., SINGH, M. Spectrophotometric and physicochemical

studies of newly synthesized anticancer Pt (IV) complexes and their interactions with CT-DNA. Journal of Molecular Liquids. v. 222, p. 752-761, 2016

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. CA: A **Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAKIMOTO, Y.; IMAI, T.; KONDO, M.; HANADA, Y.; UNO, A.; ISHIDA, Y.; KAMAKURA, T.; KITAHARA, T.; INOHARA, H.; SHIMADA, S. Cisplatin-induced toxicity decreases the mouse vestibule-ocular reflex. Toxicology Letter. v. 262, p. 49-54, 2016.

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

TENG, Y.; LIU, R. Insights into potentially toxic effects of 4-aminoantipyrine on the antioxidant enzyme copper–zinc superoxide dismutase. **Journal of Hazardous Materials,** v. 262, p. 318-324, 2013.

TURAN-ZITOUNI, G. et al. Synthesis of some triazolyl-antipyrine derivatives and investigation of analgesic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 36, n. 7–8, p. 685-689, 2001.

VINAGRE, A. M.; COLLARES, E. F. Effect of 4-aminoantipyrine on gastric compliance and liquid emptying in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 40, n. 7, p. 903-909, 2007.

WANG, Q. W.; LAM, P. L.; WONG, R. S.; CHENG, G. Y.; LAM, K. H.; BIAN, Z. X.; HO, C. L.; FENG, Y. H.; GAMBARI, R.; LO, Y. H.; WONG, W. Y.; CHUI, C. H. Synthesis of platinum (II) and palladium (II) complexes with 9,9-dihexyl-4,5-diazafluorene and their in vivo antitumor activity against Hep3B xenografted mice. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 124, p. 537-543, 2016.

WINFIELD, HANNAH J., et al. Synthesis and anticancer activity of novel bisindolylhydroxymaleimide derivatives with potent GSK-3 kinase inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 14, p. 4209-4224, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Câncer. 2023. Disponível em: <https://who.int/health-topics/cancer#tab=tab1>. Acesso em: 06 fev 2024.

YOKOTA , J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 497-503, 2000.