PATRICK WELLINGTON DA SILVA DOS SANTOS

**Influência do sulforafano, um inibidor de histonas desacetilases,
sobre a instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos em
linhagens celulares humanas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Toxicologia, da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria
Greggi Antunes

Coorientador: Dr. Alexandre Ferro Aissa

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação de Toxicologia em 22/03/2019. A versão original encontra-se
disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto
2019

RESUMO

SANTOS, Patrick Wellington da Silva dos. **Influência do sulforafano, um inibidor de histonas desacetilases, sobre a instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos em linhagens celulares humanas**. 2019. 124f. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O sulforafano é um isotiocinato encontrado nos vegetais crucíferos e apresenta-se como um potente inibidor da carcinogênese. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o sulforafano afeta células cancerosas ainda não são totalmente compreendidos. Sendo assim, nesse estudo foi feita uma investigação abrangente em nível celular e molecular para avaliar os efeitos do sulforafano em células de hepatocarcinoma, HepG2 e células de tecido gástrico humano, GAS. Os resultados demonstraram o potencial antioxidante do sulforafano em baixas concentrações e os efeitos citotóxicos, reduzindo a viabilidade celular em ambas as linhagens nas concentrações maiores. A análise do transcriptoma permitiu identificar a influência do sulforafano em diversas vias de sinalização. A parada do ciclo celular em G₂/M e o aumento da expressão de ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDK) sugerem que o sulforafano induz bloqueio mitótico em HepG2. O sulforafano induziu danos no DNA em HepG2 e esse efeito genotóxico pode estar relacionado com a inibição das histonas desacetilases (HDAC) uma vez que essas enzimas que controlam o perfil da cromatina foram encontradas com expressão gênica reduzida. Os danos no DNA causados pelo sulforafano podem ter induzido a parada do ciclo celular e a indução de morte celular por apoptose. Foi possível observar o aumento da população de células apoptóticas em ambas as linhagens. Inibição de vias de sinalização MAPK/ERK/JUN e PIK3/AKT podem estar relacionadas com a redução da proliferação celular observada em HepG2 por meio do ensaio clonogênico. Por fim, o sulforafano alterou o padrão de metilação em ambas as linhagens, o que pode estar relacionado com o silenciamento de *motifs* de fatores de transcrição relacionados com proliferação e crescimento tumoral. Os dados apresentados compreendem uma visão global da influência do sulforafano com diversos mecanismos anticâncer, e podem servir como recurso para futuros estudos.

Palavras-chave: RNA-Seq, quimiopreventivo, RRBS, transcriptoma

ABSTRACT

SANTOS, Patrick Wellington da Silva dos. **Influence of sulforaphane, an inhibitor of histone deacetylases on the genomic instability and epigenetic mechanisms in human cell lines.** 2019. 124f. Dissertation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Sulforaphane is an isothiocyanate found in cruciferous vegetables and is a potent inhibitor of carcinogenesis. However, the molecular mechanisms by which sulforaphane affects cancer cells are still not fully understood. Thus, a comprehensive cellular and molecular investigation were conducted in this study to evaluate the effects of sulforaphane on hepatocarcinoma cells, HepG2 and human primary gastric cells, GAS. The results demonstrated the antioxidant potential of sulforaphane at low concentrations and cytotoxic effects, reducing cell viability in both cell lines at higher concentrations. The RNA-Seq analysis allowed to identify the influence of sulforaphane in several signaling pathways. Cell cycle arrest in G2/M and increased expression of cyclin-dependent cyclins and kinases (CDK) suggest that sulforaphane induces mitotic block in HepG2. Sulforaphane induced DNA damage in HepG2, and this genotoxic effect may be related to inhibition of histone deacetylases (HDAC) since these chromatin profile controlling enzymes were found downregulated. The DNA damage caused by sulforaphane may have induced cell cycle arrest and cell death by apoptosis. Sulforaphane induced apoptosis and triggered pro-apoptotic signals in both cell lines. The downregulation of MAPK / ERK / JUN and PIK3 / AKT signaling pathways may be related to reduced cell proliferation observed in HepG2 by the clonogenic assay. Finally, sulforaphane altered the methylation pattern in both strains, which may be related to the silencing of motifs of transcription factors related to proliferation and tumor growth. The data presented include an overview of the influence of sulforaphane on several anticancer mechanisms and may serve as a resource for future studies.

Keywords: RNA-Seq, chemopreventive, RRBS, transcriptome

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENOMA, EPIGENOMA E CÂNCER

O câncer é um problema de saúde crescente em todo o mundo. A ocorrência do câncer está relacionada com envelhecimento populacional, assim como a prevalência de fatores de risco, tais como, excesso de peso e pouca prática de atividade física, além do tabagismo. A falta de ferramentas para diagnosticar com eficácia os estágios iniciais do tumor, poucos tratamentos disponíveis para pacientes com tumores em estágio avançado e a resistência do tumor a múltiplas drogas contribuem para o aumento dos casos da doença e reforça a necessidade de expansão dos esforços afim de prevenir o câncer (SESTILI; FIMOGNARI, 2015).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o câncer está entre as dez maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (MCGUIRE, 2016). Em 2015, houve 8,8 milhões de mortes causadas pelo câncer. Há uma estimativa de que nas próximas duas décadas, o número de novos casos de câncer será próximo de 20,3 milhões por ano, resultando em cerca de 13,2 milhões de mortes anualmente (THUN et al., 2010). A maior incidência de tumores ocorre nos países de baixa e média renda, por exemplo o Brasil. A taxa de incidência de novos casos de câncer, publicada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), foi de 324,58 casos em 100 mil habitantes para homens e 310,30 para mulheres (INCA, 2018). Além disso, o impacto econômico da doença é de grande significância. O custo total com câncer em 2010 foi estimado em aproximadamente 1,14 trilhão de dólares (VINEIS; WILD, 2014; FERLAY et al., 2015; TORRE et al., 2015).

Hanahan e Weinberg, em seu clássico artigo publicado em 2000 (HANAHAN; WEINBERG, 2000), e revisado e atualizado em 2011 (HANAHAN; WEINBERG, 2011), classificaram as características fundamentais para a ocorrência do câncer. Para os autores, essas características são como capacidades funcionais adquiridas que permitem que as células cancerosas sobrevivam, proliferem e disseminem. Uma das características de ativação para o desenvolvimento do tumor é a instabilidade genômica, que gera mutações aleatórias, incluindo rearranjos cromossômicos. O ambiente celular instável causado por essas mutações altera as funções celulares primárias, por exemplo, ciclo celular. Genes responsáveis pelo ciclo celular e crescimento em condições normais podem, após mutações, tornarem-se oncogenes, levando à proliferação descontrolada (SETO; HONMA; NAKAGAWA, 2010; HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017).

Entretanto, a genética *per se* não explica os canceres esporádicos e o desenvolvimento de câncer em pessoas sem histórico familiar da doença (VERMA, 2015). Alterações, como

inativação de genes supressores tumorais e ativação de oncogenes, podem ocorrer por influência de mecanismos epigenéticos, tais como modificações no padrão de metilação do DNA e modificações nas histonas (BERDASCO; ESTELLER, 2010). Hoje é amplamente aceito que a carcinogênese envolve a combinação de fatores genéticos e epigenéticos (MIKESKA; CRAIG, 2014; VALDES-MORA; CLARK, 2015).

A epigenética é uma herança não mendeliana de modificações no DNA, que embora não afete a sequência de bases, pode influenciar a expressão de genes de um ou mais alelos. Alterações epigenéticas são cruciais para a manutenção do padrão de expressão gênica de cada tipo celular durante as divisões celulares (BERDASCO; ESTELLER, 2010). Marcas epigenéticas são estabelecidas para manter a identidade celular. Entretanto, marcas epigenéticas também podem ser adquiridas pela influência do ambiente ao longo da vida. Algumas podem ser reversíveis, embora uma vez estabelecidas, são relativamente estáveis (FAULK; DOLINOY, 2011; SUPIC; JAGODIC; MAGIC, 2013; WU, S. et al., 2016).

Diversos mecanismos que controlam a expressão gênica, tais como a metilação do DNA, modificações de histonas, e regulação pós-transcricional por microRNAs são considerados mecanismos epigenéticos. Estes mecanismos estão envolvidos no silenciamento e transcrição gênica, inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, replicação e reparo do DNA, e manutenção da estabilidade genômica (QURESHI; MEHLER, 2014).

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais bem estudado e é uma modificação covalente que ocorre exclusivamente em citosinas, quase sempre seguidas do nucleotídeo guanina (BERGMAN; CEDAR, 2013). O genoma humano contém aproximadamente 30 milhões de dinucleotídeos CpG; regiões com alta frequência de CpG são chamadas de ilhas CpG. Interessante, 75% das regiões promotoras de genes contém ilhas CpG, e estão, normalmente, não-metiladas (EDWARDS et al., 2017). A metilação do DNA funciona como um sistema de anotação para a informação genética, alterando a expressão gênica devido a sua habilidade de influenciar fatores de ligação e a estrutura da cromatina (DOR; CEDAR, 2018).

Vários estudos mostraram a associação entre doenças, fatores ambientais e mecanismos epigenéticos (MILLAN, 2014; KAPPIL; WRIGHT; SANDERS, 2016; HOLMES; PULIT; LINDGREN, 2017). Esses avanços demonstram a importância de incorporar os estudos epigenéticos na identificação de carcinógenos e avaliação de segurança durante ensaios pré-clínicos. Recentemente, eventos epigenéticos surgiram como os mecanismos fundamentais no

desenvolvimento do câncer, bem como sua interação com o genoma e fatores ambientais, por exemplo a dieta (REID; DAI; LOCASALE, 2017; TIFFON, 2018).

1.2 EPIGENÉTICA E DIETA

Nas últimas décadas, a oncologia tem mudado seu meio de ação de reativo para proativo, com isso surgiu o desenvolvimento dos programas preventivos conhecidos como programas “4P” por serem preventivos, preditivos, personalizados e participativos. Esses programas representam um esforço e parte importante do controle da incidência e mortalidade causada pelo câncer (JANSSENS; SCHUSTER; VOSS, 2018). Ações preventivas tem custo-benefício maior que as medidas terapêuticas, e não se limitam apenas a populações de risco, podendo ser estendidas para toda população independente do perfil econômico (VALLE; TRAMALLONI; BRAGAZZI, 2015).

Entretanto, qualquer um dos pilares dos programas “4P” não se sobressaem sozinhos e em um contexto onde o aumento dos casos de câncer será maior nos países em desenvolvimento, é difícil que essas regiões tenham acesso aos fármacos com alvos moleculares personalizados. Em vista disso, a implementação de programas de controle ao tabaco e álcool, promoção da vacinação e exames de rotina, assim como programas de saúde pública que promovam atividade física e o consumo de alimentos saudáveis com uma dieta balanceada teriam grandes impactos positivos na saúde das comunidades e consequentemente na prevenção do câncer (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2017).

Cerca de 3 a 4 milhões de casos de câncer poderiam ter sido evitados por meio de um estilo de vida saudável (POTTER et al., 2016). A relevância da dieta na prevenção e desenvolvimento de tumores é amplamente reconhecida devido a uma quantidade considerável de evidências obtidas de pesquisas básicas, epidemiológicas e clínicas (ZITVOGEL; PIETROCOLA; KROEMER, 2017). A dieta pode influenciar o processo de carcinogênese, afetando processos celulares importantes que regulam o equilíbrio entre proliferação e morte celular, expressão de oncogenes e supressores tumorais e da sinalização celular, além de outros fatores que modulam a expressão gênica (MAYNE; PLAYDON; ROCK, 2016).

Embora a dieta esteja associada ao risco de câncer, os mecanismos moleculares entre essa associação não estão ainda completamente entendidos. Há várias evidências do efeito da dieta na via metabólica dos doadores de grupos metil. Folato, vitaminas B, colina, entre outros podem influenciar indiretamente a metilação do DNA (SAPIENZA; ISSA, 2016). A suplementação de ácido fólico garante o desenvolvimento e o crescimento normal humano

(BAILEY et al., 2015). Diferentes estudos demonstraram que a suplementação de ácido fólico reduziu a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos (STOPPER et al., 2008; FENECH; BONASSI, 2011).

Estudos com roedores mostraram que dietas com ausência ou suplementação de nutrientes doadores de grupo metil podem ter consequências prejudiciais que vão de problemas no metabolismo de lipídeos (AISSA et al., 2014) e instabilidade genômica (AISSA et al., 2013).

Um padrão de dieta saudável é composto por grandes quantidades de frutas, legumes, além de aves, peixes, cereais integrais e baixa ingestão diária de gorduras (BAENA RUIZ; SALINAS HERNANDEZ, 2014). Tem sido proposto que compostos da dieta, presentes principalmente em frutas e legumes, podem influenciar as marcas epigenéticas e, conseqüentemente, reativar genes supressores tumorais e silenciar oncogenes (LABBE et al., 2015). As alterações epigenéticas induzidas pela dieta podem ocorrer durante toda a vida e têm efeitos transgeracionais (BISHOP; FERGUSON, 2015). O consumo de uma dieta composta por nutrientes que modificam o epigenoma poderia ajudar não somente na prevenção, mas inclusive no tratamento do câncer em estágios iniciais (HARDY; TOLLEFSBOL, 2011; MEERAN et al., 2012).

Nutrientes e seus metabólitos intermediários são fontes essenciais para diversos mecanismos celulares e funcionam como sinalizadores moleculares, modulando funções no genoma que permitem adaptações celulares ao ambiente (STOVER et al., 2018). Compostos bioativos da dieta podem modificar diretamente elementos da cromatina, incluindo as proteínas histonas que controlam a estrutura da cromatina, resultando em alterações na expressão gênica e na estabilidade genômica. Além disso, a expressão gênica pode ser influenciada por esses compostos atuando como ligantes de fatores de transcrição, influenciando a atividade de microRNAs, o sistema de reparo do DNA, crescimento celular, estresse oxidativo, inflamação e apoptose (NOLTE-T HOEN et al., 2015).

Os compostos bioativos da dieta, incluindo folato, polifenóis, retinóides, ácidos graxos e isotiocianatos têm mostrado um interessante potencial quimiopreventivo, participando em mecanismos epigenéticos, na sinalização celular influenciando fatores de transcrição, modulando o sistema de reparo do DNA, de crescimento celular, de resposta ao estresse oxidativo, inflamação e apoptose (REMELY et al., 2015; BRAICU et al., 2017)

1.3 VEGETAIS CRUCÍFEROS, ISOTIOCIANATOS E SULFORAFANO

Pesquisas recentes demonstraram o potencial efeito quimiopreventivo de uma dieta rica em vegetais crucíferos (LEONE et al., 2017; STURM; WAGNER, 2017; ABBAOUI et al., 2018; ABDULL RAZIS; KONSUE; IOANNIDES, 2018). A família *Brassicaceae* contém mais de 3 mil espécies divididas em 350 gêneros. A espécie mais conhecida é a *Brassica oleracea* que apresenta variedades morfológicas, sendo as mais comuns: brócolis, couve, repolho, couve de Bruxelas, entre outras. Os vegetais crucíferos são ricos em metabólitos secundários, ou seja compostos que não são essenciais para o crescimento vegetal; esses compostos são chamados de fitoquímicos (NOVIO et al., 2016). Os metabólitos secundários característicos nos vegetais crucíferos são os glicosinolatos, e sua concentração varia de acordo com a espécie, idade e saúde da planta, além de fatores ambientais (MITHEN et al., 2000). Em resposta a algum dano físico na planta, ação de herbívoros, cozimento ou mastigação dos vegetais crucíferos, os glicosinolatos são hidrolisados pela enzima mirosinase e esse processo resulta na formação de isotiocianatos, tiocianatos ou oxazolidina-2-tiona (NOVIO et al., 2016; OLIVIERO; VERKERK; DEKKER, 2018), a mirosinase microbial também participa desse processo de hidrólise (BUDNOWSKI et al., 2015). Os isotiocianatos têm como característica um grupo funcional enxofre ($N=C=S$). Evidências sugerem que os efeitos quimiopreventivos dos isotiocianatos atuam conectados em uma série de mecanismos envolvidos com detoxificação, inflamação, regulação do ciclo celular e modulação epigenética (GRUNDEMANN; HUBER, 2018).

Um dos principais e promissores compostos entre os isotiocianatos é o sulforafano (Figura 1), encontrado em altas concentrações no brócolis. O sulforafano foi isolado por Zhang et al. (1992), que apresentaram esse composto como um potente agente anticarcinogênico. Após o consumo, o sulforafano é absorvido passivamente pelas células do trato gastrointestinal e principalmente metabolizado na via do ácido mercaptúrico, por conjugação com o resíduo de cisteína dos grupos tiol da glutathione. As moléculas de sulforafano conjugado são transportadas para fora das células por meio do transporte ativo realizado pelas proteínas associadas a resistência a multidrogas ABCC1, ABCC2 e glicoproteína P (KIM et al., 2015). Na circulação sistêmica, o sulforafano conjugado se dissocia devido à baixa concentração de glutathione no plasma. O sulforafano pode ser absorvido por órgãos periféricos e se acumular pela reação com grupos tiol de glutathione e outras proteínas dessas células (OLIVIERO; VERKERK; DEKKER, 2018). Sulforafano livre e conjugado são principalmente excretados na urina (JI; MORRIS, 2003).

Figura 1 - Estrutura química do sulforafano

Fonte: Zhang et al. (1992)

A concentração plasmática após o consumo de sulforafano e outros isotiocianatos em geral dependem do modo de preparo, processamento e armazenamento dos vegetais. Por exemplo, cozimento a vapor mantém concentrações maiores de sulforafano que vegetais fritos (GIAMBANELLI et al., 2016). Em geral, a bioacessibilidade de um composto é a fração desse composto que atinge o local de absorção e que pode ser absorvido pelas células epiteliais intestinais. A biodisponibilidade de um composto é a fração desse composto que é realmente absorvida e circula sistemicamente em órgãos e tecidos e é usada para funções fisiológicas (OLIVIERO; VERKERK; DEKKER, 2018). Um estudo sobre a farmacocinética do sulforafano demonstrou que o pico da concentração plasmática de sulforafano foi de aproximadamente 2,2 μM após 2 horas do consumo de 100g de brócolis preparado como uma sopa (GASPER et al., 2005). Não há evidências de que a ingestão dietética normal de brócolis esteja associada à toxicidade, mesmo a longo prazo (DAVIDSON et al., 2017).

1.4 ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DO SULFORAFANO

Certas vias moleculares são capazes de proteger células e organismos contra carcinogênese, mutagênese e outras formas de toxicidade (YANG; PALLIYAGURU; KENSLER, 2016). O sulforafano pode influenciar diversas vias celulares que diminuem, reverterem ou bloqueiam o efeito de compostos que causam danos no DNA e favorecem a carcinogênese (BAYAT MOKHTARI et al., 2018). O sulforafano pode modular a fase I do metabolismo diretamente ou por meio de interações com enzimas do citocromo P450 (CYP). O complexo de enzimas CYP é um importante componente do metabolismo de fármacos, esteroides, vitaminas lipossolúveis, agrotóxicos e muitos outros tipos de moléculas, por meio de reações de oxidação, redução e hidrólise (GUENGERICH; WATERMAN; EGLI, 2016). Entretanto, polimorfismos nos genes *CYP* são associados com uma gama de cânceres humano, possivelmente pela capacidade dessas enzimas converterem pró-carcinógenos em carcinógenos

ativos (BLACKBURN et al., 2015). A inibição de enzimas de fase I é reconhecida como um mecanismo de bloquear a carcinogênese (CLARKE; DASHWOOD; HO, 2008). Um estudo demonstrou que o sulforafano inibiu a atividade das enzimas CYP1A1 e CYP1A2 em células de tumor mamário MCF7. Essas enzimas são responsáveis pela oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e formam adutos que podem gerar quebras na fita do DNA e mutações (SKUPINSKA et al., 2009). A modulação da ativação metabólica das enzimas de fase I causada pelo sulforafano foi observado em camundongos Swiss após danos induzidos com benzopireno (KALPANA DEEPA PRIYA; GAYATHRI; SAKTHISEKARAN, 2011).

Dentro da célula, o sulforafano reage com a proteína *Kelch-like ECH associated protein 1* (KEAP1), uma proteína rica em cisteínas que interagem com uma série de oxidantes e eletrófilos, incluindo o sulforafano (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; CANNING, 2017). O substrato mais conhecido de KEAP1 é o fator de transcrição *Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2* (NRF2). Em condições normais, KEAP1 se liga ao NRF2 por meio de um mecanismo conhecido como “chave e fechadura”, induzindo poliubiquitinação no citoplasma, e por consequência, aumentando a degradação protossomal do NRF2. Em condições de estresse oxidativo ou ação de ativadores, ocorre modificações químicas nos resíduos *Cullin3* das cisteínas presentes em KEAP1 resultando no desapareamento entre KEAP1 e NRF2. Essas modificações em KEAP1 inibem a degradação de NRF2 permitindo a sintetização *de novo* desse fator de transcrição e sua translocação para o núcleo, onde dimeriza-se com proteínas chamadas de *small MAF proteins* para se ligar ao elemento de resposta antioxidante presente na região promotora dos genes alvos (FOURQUET et al., 2010). O NRF2 no núcleo é responsável por promover a expressão de enzimas antioxidantes de fase II incluindo a *Heme Oxygenase 1* (HMOX1), *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1* (NQO1), *Thioredoxin* (TXN) e *Thioredoxin Reductase 1* (TXNRD1) (Figura 2) (KENSLER; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007; VAHID et al., 2015).

Figura 2 – Ativação da maquinaria transcricional de enzimas antioxidantes por meio da ação de NRF2

O sulforafano rompe a ligação entre KEAP1 e NRF2, permitindo a translocação de NRF2 para o núcleo, onde liga-se a proteínas MAF e ao elemento de resposta antioxidante, resultando na transcrição de genes responsáveis pela expressão de enzimas de fase II. Fonte: Patrick W. S. Santos (2018).

O aumento na expressão de enzimas de fase II induzido pelo sulforafano foi extensivamente reportado em modelos *in vivo* e *in vitro* (CHEUNG; KONG, 2010; BARRERA et al., 2013; LENZI; FIMOGNARI; HRELIA, 2014). Em células HepG2, o sulforafano aumentou transcrição de mRNA de diversas enzimas de fase II, incluindo glucuronosiltransferase (UGT) e quinona redutase (QR) (JIANG et al., 2003). Após o tratamento com sulforafano, células de câncer de próstata aumentaram os níveis das enzimas NQO1, QR e principalmente GCLM que é responsável pelo aumento da glutathione intracelular (BROOKS; PATON; VIDANES, 2001). A hepatite C é uma infecção induzida por estresse oxidativo; o sulforafano suprimiu a replicação do vírus da hepatite C por meio da ativação indireta via NRF2 de enzimas antioxidantes (YU et al., 2016). Além disso, o sulforafano reativou as defesas antioxidantes, induzindo a atividade de NRF2 após envelhecimento induzido por estresse oxidativo em células epiteliais da lente ocular humana (KUBO et al., 2017).

O primeiro registro da eficácia quimiopreventiva do sulforafano foi usando o modelo de ratos Sprague-Dawley fêmeas com tumor mamário induzido pelo carcinógeno dimetilbenzantraceno. O sulforafano foi administrado por 150 dias em concentrações de 75, 100 ou 150 μM por dia após a indução tumoral. Ao fim do tratamento, houve redução do peso dos tumores e retardo do desenvolvimento tumoral (ZHANG et al., 1994). Diversos estudos foram conduzidos usando camundongos e ratos *knockout* para NRF2 (FAHEY et al., 2002; DINKOVA-KOSTOVA et al., 2006; XU et al., 2006). Por exemplo, o sulforafano reduziu efetivamente o crescimento tumoral em camundongos C57BL/6J tipo selvagem com câncer de estômago induzido por benzopireno, mas não houve efeitos de redução tumoral nos animais *knockout* para NRF2 (FAHEY et al., 2002).

Estudos clínicos com humanos têm apoiado os efeitos quimiopreventivos do sulforafano contra a formação de neoplasias. Vários ensaios clínicos avaliaram a tolerância e a segurança desse composto, sendo que alguns desses estudos clínicos de fase I demonstraram que extrato de broto de brócolis contendo sulforafano foram bem tolerados (TALALAY et al., 2007; BROWN et al., 2015). O sulforafano não causou efeitos adversos tóxicos significativos quando administrado 25 μM três vezes por dia durante cinco dias em voluntários saudáveis (SHAPIRO et al., 2006). Um estudo clínico detalhado de fase II em homens com câncer de próstata recorrente por 20 semanas e concentração diária de 200 μmol , também confirma a segurança do sulforafano (ALUMKAL et al., 2015). Ademais, um outro estudo avaliou a efetividade do sulforafano em pacientes com adenocarcinoma no ducto pancreático. Os resultados indicaram que ingestão diária de 90 mg de sulforafano por 12 meses, inibiu o crescimento tumoral e a sensibilidade do câncer (LOZANOVSKI et al., 2014).

1.5 PROPRIEDADES ANTICÂNCER DO SULFORAFANO

O termo hormese vem sendo amplamente usado no campo da toxicologia e se refere a uma dose resposta bifásica com estimulação e efeito benéfico em baixa concentração e efeito inibitório e tóxico em alta concentração de agentes químicos (BAO et al., 2014). Quando células ou um organismo são expostos com concentrações baixas de um composto conhecido por gerar danos em altas concentrações, essa exposição induz efeitos adaptativos nas células (MATTSON, 2008). Compostos antioxidantes naturais apresentam dose resposta hormética, por exemplo, a curcumina encontrada na soja e trissulfeto de dialila encontrado no alho, pois também ativam a via NRF2 após reação com os resíduos de cisteínas da KEAP1, resultando em uma resposta antioxidante, entretanto possuem efeitos anticâncer em concentrações maiores

(KIM et al., 2014; RAINEY et al., 2015). Além disso, o resveratrol que é composto bioativo encontrado em altas concentrações em uvas, também possui propriedade antioxidante em baixas concentrações e efeito antiproliferativo em altas concentrações (PLAETH et al., 2016). Atualmente, há o consenso de que o sulforafano possa ser considerado um agente hormético (FORMAN; DAVIES; URSINI, 2014). Sendo assim, o sulforafano em baixas concentrações exerce efeito quimiopreventivo, antioxidante e citoprotetor, porém em concentrações altas exibe propriedades citotóxicas e antitumorais (SESTILI; FIMOIGNARI, 2015; PENNISI et al., 2017).

A maioria dos estudos envolvendo sulforafano tem por objetivo investigar suas propriedades quimiopreventivas, conforme apresentadas anteriormente. Entretanto há um número crescente de estudos que buscam compreender a atividade anticâncer e os mecanismos celulares e moleculares influenciados pelo sulforafano (BURNETT et al., 2017; MILCZAREK et al., 2018). Os estudos que investigam os efeitos anticâncer do sulforafano trabalham em concentrações acima de 5 μ M, ou seja, concentrações dificilmente alcançadas e mantidas pela ingestão de vegetais crucíferos (FIMOIGNARI et al., 2014). Após a iniciação tumoral, o sulforafano atua como um supressor do desenvolvimento do câncer, pois influencia e modula diversos alvos moleculares responsáveis por controlar uma série de mecanismos, entre eles, indução de apoptose, parada do ciclo celular e inibição da proliferação celular (TORTORELLA, S. M. et al., 2015).

Apoptose é a principal via molecular de morte celular, frequentemente ativa durante o desenvolvimento e homeostase tecidual, entretanto pode ser desencadeada por estresse celular (ELMORE, 2007). Apoptose possui duas principais vias, a intrínseca e a extrínseca, ambas resultam na ativação de caspases que desencadeiam morte celular com morfologia característica e formação de corpos apoptóticos. A apoptose extrínseca pode ser desencadeada pela sinalização dos receptores de morte na membrana plasmática, incluindo ligações de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) nos receptores TNFR1/2 (*TNF Receptor 1/2*), interações entre FASL e FAS ou ativação de TRAIL. É necessário o recrutamento de proteínas adaptadoras dos receptores de morte FADD (*Fas-associated death domain*) e TRADD (*TNFR1-associated death domain*) para os receptores de morte FAS e TNFR respectivamente. Essas proteínas adaptadoras se associam com a caspase 8 que clivam as caspases executoras 3 e 7, resultando em fragmentação de DNA, degradação de proteínas e formação de corpos apoptóticos (DICKENS et al., 2012). Os receptores de morte podem induzir ou reprimir a morte celular. Por exemplo, proteínas MAP quinase (MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinases*) e fatores

nucleares do complexo NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) podem se ligar ao receptor de morte e reprimir o processo apoptótico.

A apoptose intrínseca converge na ativação das mesmas caspases executoras 3 e 7, entretanto, o processo pode ser iniciado através de estímulos intracelulares, tais como danos no DNA, estresse no processo de replicação e estresse no retículo endoplasmático. A família de proteínas de BCL-2 é modulada por esses estímulos e pode desencadear sinais pró ou anti-apoptóticos. BAX, BAK e BOK são membros pró apoptóticos dessa família e controlam a permeabilização da membrana externa das mitocôndrias que liberam o citocromo *c* no citoplasma, resultando na ativação das caspases 3 e 7 por meio da ligação com o citocromo *c* (LOPEZ; TAIT, 2015; MESSMER; SNYDER; OBERST, 2018).

Os efeitos pró-apoptóticos do sulforafano foram descritos em diversas linhagens celulares derivadas de câncer de cólon (LAN; YUAN; LIN, 2017), próstata (NEGRETTE-GUZMAN et al., 2017), ovário (CHAUDHURI; ORSULIC; ASHOK, 2007), mama (LEWINSKA et al., 2017), bexiga (DANG et al., 2014), pele (RUDOLF; CERVINKA; RUDOLF, 2014) e pulmão (ZURYN et al., 2016). Além disso, o sulforafano é capaz de ativar alvos de ambas as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca. Diversos mecanismos foram propostos para explicar a ação pró-apoptótica do sulforafano, tais como manutenção da proteína *Cyclin Dependent Kinase 1* (CDK1) ativada, regulação positiva de genes pró-apoptóticos, bloqueio da polimerização de tubulina, aumento do estresse oxidativo e sinalização de fatores de transcrição (LENZI; FIMOIGNARI; HRELIA, 2014). A clivagem da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e consequente indução de apoptose foram observadas após o tratamento com 10 μ M de sulforafano em células de colangiocarcinoma humano (RACKAUSKAS et al., 2017).

Caspases 3, 8 e 9 foram ativadas pelo sulforafano em células de câncer de próstata PC-3. Além disso, essas células apresentaram aumento na expressão de genes pró-apoptóticos e diminuição da expressão de fatores anti-apoptóticos (SINGH et al., 2004). Células de câncer de próstata, DU-145 tratadas por 24 horas com 10 μ M de sulforafano apresentaram apoptose induzida e redução da viabilidade celular (CHO et al., 2005). O sulforafano induziu a ativação da caspase 7 em células de câncer de cólon, HCT-116 (PAPPA et al., 2006) e da caspase 3 em células de carcinoma cervical HeLa e células HepG2 (PARK et al., 2007). Ainda, a apoptose induzida pelo sulforafano foi associada com a ativação das caspases 8 e 9 (PARK et al., 2014). Além disso, a atividade pró-apoptótica do sulforafano não depende de *P53*, pois o sulforafano

promoveu apoptose em fibroblastos com *P53 knockdown* e *P53 knockout* (ZHANG; TANG, 2007).

O ciclo celular é controlado pelas enzimas quinases dependentes de ciclina (CDKs), cuja principal função é garantir a replicação do DNA e a segregação dos cromossomos. As atividades de diferentes CDKs se alteram ao longo do ciclo celular, além de serem influenciadas por outros cofatores, por exemplo as ciclinas e inibidores de CDKs (BENDRIS; LEMMERS; BLANCHARD, 2015). Uma das características fundamentais da tumorigênese é a perda do controle sob o ciclo celular. A desregulação do ciclo celular tem por consequência proliferação celular aberrante e instabilidade genômica. Vários tipos de câncer são capazes de suprimir genes que codificam inibidores de CDKs. Esse mecanismo tira da célula a capacidade de combater a progressão celular, pois há a perda dos *checkpoints* do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Compostos capazes de influenciar a sinalização das CDKs e dos inibidores de CDKs surgiram como uma terapia celular promissora contra o câncer, havendo uma grande expansão da pesquisa e formulação de novos fármacos nessa área (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016; INGHAM; SCHWARTZ, 2017).

Diversos estudos demonstraram que o sulforafano pode induzir parada do ciclo celular em vários tipos de câncer (KIM et al., 2016; LEWINSKA et al., 2017; NAUMANN et al., 2017). Foi observado que o sulforafano pode induzir parada do ciclo celular em todas as fases do ciclo, por exemplo em G₀/G₁ em linhagens celulares de câncer de cólon (SHEN et al., 2006), G₁/S em hepatocarcinoma (WU, J. et al., 2016) e G₂/M em câncer cervical (CHENG; TSAI; HSU, 2016), sendo a parada do ciclo em G₂/M a mais frequentemente induzida (CHANG et al., 2013). O sulforafano ativa a expressão da proteína CDKN1A e modula a atividade das CDKs (KIM et al., 2010). Além disso, o sulforafano pode induzir parada do ciclo celular interferindo na polimerização dos microtúbulos (YIN et al., 2016).

1.6 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS INDUZIDAS PELO SULFORAFANO

A capacidade de modificar as marcas epigenéticas é de grande importância no desenvolvimento e progressão do câncer. Células cancerosas tendem a apresentar alterações epigenéticas críticas tais como perda global da metilação do DNA, desregulação de modificações das histonas e expressão de oncogenes induzida por miRNAs (HUANG et al., 2018).

Modificações covalentes nas histonas dos nucleossomos desempenham importante função na estrutura da cromatina. A acetilação de histonas causa mudança na carga da lisina de positiva para neutra (Figura 3); essa reação é catalisada pelas enzimas histona acetiltransferases (HAT). A alteração na carga reduz a afinidade do DNA com as histonas, diminuindo o nível de condensação da cromatina e por consequência, aumentando a expressão gênica. Durante o processo reverso de desacetilação das histonas, os grupos acetil são removidos dos resíduos de lisina por meio da ação das enzimas histona desacetilases (HDAC). A remoção dos grupos acetil aumenta as interações iônicas entre as histonas e o DNA, condensando a cromatina e inativando a maquinaria transcricional (YANG et al., 2007). O aumento da atividade e expressão de HDACs foi demonstrada em diversos tipos de câncer e é um mecanismo bem estabelecido de inativação de genes supressores tumorais, por exemplo *P21*, *P16*, *TP53* e *RAR β* (FENG et al., 2013).

Figura 3 – Acetilação e desacetilação de histonas

Os resíduos de lisina (Lis) nas caudas terminais das histonas são alvos do mecanismo epigenético de acetilação catalisado pelas enzimas histonas acetiltransferases. Os grupos acetil inibem o estado de compactação dos nucleossomos e consequentemente ativam a transcrição gênica. A ação das enzimas histonas desacetilases é retirar os grupos acetil dos resíduos de lisina nas histonas e inibir a transcrição gênica. Fonte: Patrick W. S. Santos (2018).

O sulforafano pode afetar a expressão de genes que regulam o ciclo celular e a apoptose por mecanismos epigenéticos, sendo um desses mecanismos, a inibição das enzimas HDACs. O sulforafano e seus metabólitos são competidores inibitórios e possuem afinidade pelo sítio ativo das enzimas HDACs (NIAN et al., 2009). Em células HCT116 de câncer colorretal humano, o sulforafano reduziu atividade de HDACs, aumentou os níveis de acetilação das histonas H3, H4 e a atividade de P21 (DICKINSON et al., 2015). O efeito quimiopreventivo do sulforafano pode estar associado com inibição da atividade das enzimas HDACs e consequentemente induzindo parada do ciclo celular e reduzindo o crescimento tumoral. Esse efeito foi observado em células de câncer de pulmão (JIANG et al., 2016) e bexiga (ABBAOUI et al., 2017). A influência do sulforafano por meio da inibição das HDAC pode reduzir a atividade da enzima TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) que é essencial para a proliferação. O sulforafano reduziu a atividade dessa enzima e consequentemente inibiu a viabilidade celular e induziu apoptose em células de câncer de próstata (ABBAS et al., 2016) e colorretal (MARTIN; KALA; TOLLEFSBOL, 2018).

O padrão de metilação do DNA sofre alterações durante o início e progressão oncogênica. Essas alterações são caracterizadas pela hipometilação global, ou seja, ativação geral da expressão gênica, e pela hipermetilação gene-específica que inativa a expressão do gene. A hipometilação do DNA está diretamente relacionada com a instabilidade genômica e a expressão de oncogenes. A hipermetilação do DNA está envolvida no silenciamento de genes supressores tumorais, fatores de transcrição e genes envolvidos com a regulação do ciclo celular (PORTELA; ESTELLER, 2010; BAYLIN; JONES, 2011). A metilação do DNA é catalisada pela família de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que são responsáveis pela transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o DNA. A DNMT1 é a enzima responsável pela manutenção da metilação do DNA durante o processo de replicação celular, enquanto a DNMT3a e DNMT3b catalisam a metilação *de novo* nas duas fitas do DNA (TABY; ISSA, 2010). As enzimas DNMTs foram encontradas superexpressas em câncer gástrico, de pulmão e de próstata (TORTORELLA, Stephanie M. et al., 2015).

É crescente o número de evidências de que o sulforafano é um potencial modulador da metilação do DNA no desenvolvimento e progressão do câncer. O primeiro estudo que relacionou o efeito do sulforafano com a inibição das enzimas DNMTs foi realizado por Meeran et al. (2010). Nesse estudo com células de câncer de mama, o sulforafano inibiu a expressão do gene *TERT*, responsável pela codificação da enzima telomerase transcriptase reversa. A capacidade do sulforafano de reduzir a expressão de DNMT1 e DNMT3a foi observada em

células de câncer de próstata BPH-1 (HSU et al., 2011). Um estudo envolvendo avaliação do transcriptoma de células não tumorais e de câncer de próstata, demonstrou que antes do tratamento com sulforafano, as células cancerosas apresentavam alto nível de expressão de DNMTs, entretanto, após o tratamento houve drástica redução da expressão dessas enzimas (WONG et al., 2014). A alteração da metilação do DNA induzida pelo sulforafano aumentou a expressão de P21 e ativou uma série de genes silenciados em células de câncer de mama após exposição a 10 μ M de sulforafano (LUBECKA-PIETRUSZEWSKA et al., 2015). A redução da expressão da enzima TERT e o aumento da atividade de *CDKN1A* foram induzidos pelo sulforafano por mecanismos diferentes, ou seja, pela inibição de HDACs e redução da atividade de DNMTs, sugerindo o efeito do sulforafano em diferentes mecanismos epigenéticos.

1.7 IMPORTÂNCIA DO USO DE METODOLOGIAS *IN VITRO*

Modelos pré-clínicos, como o uso de linhagens celulares *in vitro*, podem ser particularmente úteis para ajudar a prever a resposta anticâncer de novos compostos e fornecer informações relevantes sobre os mecanismos de ação desses compostos (NIU; WANG, 2015). O número de estudos *in vitro* que avaliaram fármacos e compostos com potencial anticâncer é muito maior que o número de estudos *in vivo*. Testes de carcinogênese em animais consomem tempo, são extremamente caros e usam um grande número de animais dependendo do delineamento experimental (STEINBERG, 2017). A pesquisa *in vitro* tem melhor custo-benefício e os experimentos não são invasivos, além disso é possível testar uma série de compostos ao mesmo tempo usando modelos *in vitro* (MARKOWITZ; ZHU, 2012).

Uma característica desejável de qualquer fármaco ou composto antitumoral é que ele seja capaz de inibir o crescimento do tumor por meio da indução da morte celular ou bloqueio da proliferação celular sem que haja muito prejuízo para as células saudáveis (EASTMAN, 2017). Por isso, torna-se essencial a comparação dos efeitos de um possível fármaco em linhagens tumorais e não-tumorais. Além disso, a identificação dos mecanismos que levam a morte celular devem ser cuidadosamente investigados, o que é uma tarefa extremamente difícil quando feita *in vitro*, muito pouco compreendida e, equivocadamente, avaliada e determinada por muitos estudos (GALLUZZI et al., 2015).

A linhagem HepG2, de carcinoma hepatocelular humano, é um interessante modelo experimental para estudos *in vitro*, pois expressa a maioria das enzimas metabolizadoras. Essa linhagem celular retém a atividade de várias enzimas de fase I e fase II, as quais desempenham um papel crucial na ativação e detoxificação de pró-carcinógenos genotóxicos, refletindo,

assim, o metabolismo de tais compostos *in vitro* melhor do que os modelos experimentais com células metabolicamente incompetentes (KNASMULLER et al., 1998; QIU et al., 2015). Por outro lado, é desejável a utilização de uma célula não-tumoral com características semelhantes. Neste caso, as células primárias gástricas GAS, trata-se de um *pool* de células da mucosa gástrica *in vitro*. Essas células, que venceram a senescência, ainda mantiveram as características fisiológicas normais da mucosa gástrica. Na análise citogenética, essa linhagem não apresentou alterações cromossômicas clonais estruturais (PINTO et al., 2005).

1.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E METILAÇÃO EM LARGA ESCALA

Durante muito tempo, a pesquisa sobre o câncer esteve focada na identificação de genes-alvo usando técnicas citogenéticas e de baixa amplitude do genoma. Após decodificar a sequência do genoma humano em 2001 (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001), as tecnologias baseadas em hibridação se tornaram populares no campo de pesquisa do câncer (COSTA et al., 2013). Vários esforços de projetos sobre o genoma do câncer em larga escala, como o Atlas do Genoma do Câncer e outras instituições, geraram uma quantidade notável de dados genômicos. Diversos novos métodos foram desenvolvidos nos últimos anos para identificar mutações, deleções, inserções, rearranjos estruturais no DNA e mudanças de expressão gênica (GAO et al., 2014). Na última década, o sequenciamento de próxima geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) forneceu informações importantes para entender a base biológica de vários tipos de câncer, além de impulsionar a descoberta de novos biomarcadores genômicos, orientar terapias direcionadas e saber mais sobre a resposta e resistência de fármacos (BERGER; MARDIS, 2018).

O uso da tecnologia de NGS para caracterizar cânceres humanos vem proporcionando oportunidades de entender as diferenças biológicas entre os vários tipos de câncer, além de descobrir biomarcadores genômicos e alvos para novas terapias (BERGER; MARDIS, 2018). Alterações transcricionais nos mRNAs e RNAs não-codificantes detectados por sequenciamento de RNA de alto rendimento (RNA-Seq) podem identificar biomarcadores no transcriptoma do câncer, além de verificar o impacto de mutações e caracterizar mecanismos patogênicos (COSTA et al., 2013; LI; FU; XIAO, 2015; LIN et al., 2016). Uma abordagem simplificada para o perfil do transcriptoma baseia-se na hibridação de sondas (por exemplo, *microarray*), mas o RNA-Seq tem muitas vantagens em relação a estas técnicas pois não depende do desenho específico de sondas (ZHAO et al., 2014). Diversos estudos compararam

a performance do RNA-Seq e do *microarray* (SIRBU et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Os resultados do RNA-Seq mostraram mais sensibilidade e maior cobertura para estimar mudanças no transcriptoma em comparação com a técnica do *microarray* (FU et al., 2009).

A implementação de tecnologias de NGS para análises epigenômicas globais e integração com dados transcriptômicos tem um grande potencial para a compreensão da tumorigênese e identificação de biomarcadores epigenéticos (VALDES-MORA; CLARK, 2015). O sequenciamento total do genoma (WGBS – *Whole Genome Bisulfite Sequencing*) é considerado agora o padrão ouro para a análise de metilação do DNA. Essa tecnologia é capaz de quantificar os padrões de metilação do DNA no genoma em uma acurada resolução de base única. No entanto, uma outra tecnologia de sequenciamento com representação reduzida (RRBS – *Reduced Representation Bisulfite Sequencing*) tornou-se popular devido à relação custo-benefício e alta cobertura de CpGs no genoma (BOCK et al., 2010; HAHN et al., 2015). O RRBS apesar de ser capaz de cobrir a maioria dos dinucleotídeos das ilhas CpGs e regiões promotoras, não abrange de maneira eficaz as outras regiões genômicas, além disso essa técnica depende da densidade de locais de clivagem da enzima *MspI* (CCGG) disponíveis, consequentemente, o RRBS é capaz de mensurar apenas de 10 a 15% dos dinucleotídeos do genoma humano (BOCK et al., 2010; HARRIS et al., 2010).

A tecnologia de NGS continua redefinindo o cenário dos testes genéticos. O sequenciamento paralelo de larga escala gera uma quantidade impressionante de dados. Computadores poderosos e ferramentas de bioinformática são necessários para enfrentar o desafio do armazenamento, análise e interpretação dos dados (OLIVER; HART; KLEE, 2015). De acordo com Moorthie e Mattocks (2011), a análise e interpretação de dados para NGS podem ser divididas em três etapas lógicas. O primeiro passo é o sequenciamento das bibliotecas; o segundo passo é o alinhamento das amostras ao genoma de referência e o terceiro passo é a fase de interpretação, onde os dados das leituras recebem anotações. Os termos ontogenéticos (GO – *gene ontology*) foram criados para permitir a interpretação funcional dos dados experimentais comparando-os com as anotações registradas (MOONEY; WILMOT, 2015). Vários bancos de dados estão disponíveis gratuitamente e oferecem informações biologicamente relevantes para análise de conjunto de genes, sendo alguns deles o *Gene Ontology Consortium* (GOC) (GENE ONTOLOGY, 2010), Enciclopédia de genes e genomas de Quioto (KEGG) (KANEHISA; GOTO, 2000), Reactome (CROFT et al., 2014) e WikiPathways (BOHLER et al., 2016). O fluxo de trabalho resumido da cultura e tratamento de células para as análises de sequenciamento e bioinformática são apresentados na Figura 4.

Figura 4 – Resumo dos passos básicos em técnicas de sequenciamento de alto rendimento usando modelos *in vitro*

Fonte: Patrick W. S. Santos (2018).

As evidências científicas sobre a influência de compostos da dieta em eventos epigenéticos são recentes. Conforme demonstrado nos trabalhos aqui revistos, fatores ambientais podem induzir a hipometilação global do DNA ou hipermetilação gene-específica. O sulforafano foi recentemente reconhecido como regulador das enzimas envolvidas no processo de acetilação das histonas, principalmente na inibição da enzima histona desacetilase (VAHID et al., 2015). Entretanto, ainda há poucas informações na literatura sobre a participação do sulforafano nos mecanismos de metilação do DNA. Alguns estudos sugerem um possível envolvimento do sulforafano na metilação do DNA, por meio da inibição das enzimas DNA metiltransferases (LUBECKA-PIETRUSZEWSKA et al., 2015; WONG et al., 2014).

2. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados destacam os efeitos do sulforafano no perfil de expressão das linhagens HepG2 e GAS e ajudam a elucidar os mecanismos pelos quais o sulforafano exerce atividade anticâncer, influenciando várias características críticas do desenvolvimento tumoral como proliferação celular, apoptose, parada do ciclo celular e indução de danos no DNA nessas linhagens. Os resultados apresentados sugerem que a inibição de enzimas reguladoras da condensação da cromatina e silenciamento de *motifs* de fatores de transcrição, por meio de hipermetilação do DNA, sejam mecanismos fundamentais da influência do sulforafano e estão associados aos efeitos anticâncer desse composto.

REFERÊNCIAS¹

ABBAOUI, B. et al. Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Bladder Cancer Prevention. **Mol Nutr Food Res**, Weinheim, v. 62, n. 18, p. e1800079, Sep, 2018.

ABBAOUI, B. et al. The impact of cruciferous vegetable isothiocyanates on histone acetylation and histone phosphorylation in bladder cancer. **J Proteomics**, Amsterdam, v. 156, n. p. 94-103, Mar, 2017.

ABBAS, A. et al. Sulforaphane modulates telomerase activity via epigenetic regulation in prostate cancer cell lines. **Biochem Cell Biol**, Moscow, v. 94, n. 1, p. 71-81, Feb, 2016.

ABDULL RAZIS, A. F.; KONSUE, N.; IOANNIDES, C. Isothiocyanates and Xenobiotic Detoxification. **Mol Nutr Food Res**, Weinheim, v. 62, n. 18, p. e1700916, Sep, 2018.

AISSA, A. F. et al. Methionine concentration in the diet has a tissue-specific effect on chromosomal stability in female mice. **Food Chem Toxicol**, Oxford, v. 62, n. p. 456-62, Dec, 2013.

AISSA, A. F. et al. Effect of methionine-deficient and methionine-supplemented diets on the hepatic one-carbon and lipid metabolism in mice. **Mol Nutr Food Res**, Weinheim, v. 58, n. 7, p. 1502-12, Jul, 2014.

ALUMKAL, J. J. et al. A phase II study of sulforaphane-rich broccoli sprout extracts in men with recurrent prostate cancer. **Invest New Drugs**, Boston, v. 33, n. 2, p. 480-9, Apr, 2015.

BAENA RUIZ, R.; SALINAS HERNANDEZ, P. Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. **Maturitas**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 202-8, Mar, 2014.

BAILEY, L. B. et al. Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. **J Nutr**, v. 145, n. 7, p. 1636S-1680S, Jul, 2015.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

BAO, Y. et al. Benefits and risks of the hormetic effects of dietary isothiocyanates on cancer prevention. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114764, 2014.

BARRERA, L. N. et al. Colorectal cancer cells Caco-2 and HCT116 resist epigenetic effects of isothiocyanates and selenium in vitro. **Eur J Nutr**, Darmstadt, v. 52, n. 4, p. 1327-41, Jun, 2013.

BAYAT MOKHTARI, R. et al. The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review. **J Cell Commun Signal**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 91-101, Mar, 2018.

BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nat Rev Cancer**, London, v. 11, n. 10, p. 726-34, Sep, 2011.

BENDRIS, N.; LEMMERS, B.; BLANCHARD, J. M. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 14, n. 12, p. 1786-98, 2015.

BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. **Dev Cell**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 698-711, Nov, 2010.

BERGER, M. F.; MARDIS, E. R. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. **Nat Rev Clin Oncol**, London, v. 15, n. 6, p. 353-365, Jun, 2018.

BERGMAN, Y.; CEDAR, H. DNA methylation dynamics in health and disease. **Nat Struct Mol Biol**, New York, v. 20, n. 3, p. 274-81, Mar, 2013.

BISHOP, K. S.; FERGUSON, L. R. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 2, p. 922-47, Jan, 2015.

BLACKBURN, H. L. et al. Role of cytochrome P450 genes in breast cancer etiology and treatment: effects on estrogen biosynthesis, metabolism, and response to endocrine therapy. **Cancer Causes Control**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 319-32, Mar, 2015.

BOCK, C. et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. **Nat Biotechnol**, New York, v. 28, n. 10, p. 1106-14, Oct, 2010.

BOHLER, A. et al. Reactome from a WikiPathways Perspective. **PLoS Comput Biol**, San Francisco, v. 12, n. 5, p. e1004941, May, 2016.

BRAICU, C. et al. Nutrigenomics in cancer: Revisiting the effects of natural compounds. **Semin Cancer Biol**, London, v. 46, n. p. 84-106, Oct, 2017.

BROOKS, J. D.; PATON, V. G.; VIDANES, G. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Philadelphia, v. 10, n. 9, p. 949-54, Sep, 2001.

BROWN, R. H. et al. Sulforaphane improves the bronchoprotective response in asthmatics through Nrf2-mediated gene pathways. **Respir Res**, London, v. 16, n. p. 106, Sep 15, 2015.

BUDNOWSKI, J. et al. Glucosinolates Are Mainly Absorbed Intact in Germfree and Human Microbiota-Associated Mice. **J Agric Food Chem**, Washington, v. 63, n. 38, p. 8418-8428, Sep, 2015.

BURNETT, J. P. et al. Sulforaphane enhances the anticancer activity of taxanes against triple negative breast cancer by killing cancer stem cells. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 394, n. p. 52-64, May, 2017.

CHANG, C. C. et al. Sulforaphane induced cell cycle arrest in the G2/M phase via the blockade of cyclin B1/CDC2 in human ovarian cancer cells. **J Ovarian Res**, London, v. 6, n. 1, p. 41, Jun, 2013.

CHAUDHURI, D.; ORSULIC, S.; ASHOK, B. T. Antiproliferative activity of sulforaphane in Akt-overexpressing ovarian cancer cells. **Mol Cancer Ther**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 334-45, Jan, 2007.

CHENG, Y. M.; TSAI, C. C.; HSU, Y. C. Sulforaphane, a Dietary Isothiocyanate, Induces G(2)/M Arrest in Cervical Cancer Cells through CyclinB1 Downregulation and GADD45beta/CDC2 Association. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 9, p. Sep 12, 2016.

CHEUNG, K. L.; KONG, A. N. Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. **AAPS J**, Arlington, v. 12, n. 1, p. 87-97, Mar, 2010.

CHO, S. D. et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU145 prostate cancer cells. **Nutr Cancer**, Philadelphia, v. 52, n. 2, p. 213-24, 2005.

CLARKE, J. D.; DASHWOOD, R. H.; HO, E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 269, n. 2, p. 291-304, Oct, 2008.

COSTA, V. et al. RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. **Eur J Hum Genet**, Basel, v. 21, n. 2, p. 134-42, Feb, 2013.

CROFT, D. et al. The Reactome pathway knowledgebase. **Nucleic Acids Res**, London, v. 42, n. Database issue, p. D472-7, Jan, 2014.

DANG, Y. M. et al. Sulforaphane inhibits the proliferation of the BIU87 bladder cancer cell line via IGFBP-3 elevation. **Asian Pac J Cancer Prev**, Bangkok, v. 15, n. 4, p. 1517-20, 2014.

DAVIDSON, R. et al. Isothiocyanates are detected in human synovial fluid following broccoli consumption and can affect the tissues of the knee joint. **Sci Rep**, London, v. 7, n. 1, p. 3398, Jun, 2017.

DICKENS, L. S. et al. The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. **Exp Cell Res**, Orlando, v. 318, n. 11, p. 1269-77, Jul, 2012.

DICKINSON, S. E. et al. The effect of sulforaphane on histone deacetylase activity in keratinocytes: Differences between in vitro and in vivo analyses. **Mol Carcinog**, Hoboken, v. 54, n. 11, p. 1513-20, Nov, 2015.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. et al. KEAP1 and done? Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane. **Trends Food Sci Techno**, Cambridge, v. 69, n. p. 257-269, Nov, 2017.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. et al. Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 240, n. 2, p. 243-52, Aug, 2006.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V.; CANNING, P. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 617, n. p. 84-93, Mar, 2017.

DOR, Y.; CEDAR, H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. **The Lancet**, London, v. 392, n. 10149, p. 777-786, 2018.

EASTMAN, A. Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 5, p. 8854-8866, Jan, 2017.

EDWARDS, J. R. et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. **Epigenetics Chromatin**, London, v. 10, n. p. 23, 2017.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, Thousand Oaks, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun, 2007.

FAHEY, J. W. et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 99, n. 11, p. 7610-5, May, 2002.

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, Georgetown, v. 6, n. 7, p. 791-797, Jul, 2011.

FENECH, M.; BONASSI, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 43-9, Jan, 2011.

FENG, D. et al. Targeting of histone deacetylases to reactivate tumour suppressor genes and its therapeutic potential in a human cervical cancer xenograft model. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80657, 2013.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, New York, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar, 2015.

FIMOGNARI, C. et al. Antileukemic activity of sulforaphane in primary blasts from patients affected by myelo- and lympho-proliferative disorders and in hypoxic conditions. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e101991, 2014.

FORMAN, H. J.; DAVIES, K. J.; URSINI, F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 66, n. p. 24-35, Jan, 2014.

FOURQUET, S. et al. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 285, n. 11, p. 8463-71, Mar, 2010.

FU, X. et al. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. p. 161, Apr, 2009.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death Differ**, London, v. 22, n. 1, p. 58-73, Jan, 2015.

GAO, J. et al. Collection, integration and analysis of cancer genomic profiles: from data to insight. **Curr Opin Genet Dev**, London, v. 24, n. p. 92-8, Feb, 2014.

GASPER, A. V. et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 82, n. 6, p. 1283-91, Dec, 2005.

GENE ONTOLOGY, C. The Gene Ontology in 2010: extensions and refinements. **Nucleic Acids Res**, London, v. 38, n. Database issue, p. D331-5, Jan, 2010.

GIAMBANELLI, E. et al. The kinetic of key phytochemical compounds of non-heading and heading leafy Brassica oleracea landraces as affected by traditional cooking methods. **J Sci Food Agric**, Chichester, v. 96, n. 14, p. 4772-4784, Nov, 2016.

GRUNDEMANN, C.; HUBER, R. Chemoprevention with isothiocyanates - From bench to bedside. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 414, n. p. 26-33, Feb, 2018.

GUENGERICH, F. P.; WATERMAN, M. R.; EGLI, M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. **Trends Pharmacol Sci**, Barking, v. 37, n. 8, p. 625-640, Aug, 2016.

HAHN, M. A. et al. Single base resolution analysis of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by RRBS and TAB-RRBS. **Methods Mol Biol**, Totowa, v. 1238, n. p. 273-87, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar, 2011.

HARDY, T. M.; TOLLEFSBOL, T. O. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. **Epigenomics**, v. 3, n. 4, p. 503-18, Aug, 2011.

HARRIS, R. A. et al. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. **Nat Biotechnol**, New York, v. 28, n. 10, p. 1097-105, Oct, 2010.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, Taipei, v. 4, n. 4, p. 127-129, Dec, 2017.

HOLMES, M. V.; PULIT, S. L.; LINDGREN, C. M. Genetic and epigenetic studies of adiposity and cardiometabolic disease. **Genome Med**, London, v. 9, n. 1, p. 82, Sep, 2017.

HSU, A. et al. Promoter de-methylation of cyclin D2 by sulforaphane in prostate cancer cells. **Clin Epigenetics**, Berlin, v. 3, n. p. 3, 2011.

HUANG, D. et al. An overview of epigenetic agents and natural nutrition products targeting DNA methyltransferase, histone deacetylases and microRNAs. **Food Chem Toxicol**, Oxford, v. n. p. Nov 5, 2018.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas de Incidência de Câncer. v. 1, n. p. 130, 2018.

INGHAM, M.; SCHWARTZ, G. K. Cell-Cycle Therapeutics Come of Age. **J Clin Oncol**, New York, v. 35, n. 25, p. 2949-2959, Sep, 2017.

JANSSENS, J. P.; SCHUSTER, K.; VOSS, A. Preventive, predictive, and personalized medicine for effective and affordable cancer care. **EPMA J**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 113-123, Jun, 2018.

JL, Y.; MORRIS, M. E. Determination of phenethyl isothiocyanate in human plasma and urine by ammonia derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Biochem**, San Diego, v. 323, n. 1, p. 39-47, Dec, 2003.

JIANG, L. L. et al. Sulforaphane suppresses in vitro and in vivo lung tumorigenesis through downregulation of HDAC activity. **Biomed Pharmacother**, Paris, v. 78, n. p. 74-80, Mar, 2016.

JIANG, Z. Q. et al. Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. **Life Sci**, Oxford, v. 72, n. 20, p. 2243-53, Apr, 2003.

KALPANA DEEPA PRIYA, D.; GAYATHRI, R.; SAKTHISEKARAN, D. Role of sulforaphane in the anti-initiating mechanism of lung carcinogenesis in vivo by modulating the metabolic activation and detoxification of benzo(a)pyrene. **Biomed Pharmacother**, Paris, v. 65, n. 1, p. 9-16, Feb, 2011.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Res**, London, v. 28, n. 1, p. 27-30, Jan, 2000.

KAPPIL, M.; WRIGHT, R. O.; SANDERS, A. P. Developmental Origins of Common Disease: Epigenetic Contributions to Obesity. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, Palo Alto, v. 17, n. p. 177-92, Aug, 2016.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Palo Alto, v. 47, n. p. 89-116, 2007.

KIM, B. G. et al. Sulforaphane, a natural component of broccoli, inhibits vestibular schwannoma growth in vitro and in vivo. **Sci Rep**, London, v. 6, n. p. 36215, Nov, 2016.

KIM, J. H. et al. Sulforaphane Increases Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, p21 Protein in Human Oral Carcinoma Cells and Nude Mouse Animal Model to Induce G(2)/M Cell Cycle Arrest. **J Clin Biochem Nutr**, Mitake, v. 46, n. 1, p. 60-7, Jan, 2010.

KIM, S. et al. Keap1 cysteine 288 as a potential target for diallyl trisulfide-induced Nrf2 activation. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e85984-e85984, 2014.

KIM, Y. J. et al. Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Anti-Lipogenic/Adipogenic Effects of Allyl-Isothiocyanate Metabolites. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. e0132151, 2015.

KNASMULLER, S. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 402, n. 1-2, p. 185-202, Jun, 1998.

KUBO, E. et al. Sulforaphane reactivates cellular antioxidant defense by inducing Nrf2/ARE/Prdx6 activity during aging and oxidative stress. **Sci Rep**, London, v. 7, n. 1, p. e14130, Oct, 2017.

LABBE, D. P. et al. Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link. **Oncogene**, Basingstoke, v. 34, n. 36, p. 4683-91, Sep, 2015.

LAN, H.; YUAN, H.; LIN, C. Sulforaphane induces p53deficient SW480 cell apoptosis via the ROSMAPK signaling pathway. **Mol Med Rep**, Athens, v. 16, n. 5, p. 7796-7804, Nov, 2017.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, Basingstoke, v. 409, n. 6822, p. 860-921, Feb, 2001.

LENZI, M.; FIMOIGNARI, C.; HRELIA, P. Sulforaphane as a Promising Molecule for Fighting Cancer. v. 159, n. p. 207-223, 2014.

LEONE, A. et al. Sulforaphane for the chemoprevention of bladder cancer: molecular mechanism targeted approach. **Oncotarget**, v. 8, n. 21, p. 35412-35424, May 23, 2017.

LEWINSKA, A. et al. Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells. **Theranostics**, v. 7, n. 14, p. 3461-3477, 2017.

LI, M. H.; FU, S. B.; XIAO, H. S. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in cancer. **Acta Pharmacol Sin**, China, v. 36, n. 10, p. 1200-11, Oct, 2015.

LIN, K. T. et al. Identification of latent biomarkers in hepatocellular carcinoma by ultra-deep whole-transcriptome sequencing. **Oncogene**, Basingstoke, v. 35, n. 38, p. 5078, Sep, 2016.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **Br J Cancer**, London, v. 112, n. 6, p. 957-62, Mar, 2015.

LOZANOVSKI, V. J. et al. Pilot study evaluating broccoli sprouts in advanced pancreatic cancer (POUDER trial) - study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, London, v. 15, n. p. 204, Jun, 2014.

LUBECKA-PIETRUSZEWSKA, K. et al. Sulforaphane Alone and in Combination with Clofarabine Epigenetically Regulates the Expression of DNA Methylation-Silenced Tumour Suppressor Genes in Human Breast Cancer Cells. **J Nutrigenet Nutrigenomics**, Basel, v. 8, n. 2, p. 91-101, 2015.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, London, v. 9, n. 3, p. 153-66, Mar, 2009.

MARKOWITZ, J. S.; ZHU, H. J. Limitations of in vitro assessments of the drug interaction potential of botanical supplements. **Planta Med**, Stuttgart, v. 78, n. 13, p. 1421-7, Sep, 2012.

MARTIN, S. L.; KALA, R.; TOLLEFSBOL, T. O. Mechanisms for the Inhibition of Colon Cancer Cells by Sulforaphane through Epigenetic Modulation of MicroRNA-21 and Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Down-regulation. **Curr Cancer Drug Targets**, Hilversum, v. 18, n. 1, p. 97-106, 2018.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Res Rev**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 1-7, Jan, 2008.

MAYNE, S. T.; PLAYDON, M. C.; ROCK, C. L. Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. **Nat Rev Clin Oncol**, London, v. 13, n. 8, p. 504-15, Aug, 2016.

MCGUIRE, S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. **Adv Nutr**, Rockville, v. 7, n. 2, p. 418-9, Mar, 2016.

MEERAN, S. M. et al. Bioactive dietary supplements reactivate ER expression in ER-negative breast cancer cells by active chromatin modifications. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e37748, 2012.

MEERAN, S. M.; PATEL, S. N.; TOLLEFSBOL, T. O. Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11457, Jul 6, 2010.

MESSMER, M. N.; SNYDER, A. G.; OBERST, A. Comparing the effects of different cell death programs in tumor progression and immunotherapy. **Cell Death Differ**, London, v. n. p. Oct, 2018.

MIKESKA, T.; CRAIG, J. M. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. **Genes (Basel)**, Basel, v. 5, n. 3, p. 821-64, Sep, 2014.

MILCZAREK, M. et al. Autophagic cell death and premature senescence: New mechanism of 5-fluorouracil and sulforaphane synergistic anticancer effect in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell line. **Food Chem Toxicol**, Oxford, v. 111, n. p. 1-8, Jan, 2018.

MILLAN, M. J. The epigenetic dimension of Alzheimer's disease: causal, consequence, or curiosity? **Dialogues Clin Neurosci**, Neuilly-sur-Seine, v. 16, n. 3, p. 373-93, Sep, 2014.

MITHEN, R. F. et al. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. **J Sci Food Agric**, Chichester, v. 80, n. 7, p. 967-984, 2000.

MOONEY, M. A.; WILMOT, B. Gene set analysis: A step-by-step guide. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, Hoboken, v. 168, n. 7, p. 517-27, Oct, 2015.

MOORTHIE, S.; MATTOCKS, C. J.; WRIGHT, C. F. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. **Hugo J**, Dordrecht, v. 5, n. 1-4, p. 1-12, Dec, 2011.

NAUMANN, P. et al. Sulforaphane enhances irradiation effects in terms of perturbed cell cycle progression and increased DNA damage in pancreatic cancer cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. e0180940, 2017.

NEGRETTE-GUZMAN, M. et al. Sulforaphane induces differential modulation of mitochondrial biogenesis and dynamics in normal cells and tumor cells. **Food Chem Toxicol**, Oxford, v. 100, n. p. 90-102, Feb, 2017.

NIAN, H. et al. Modulation of histone deacetylase activity by dietary isothiocyanates and allyl sulfides: studies with sulforaphane and garlic organosulfur compounds. **Environ Mol Mutagen**, v. 50, n. 3, p. 213-21, Apr, 2009.

NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. **Pharmacogenomics**, London, v. 16, n. 3, p. 273-85, 2015.

NOLTE-T HOEN, E. N. et al. The role of microRNA in nutritional control. **J Intern Med**, Oxford, v. 278, n. 2, p. 99-109, Aug, 2015.

NOVIO, S. et al. Effects of Brassicaceae Isothiocyanates on Prostate Cancer. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 5, p. May, 2016.

OLIVER, G. R.; HART, S. N.; KLEE, E. W. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. **Clin Chem**, Baltimore, v. 61, n. 1, p. 124-35, Jan, 2015.

OLIVIERO, T.; VERKERK, R.; DEKKER, M. Isothiocyanates from Brassica Vegetables- Effects of Processing, Cooking, Mastication, and Digestion. **Mol Nutr Food Res**, Weinheim, v. 62, n. 18, p. e1701069, Sep, 2018.

PAPPA, G. et al. Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 599, n. 1-2, p. 76-87, Jul, 2006.

PARK, H. S. et al. Sulforaphane induces reactive oxygen species-mediated mitotic arrest and subsequent apoptosis in human bladder cancer 5637 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 64, n. p. 157-65, Feb, 2014.

PARK, S. Y. et al. Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. **Oncol Rep**, Athens, v. 18, n. 1, p. 181-7, Jul, 2007.

PENNISI, M. et al. Inflammasomes, hormesis, and antioxidants in neuroinflammation: Role of NRLP3 in Alzheimer disease. **J Neurosci Res**, New York, v. 95, n. 7, p. 1360-1372, Jul, 2017.

PINTO, G. R. et al. Cytogenetic characteristics of patients with signs and symptoms of myelodysplastic syndromes in the State of Para, Brazil. **Genet Mol Res**, Ribeirao Preto, v. 4, n. 1, p. 18-30, Mar, 2005.

PLAETH, A. et al. Hormetic shifting of redox environment by pro-oxidative resveratrol protects cells against stress. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 99, n. p. 608-622, Oct, 2016.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 10, p. 1057-68, Oct, 2010.

POTTER, J. et al. Diet Quality and Cancer Outcomes in Adults: A Systematic Review of Epidemiological Studies. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 17, n. 7, p. Jul, 2016.

QIU, G. H. et al. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. **Cytotechnology**, v. 67, n. 1, p. 1-12, Jan, 2015.

QURESHI, I. A.; MEHLER, M. F. Epigenetic mechanisms underlying the pathogenesis of neurogenetic diseases. **Neurotherapeutics**, Orlando, v. 11, n. 4, p. 708-20, Oct, 2014.

RACKAUSKAS, R. et al. Sulforaphane sensitizes human cholangiocarcinoma to cisplatin via the downregulation of anti-apoptotic proteins. **Oncol Rep**, Athens, v. 37, n. 6, p. 3660-3666, Jun, 2017.

RAINEY, N. et al. Curcumin hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death. **Cell death & disease**, London, v. 6, n. 12, p. e2003-e2003, 2015.

REID, M. A.; DAI, Z.; LOCASALE, J. W. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. **Nat Cell Biol**, London, v. 19, n. 11, p. 1298-1306, Nov, 2017.

REMELY, M. et al. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. **Br J Pharmacol**, London, v. 172, n. 11, p. 2756-68, Jun, 2015.

RUDOLF, K.; CERVINKA, M.; RUDOLF, E. Sulforaphane-induced apoptosis involves p53 and p38 in melanoma cells. **Apoptosis**, London, v. 19, n. 4, p. 734-47, Apr, 2014.

SAPIENZA, C.; ISSA, J. P. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. **Annu Rev Nutr**, Palo Alto, v. 36, n. p. 665-81, Jul, 2016.

SESTILI, P.; FIMOIGNARI, C. Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. **Biomed Res Int**, v. 2015, n. p. 402386, 2015.

SETO, M.; HONMA, K.; NAKAGAWA, M. Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. **Cancer Sci**, Tokyo, v. 101, n. 3, p. 573-8, Mar, 2010.

SHAPIRO, T. A. et al. Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. **Nutr Cancer**, Philadelphia, v. 55, n. 1, p. 53-62, 2006.

SHEN, G. et al. p53-independent G1 cell cycle arrest of human colon carcinoma cells HT-29 by sulforaphane is associated with induction of p21CIP1 and inhibition of expression of cyclin D1. **Cancer Chemother Pharmacol**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 317-27, Feb, 2006.

SINGH, A. V. et al. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. **Carcinogenesis**, New York, v. 25, n. 1, p. 83-90, Jan, 2004.

SIRBU, A. et al. RNA-Seq vs dual- and single-channel microarray data: sensitivity analysis for differential expression and clustering. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50986, 2012.

SKUPINSKA, K. et al. Sulforaphane and its analogues inhibit CYP1A1 and CYP1A2 activity induced by benzo[a]pyrene. **J Biochem Mol Toxicol**, New York, v. 23, n. 1, p. 18-28, Jan, 2009.

STEINBERG, P. In Vitro–In Vivo Carcinogenicity. In: REIFFERSCHIED, G. e BUCHINGER, S. (Ed.). **In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p.81-96. ISBN 978-3-319-45908-0.

STOPPER, H. et al. Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, n. 10, p. 3272-9, Oct, 2008.

STOVER, P. J. et al. Emerging concepts on the role of epigenetics in the relationships between nutrition and health. **J Intern Med**, Oxford, v. 284, n. 1, p. 37-49, Jul, 2018.

STURM, C.; WAGNER, A. E. Brassica-Derived Plant Bioactives as Modulators of Chemopreventive and Inflammatory Signaling Pathways. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 18, n. 9, p. 1890, 2017.

SUPIC, G.; JAGODIC, M.; MAGIC, Z. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. **Nutr Cancer**, Philadelphia, v. 65, n. 6, p. 781-92, 2013.

TABY, R.; ISSA, J. P. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin**, New York, v. 60, n. 6, p. 376-92, Nov, 2010.

TALALAY, P. et al. Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 104, n. 44, p. 17500-5, Oct, 2007.

THUN, M. J. et al. The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, New York, v. 31, n. 1, p. 100-10, Jan, 2010.

TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 19, n. 11, p. Nov, 2018.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, New York, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar, 2015.

TORTORELLA, S. M. et al. Dietary Sulforaphane in Cancer Chemoprevention: The Role of Epigenetic Regulation and HDAC Inhibition. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 22, n. 16, p. 1382-424, Jun, 2015.

TORTORELLA, S. M. et al. Dietary Sulforaphane in Cancer Chemoprevention: The Role of Epigenetic Regulation and HDAC Inhibition. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 16, p. 1382-1424, 2015.

VAHID, F. et al. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A review. **Gene**, v. 562, n. 1, p. 8-15, 2015.

VALDES-MORA, F.; CLARK, S. J. Prostate cancer epigenetic biomarkers: next-generation technologies. **Oncogene**, Basingstoke, v. 34, n. 13, p. 1609-18, Mar, 2015.

VALLE, I.; TRAMALLONI, D.; BRAGAZZI, N. L. Cancer prevention: state of the art and future prospects. **J Prev Med Hyg**, Ospedaletto, v. 56, n. 1, p. E21-7, Jun, 2015.

VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, New York, v. 291, n. 5507, p. 1304-51, Feb, 2001.

VERMA, M. The Role of Epigenomics in the Study of Cancer Biomarkers and in the Development of Diagnostic Tools. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 867, n. p. 59-80, 2015.

VINEIS, P.; WILD, C. P. Global cancer patterns: causes and prevention. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 549-557, 2014.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **J Exp Clin Cancer Res**, Rome, v. 35, n. 1, p. 153, Sep, 2016.

WONG, C. P. et al. Effects of sulforaphane and 3,3'-diindolylmethane on genome-wide promoter methylation in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e86787, 2014.

WU, J. et al. Sulforaphane inhibits TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells via the reactive oxygen species-dependent pathway. **Oncol Rep**, v. 35, n. 5, p. 2977-83, May, 2016.

WU, S. et al. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, Basingstoke, v. 529, n. 7584, p. 43-7, Jan, 2016.

XU, C. et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. **Cancer Res**, Chicago, v. 66, n. 16, p. 8293-6, Aug, 2006.

YANG, H. et al. Dexamethasone-induced protein degradation in cultured myotubes is p300/HAT dependent. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 292, n. 1, p. R337-4, Jan, 2007.

YANG, L.; PALLIYAGURU, D. L.; KENSLER, T. W. Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. **Semin Oncol**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p. 146-153, Feb, 2016.

YIN, T. F. et al. Research progress on chemopreventive effects of phytochemicals on colorectal cancer and their mechanisms. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 22, n. 31, p. 7058-68, Aug, 2016.

YU, J. S. et al. Sulforaphane Suppresses Hepatitis C Virus Replication by Up-Regulating Heme Oxygenase-1 Expression through PI3K/Nrf2 Pathway. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152236, 2016.

ZHANG, W. et al. Comparison of RNA-seq and microarray-based models for clinical endpoint prediction. **Genome Biol**, v. 16, n. p. 133, Jun 25, 2015.

ZHANG, Y. et al. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 91, n. 8, p. 3147-50, Apr, 1994.

ZHANG, Y. et al. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 6, p. 2399-403, Mar 15, 1992.

ZHANG, Y.; TANG, L. Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 9, p. 1343-54, Sep, 2007.

ZHAO, S. et al. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e78644, 2014.

ZITVOGEL, L.; PIETROCOLA, F.; KROEMER, G. Nutrition, inflammation and cancer. **Nat Immunol**, v. 18, n. 8, p. 843-850, Jul 19, 2017.

ZURYN, A. et al. The effect of sulforaphane on the cell cycle, apoptosis and expression of cyclin D1 and p21 in the A549 non-small cell lung cancer cell line. **Int J Oncol**, Athens, v. 48, n. 6, p. 2521-33, Jun, 2016.