

Avaliação toxicogenética do dissulfeto de dialila associado ao agente quimioterápico sorafenibe: investigação de morte celular e expressão de proteínas em células hepáticas humanas *in vitro*

Ana Rita Thomazela Machado

Ribeirão Preto
2022

ANA RITA THOMAZELA MACHADO

Avaliação toxicogenética do dissulfeto de dialila associado ao agente quimioterápico sorafenibe: investigação de morte celular e expressão de proteínas em células hepáticas humanas *in vitro*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Versão corrigida da Tese de Doutorado o apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 6/5/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ana Rita Thomazela Machado
Machado, A.R.T.

Avaliação toxicogenética do dissulfeto de dialila associado ao agente quimioterápico sorafenibe: investigação de morte celular e expressão de proteínas em células hepáticas humanas *in vitro*
Ribeirão Preto: FCFRP, 2022

Número de Páginas: #107#

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

1. câncer de fígado; nutracêutico; *Allium sativum* L.; dano ao DNA; nutrigenômica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Rita Thomazela Machado

Avaliação toxicogenética do dissulfeto de dialila associado ao agente quimioterápico sorafenibe: investigação de morte celular e expressão de proteínas em células hepáticas humanas *in vitro*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Sebastião Carlos Machado** e **Ana Maria Thomazela Machado** por me ensinarem que sonhar é possível, que lutar é essencial e que realizar sonhos é uma das coisas mais gratificantes da vida. É e sempre será para vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes** a oportunidade de tê-la como orientadora de Mestrado e Doutorado. Orgulho-me em citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência. Acreditando no meu trabalho, deu-me a liberdade necessária dividindo comigo as expectativas e frustrações, conduziu-me a maiores reflexões e desta forma enriqueceu-o. A senhora é um exemplo de compreensão e competência. Admiro sua dedicação e amor ao trabalho, a pesquisa com os alunos e orientados. Que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade.

Aos meus amigos **Katiuska Tuttis**, minha dupla, minha parceira e sem a qual eu não finalizaria essa tese. Obrigada por começar e encerrar comigo esse ciclo, por estar ao meu lado nas minhas dificuldades e também nos momentos de alegria e comemoração. Você me ensinou a ser criteriosa, a ser resiliente e que é possível alcançar qualquer objetivo confiando na nossa capacidade e inteligência. Obrigada por tanto! Ao **Patrick Wellington da Silva dos Santos** pela convivência, amizade, auxílio e pré-disposição. Aos meus colegas de laboratório **Diego Luis Ribeiro, Tainá Keiller e Caroline Santos** pela convivência e pela experiência adquirida.

À minha amiga **Camila Alessandra Mini**, companhia de todos os dias, por dividir as angústias e as alegrias desses anos e por poder partilhar a minha vida com você Florzinha.

Às funcionárias do laboratório de Nutrigenômica **Joana D'Arc Castania Darin e Regislaine Valéria Burim**, por me auxiliarem nos experimentos e principalmente pelo convívio e amizade.

Ao **Bruno Henrique Marinheiro**, meu companheiro de jornada e um dos meus maiores incentivadores e crítico. Seu exemplo de perseverança e companheirismo me fez chegar até aqui.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)** e aos seus funcionários pelo auxílio no desenvolvimento do projeto e pela acolhida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa (processo #2019/08348-2) e pelo projeto regular “Efeitos dos nutracêuticos sulforafano, dissulfeto de dialila e vitamina D em linhagens tumorais humanas: Avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade, migração celular, alterações epigenéticas e expressão gênica” (processo #2017/24576-0) pelo apoio financeiro concedido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** (#168759/2018-7 e #302479/2019-8) pelo apoio financeiro concedido.

Normalização Adotada

Este documento foi elaborado de acordo com:

Referências: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR 6023

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentações de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. São Paulo, 2016.

RESUMO

MACHADO, Ana Rita Thomazela. **Avaliação toxicogenética do dissulfeto de dialila associado ao agente quimioterápico sorafenibe: investigação de morte celular e expressão de proteínas em células hepáticas humanas *in vitro***. 2022. 107f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O carcinoma hepatocelular é um dos tipos de cânceres mais comuns em adultos. O sorafenibe (SORA) é o fármaco de escolha, mas muitos pacientes exibem progressão tumoral durante a quimioterapia impulsionando a busca por novos tratamentos. A ocorrência da doença pode ser reduzida e/ou seu desenvolvimento controlado por meio de efeito sinérgico de fármacos tradicionais e compostos bioativos da dieta como o dissulfeto de dialila (DADS), composto organosulfurado do alho que exerce atividade antitumoral. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do DADS isolado e associado ao quimioterápico SORA, sobre a resposta em célula tumoral de carcinoma hepatocelular (HepG2). Foram realizados ensaios de citotoxicidade, morte celular por apoptose e autofagia, migração e invasão celular, genotoxicidade e expressão de genes e proteínas relacionadas à sinalização de morte tumoral por meio de RT-qPCR e *western blot* respectivamente. No tratamento isolado houve uma redução na viabilidade celular a partir de DADS 50 μM e SORA 4 μM . Houve inibição da proliferação celular, aumento da proporção de células apoptóticas, aumento na porcentagem de células em G1/S acompanhado de diminuição na migração e invasão celular em DADS 200 μM e SORA 8 μM . Observamos aumento da razão de células autofágicas e do dano genotóxico em todos os tratamentos testados. Houve alteração na expressão de genes *TNF*, *MMP2*, *FOS* e *CHEK2* e das proteínas BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, LC3 e NRF2. A associação entre os compostos demonstrou efeito sinérgico na atuação do fármaco, por meio da modulação de genes e proteínas correlacionados com parada de ciclo celular (diminuição de *CHEK2*), morte celular por apoptose (diminuição de *FOS* e aumento de BAX) e morte por autofagia (aumento de LC3). Nossos resultados demonstraram que DADS e SORA, em tratamento simultâneo, podem reduzir significativamente a sobrevivência de células HepG2 por diferentes mecanismos moleculares. Considerando o *combination index* do tratamento com SORA, com diferentes concentrações de DADS sobre a morte celular, essa associação pode representar uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento de pacientes com carcinoma hepatocelular em estágios avançados.

Palavras-chave: câncer de fígado; nutracêutico; *Allium sativum* L.; dano ao DNA; nutrigenômica.

ABSTRACT

MACHADO, Ana Rita Thomazela. **Toxicological evaluation of diallyl disulfide associated with the chemotherapeutic agent sorafenib: investigation of cell death and expression of proteins in human liver cells *in vitro***. 2022. 107f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Hepatocellular carcinoma is one of the most common cancers in adults. Sorafenib is the drug of choice, but many patients follow tumor progression during chemotherapy which encourage new treatments. The occurrence or development of the disease can be altered by the synergistic effect of traditional drugs and diet bioactive compounds like diallyl disulfide (DADS), and organosulfur isolated from allium with antitumor effects. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of DADS alone and associated with the chemotherapy SORA in cell viability, apoptosis and autophagy, cell migration and invasion, genotoxicity and expression of genes and proteins related to tumor death signaling in hepatocellular carcinoma tumor cells (HepG2). In the isolated treatment, there was a reduction in cell viability from DADS 50 μM and SORA 4 μM . There was inhibition of cell proliferation, increase in the proportion of apoptotic cells and in the percentage of cells in G1/S followed by a decrease in cell migration and invasion in DADS 200 μM and SORA 8 μM . The ratio of autophagic cells and genotoxic damage increased in all treatments tested. There were alterations in the expression of *TNF*, *MMP2*, *FOS* and *CHEK2* genes and in the BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, LC3 and NRF2 proteins. The DADS and SORA association demonstrated a synergistic effect through the modulation of genes and proteins correlated with cell cycle arrest (decrease in *CHEK2*), apoptosis (decrease in *FOS* and increase in BAX) and autophagy (increase of LC3). Our results demonstrated that this association, in simultaneous treatment, can significantly reduce the survival of HepG2 cells by different molecular mechanisms. Since the combination index of this association between SORA and different concentrations of DADS on cell death, this association may represent a promising and alternative therapeutic option in the development of new clinical protocols for the treatment of patients with advanced stage hepatocellular carcinoma.

Keywords: liver cancer; nutraceutical; *Allium sativum* L.; DNA damage; nutrigenomics.

Lista de figuras

Figura 1. Reações catalíticas enzimáticas da aliína e formação de diferentes compostos organossulfurados do alho. Fonte: Adaptado de CHAISAKUL et al., 2016.	8
Figura 2. Estruturas químicas do (A) sorafenibe e (B) dissulfeto de dialila. Fonte: Sigma Aldrichi, 2021.	14
Figura 3. Protocolos de tratamentos associados.....	16
Figura 4. Imagens de nucleoides capturados com o software CometAssay IV. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP. Captura: Carla da Silva Machado, 2015.....	23
Figura 5. Efeito do dissulfeto de dialila na viabilidade de células HepG2 e HUVEC.	28
Figura 6. Efeito do sorafenibe na viabilidade de células HepG2 e HUVEC.....	29
Figura 7. Efeito do dissulfeto de dialila associado ao sorafenibe em tratamento simultâneo na viabilidade de células HepG2 e HUVEC	31
Figura 8. Efeito do pré-tratamento com dissulfeto de dialila seguido de sorafenibe na viabilidade de células HepG2 e HUVEC.....	32
Figura 9. Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HepG2 após 72 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila.	33
Figura 10. Resultados da viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HepG2 após 72 horas de tratamento com sorafenibe associado ao dissulfeto de dialila	34
Figura 11. Resultados da viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HUVEC após 72 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila.....	35
Figura 12. Resultados da viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HUVEC após 72 horas de tratamento com sorafenibe associado ao dissulfeto de dialila	36
Figura 13. Efeito do dissulfeto de dialila e sorafenibe na inibição da proliferação de células HepG2 e HUVEC.....	37
Figura 14. Efeito do dissulfeto de dialila e sorafenibe em tratamento associado na proliferação de células HepG2 e HUVEC.....	38

Figura 15. Efeito do dissulfeto de dialila isolado e associado ao sorafenibe na indução de apoptose.....	40
Figura 16. Análise da distribuição de células HepG2 entre as fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com sorafenibe e/ou dissulfeto de dialila por citometria de fluxo.....	42
Figura 17. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em HepG2 após 24 horas de tratamento com sorafenibe ou dissulfeto de dialila	43
Figura 18. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em HepG2 após 24 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila	44
Figura 19. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em HUVEC após 24 horas de tratamento com sorafenibe ou dissulfeto de dialila	45
Figura 20. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em HUVEC após 24 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila	46
Figura 21. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila isolado ao sorafenibe na migração de células HepG2.....	47
Figura 22. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila associado ao sorafenibe na migração de células HepG2	48
Figura 23. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila isolado ao sorafenibe na migração de células HUVEC.....	49
Figura 24. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila isolado ao sorafenibe na migração de células HUVEC.....	50
Figura 25. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HepG2 em tratamento isolado.....	51
Figura 26. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HepG2 em tratamento associado	52
Figura 27. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HUVEC em tratamento isolado.....	53
Figura 28. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HUVEC em tratamento associado	54
Figura 29. Análise da produção de espécies reativas em células HepG2 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sorafenibe e dissulfeto de dialila utilizando o marcador CM-H2DCFDA	55

Figura 30. Análise da produção de espécies reativas em células HepG2 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sorafenibe associado ao dissulfeto de dialila utilizando o marcador CM-H2DCFDA	56
Figura 31. Efeito do dissulfeto de dialila e do sorafenibe na indução de danos ao DNA.....	57
Figura 32. Análise da expressão relativa de genes em células HepG2	58
Figura 33. Análise da expressão relativa de genes em células HUVEC	59
Figura 34. Análise de Western blot de células HepG2 após tratamento combinado com dissulfeto de dialila e sorafenibe por 24 horas.....	60
Figura 35. Análise de Western blot de células HUVEC após tratamento combinado com dissulfeto de dialila e sorafenibe por 24 horas.....	61
Figura 36 - Rede de interações preditas entre dissulfeto de dialila, sorafenibe, genes e proteínas analisadas no presente estudo utilizando a base de dados STITCH	62

Lista de tabelas

Tabela 1. Primes utilizados para a análise da expressão gênica por RT-qPCR.	24
Tabela 2. Tabela 2. Anticorpos utilizados para a análise da expressão de proteínas por western blot.....	25
Tabela 3. Valores calculados de IC ₅₀ para dissulfeto de dialila (μM).	28
Tabela 4. Valores calculados de IC ₅₀ para sorafenibe (μM)	30

Lista de abreviaturas e siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCL-2	Linfoma de células B-2
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CI	<i>Combination index</i>
CN	Controle negativo
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CP	Controle positivo
CS	Controle de solvente
DADS	Dissulfeto de dialila
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Especies reativas de oxigênio
EthD-1	Homodímero de etídio
GSH	Glutathiona reduzida
HepG2	Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
HIF-1 α	Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa
HUVEC	Linhagem de células endoteliais da veia umbilical humana
MMP-2	Matriz metaloproteinase-2
MMP-9	Metalopeptidase 9 da matriz
MMS	Metanossulfonato de metila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGRFR- β	Receptor- β do fator de crescimento derivado das plaquetas
Raf	Quinases da família do fibrossarcoma rapidamente acelerado
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SORA	Sorafenibe
TRAIL	Fator de necrose tumoral
VEGFR	Receptores do fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas e siglas	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinoma hepatocelular	1
1.2 Compostos bioativos e terapia combinada.....	4
1.3 Alho e dissulfeto de dialila.....	6
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Agentes químicos e reagentes.....	14
3.1.2 Linhagens celulares e condições de cultivo	15
3.2 Métodos.....	15
3.2.1 Ensaio de viabilidade celular	15
3.2.2 Ensaio de LIVE/DEAD	17
3.2.3 Ensaio de sobrevivência clonogênica	17
3.2.4 Identificação da morte celular por apoptose	18
3.2.5 Modulação do ciclo celular por citometria de fluxo	19
3.2.6 Identificação de morte celular induzida por autofagia	20
3.2.7 Migração celular.....	20
3.2.8 Invasão celular	21
3.2.9 Estresse oxidativo	21
3.2.10 Ensaio de genotoxicidade	22
3.2.11 Expressão gênica	23
3.2.12 Expressão de proteínas	24
3.3 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Citotoxicidade	28
4.1.1 Citotoxicidade em tratamento isolado	28
4.1.2 Viabilidade celular em tratamentos associados.....	32
4.2 Dissulfeto de dialila induz citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC.....	35
4.3 Dissulfeto de dialila diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 e HUVEC	39
4.4 Dissulfeto de dialila isolado e associado induz apoptose nas células HepG2.....	41

4.5 Investigar alteração no ciclo celular por citometria de fluxo	44
4.6 Morte celular mediada por autofagia	45
4.7 Dissulfeto de dialila inibe a migração em tratamento isolado e associado nas células HepG2 e HUVEC.....	49
4.8 Invasão celular	54
4.10 Dissulfeto de dialila induz danos ao DNA em células HepG2	60
4.11 Análise da expressão relativa de genes	61
4.12 Análise da expressão de proteínas	63
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES.....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma hepatocelular

O câncer de fígado é o sétimo tipo de câncer mais prevalente no mundo, cuja incidência foi de 9,5/100.000 habitantes e a mortalidade de 8,7/100.000 habitantes no ano de 2020 em ambos os sexos. É o quinto tipo mais incidente e o segundo de maior mortalidade entre homens (SIEGEL et al., 2021). Na população mundial, a sobrevida média dos pacientes após 5 anos é de apenas 18% (ZHENG et al., 2018). O câncer primário de fígado continua sendo um grande problema para todos os sistemas de saúde em todo o mundo (HUANG et al., 2020). Dentre todos os tipos de cânceres hepáticos, o carcinoma hepatocelular humano é o de maior relevância (CHACKO; SAMANTA, 2016; HSIEH et al., 2016) sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos de tumores não metastáticos do fígado (VILLANUEVA, 2019).

Existem variações globais substanciais na incidência e mortalidade por carcinoma hepatocelular devido às diferenças no tempo e nível de exposição a fatores de risco ambientais e infecciosos, disponibilidade de recursos de saúde e a capacidade de detectar a doença em estágios iniciais sendo capaz de fornecer um tratamento potencialmente curativo (YANG et al., 2019).

A infecção crônica por hepatite B e C são as causas mais importantes no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular sendo responsáveis por 80% dos casos (YANG; ROBERTS, 2010; EL-SERAG, 2012; MCGLYNN et al., 2021). Estima-se que 257 milhões de pessoas em todo o mundo tenham hepatite B crônica e que 20 milhões de mortes entre 2015 e 2030 serão atribuíveis a hepatite aguda, hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular causados por hepatite B (OMS, 2016). Além disso, calcula-se que 57 milhões de pessoas tenham infecção crônica por hepatite C, da qual 10-20% desenvolverá complicações hepáticas (TANG et al., 2018). Na maioria dos casos, e particularmente em países desenvolvidos, o carcinoma hepatocelular se desenvolve como uma seqüela de hepatite crônica prolongada, que ocorre após os pacientes desenvolverem cirrose hepática (YANG et al., 2019). A cirrose alcoólica também é um fator de risco importante para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, mas de menor importância que a

cirrose desencadeada por hepatite (WEST et al., 2017).

A doença hepática gordurosa não alcoólica é um importante fator de risco para o carcinoma hepatocelular na maioria dos países desenvolvidos (YOUNOSSI et al., 2016a; YOUNOSSI et al., 2016b), sendo o diabetes mellitus e a obesidade os principais fatores de risco clínicos para o desenvolvimento da doença (WELZEL et al., 2013) que pode desencadear o carcinoma hepatocelular mesmo na ausência de cirrose (MITTAL et al., 2016). Ainda, o diabetes mellitus está associado a um risco de duas a três vezes maior do desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (EL-SERAG et al., 2006; YANG et al., 2016). A resistência à insulina e a consequente produção de espécies reativas que desencadeiam inflamação parece ter papel na hepatocarcinogênese (YANG et al., 2019).

Há uma forte interação entre a hepatite B e a exposição à aflatoxina no risco de câncer hepático (ROSS et al., 1992) a infecção crônica por HBV pode induzir a metabolização da aflatoxina B1 inativa à sua forma mutagênica AFB1-8,9-epóxido pelo citocromo P450. Ainda, o reparo por excisão, que normalmente é responsável pela remoção de adutos de DNA, é inibido pela proteína oncogênica do vírus da hepatite B (KEW, 2003). As aflatoxinas são micotoxinas potencialmente hepatocarcinogênicas que contaminam cereais e sementes oleaginosas sendo a aflatoxina B1, produzida por *Aspergillus sp*, a de maior relevância (WANG et al., 2020) e reconhecida por desencadear mutações importantes no gene supressor tumoral *TP53* (GOUAS et al., 2009).

O tratamento do carcinoma hepatocelular envolve um complexo processo de tomada de decisão, levando em consideração não apenas a extensão do tumor e as comorbidades do paciente, mas também a gravidade da disfunção hepática (YANG et al., 2019). Frequentemente é diagnosticado em estágios avançados da doença, quando as terapias potencialmente curativas, que incluem ressecção, ablação ou transplante, têm a sua eficácia limitada (CHACKO; SAMANTA, 2016; HSIEH et al., 2016; LLOVET et al., 2016). Nesses pacientes, a terapia sistêmica permanece essencial e seu papel central e potencial estimularam pesquisas na década passada (HUANG et al., 2020). Além disso, o carcinoma hepatocelular tem uma heterogeneidade genética incomum, o que leva a resistência à quimioterapia e raramente é passível de radioterapia, diminuindo efetivamente as opções terapêuticas e,

consequentemente, levando a um pior prognóstico (SHIN; CHUNG, 2013).

O carcinoma hepatocelular possui alta heterogeneidade molecular, que é documentada em três níveis (NAULT; VILLANUEVA, 2015). O primeiro nível é na comparação de tumores entre pacientes (heterogeneidade interpaciente). As análises moleculares de grandes estudos identificaram diferentes subclasses moleculares que categorizam amplamente os pacientes em dois grupos: subclasses de proliferação e não proliferação (HOSHIDA et al., 2009; VILLANUEVA et al., 2011). As duas outras formas de heterogeneidade documentada incluem aquela observada entre nódulos tumorais dentro do mesmo paciente (heterogeneidade intertumoral) (TORRECILLA et al., 2017) e entre regiões diferentes do mesmo nódulo tumoral (heterogeneidade intratumoral) (KENMOCHI et al., 1987).

O sorafenibe (SORA), um inibidor de multiquinase de uso oral, é o fármaco disponível para tratamento dos estágios avançados da doença, e sua eficácia está relacionada à indução de morte das células cancerosas e alteração do microambiente tumoral. O fármaco age inibindo quinases intracelulares e da superfície de membrana celular envolvidas na sinalização celular, angiogênese e morte celular por apoptose (ANVISA, 2019). Tem como alvo os receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) 1-3, receptor- β do fator de crescimento derivado das plaquetas (PGRFR- β) e quinases da família do fibrossarcoma rapidamente acelerado (Raf) (KIM; VIATOUR, 2020). No entanto, aumenta a sobrevida apenas 2 a 3 meses, isto é, muitos pacientes exibem progressão tumoral mesmo durante a quimioterapia e este medicamento só pode ser usado em indivíduos com a função hepática preservada (LLOVET et al., 2016). O benefício clínico do SORA permanece modesto e a complexa patogênese molecular do carcinoma hepatocelular estimulou a investigação de combinações de sorafenibe com outros fármacos de direcionamento molecular (GAO et al., 2015). Assim, é razoável esperar que seu uso combinado proporcione benefícios em comparação com a monoterapia (HUANG et al., 2020).

Na última diretriz da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) 2021, a dose recomendada de sorafenibe foi reduzida e o regime preferencial foi alterado para atezolizumab + bevacizumabe, padrão no tratamento de carcinoma hepatocelular de primeira linha. Além disso, a imunoterapia

antiproteína de morte celular programada 1 (anti-PD-1) pode ser usada como tratamento de segunda linha. Ensaios clínicos de fase III sugeriram recentemente a eficácia de novos fatores antiangiogênicos, como cabozantinibe e ramucirumab, como opção de tratamento de segunda linha. Com considerações sobre o surgimento de toxicidade, os ensaios clínicos estão investigando combinações das terapias direcionadas acima mencionadas com a imunoterapia como tratamento de primeira linha (KOULOURIS et al., 2021; WEN et al., 2022).

Devido às opções limitadas de tratamento, aliado ao mau prognóstico da doença, há uma necessidade crítica de novas terapias adicionais a fim de melhorar a sobrevida e/ou a qualidade de vida dos pacientes (ABDEL-HAMID et al., 2018). Resultados de vários estudos pré-clínicos e clínicos durante as últimas décadas encorajam o desenvolvimento de metabólitos secundários de plantas e componentes de alimentos bioativos para prevenção e tratamento do câncer. Agentes naturais, incluindo produtos vegetais, têm sido amplamente usados para desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer, e mais de 60% dos medicamentos anticâncer atualmente aprovados são derivados de fontes naturais (GULLETT et al., 2010; NEWMAN; CRAGG, 2012; BISHAYEE; SETHI, 2016; KOTECHA et al., 2016).

1.2 Compostos bioativos e terapia combinada

Atualmente, considerando os efeitos adversos induzidos por fármacos, a tolerância e resistência medicamentosa, os compostos bioativos de alimentos e nutracêuticos têm recebido mais atenção à medida que surgem como uma nova abordagem na prevenção e tratamento de doenças, com as vantagens de serem mais acessíveis, menos tóxicos em relação a medicamentos e disponíveis para a população. Os nutracêuticos são compostos bioativos presentes em diferentes tipos de alimentos, principalmente em frutas e hortaliças, isolados da matriz alimentar, que fornecem efeitos benéficos para a saúde além das funções nutricionais (MAO, X. Y. et al., 2018). Vários estudos descritos em uma revisão recente da literatura apontam os seus benefícios na redução dos efeitos das doenças autoimunes, prevenção do câncer e atividade imunomoduladora (ALALI et al., 2021).

Os compostos bioativos são ainda capazes de atingir diferentes vias de sinalização alteradas, interferindo durante a tumorigênese precoce e também durante os processos carcinogênicos tardios, como a invasão, fase proangiogênica e fase metastática (BRAICU et al., 2017), além de muitos produtos naturais dietéticos possuírem inibição seletiva sobre células cancerosas (JO et al., 2006). Os isotiocianatos de vegetais crucíferos (couve-flor, repolho e brócolis), o sulfeto de dialila (um composto organossulfurado do alho), isoflavonas (extraída da soja) e o licopeno (um carotenoide do tomate) demonstraram efeitos na redução do processo hepatocarcinogênico (ZHOU et al., 2016).

A terapia combinada, medicamento e composto bioativo, permite direcionar simultaneamente diferentes vias envolvidas no câncer, aproveitando diferentes mecanismos de ação a fim de reduzir o desenvolvimento de quimiorresistência (HOUSMAN et al., 2014). Estudos têm demonstrado que compostos bioativos da dieta desempenham um papel importante na inibição e tratamento de cânceres (SUBRAMANIAM et al., 2019) incluindo o carcinoma hepatocelular. A quercetina é um dos polifenóis mais estudados, encontrada na cebola, maçã, frutas vermelhas, chá e vinho tinto. Exerce seu potencial quimiopreventivo pela inibição e indução das vias de sinalização de sobrevivência e morte em células de câncer hepático (OUYANG et al., 2014). Dai e colaboradores (2016) demonstraram que a quercetina inibiu a proliferação de células de carcinoma hepatocelular humano e induziu apoptose por regulação positiva da expressão das proteínas Bad e Bax e regulação negativa da expressão de Bcl-2 e Survivina *in vitro*. Além disso, a quercetina inibiu o crescimento do tumor e aumentou a eficácia terapêutica do 5-fluorouracil *in vitro* e *in vivo*.

Estudos demonstraram que a curcumina, um polifenol de ocorrência natural isolado da *Curcuma longa*, pode reduzir os efeitos adversos causados pela cisplatina, incluindo nefrotoxicidade (KUHAD et al., 2007), citotoxicidade (YOUM et al., 2017) e neurotoxicidade (MENDONCA et al., 2013). Além disso, a curcumina também pode driblar a resistência a cisplatina e aumentar a sensibilidade das células tumorais (BORTEL et al., 2015). Amentoflavona, um flavonoide derivado da *Scutellaria baicalensis*, promove apoptose *in vitro* em células tumorais hepáticas resistentes ao SORA por meio da modulação da via

extrínseca e intrínseca (CHEN et al., 2017).

O tratamento associado de SORA com compostos fitoquímicos demonstrou efeito promissor. SORA quando associado ao carbinol-3-indol (i3c) aumentou a citotoxicidade em células HepG2 mediada por apoptose, promoveu parada de ciclo celular na fase G0/G1 e diminuiu seu potencial angiogênico (ABDELMAGEED et al., 2016). A combinação de barberina com SORA inibiu de maneira dose- tempo-dependente a proliferação de células tumorais de fígado (SMMC-7721e HepG2), aumentou a expressão de PARP e CASP-3 clivadas e diminuiu a expressão de BCL-2 e VEGF (HUANG et al., 2018). O tratamento associado com a fisetina foi mais efetivo na redução do crescimento de células humanas de melanoma por meio do aumento da apoptose, clivagem de caspase-3 e PARP, expressão de Bax e Bak, inibição de Bcl-2 e da expressão de PI3K, fosforilação de MEK1/2, ERK1/2, AKT e mTOR (PAL et al., 2015).

1.3 Alho e dissulfeto de dialila

A dieta têm sido uma boa fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas (EL-SABER BATIHA et al., 2020). O alho (*Allium sativum* L.), um membro da família Amaryllidaceae, é uma planta perene bulbosa originária da Ásia central, nordeste do Irã ou deserto Kirghiz da Rússia Ocidental (NAGINI, 2008; BAEK et al., 2019; MORALES-GONZALEZ et al., 2019). O bulbo de alho é comumente usado como um item alimentar, tempero e para fins medicinais. O alho é uma das plantas cultivadas mais antigas do mundo e de propriedades terapêuticas (NICASTRO et al., 2015; MORALES-GONZALEZ et al., 2019). É uma especiaria herbácea aromática e uma das plantas mais utilizadas como ingrediente em preparações da medicina tradicional com efeitos profiláticos e terapêuticos (AYAZ; ALPSOY, 2007; ADAKI et al., 2014).

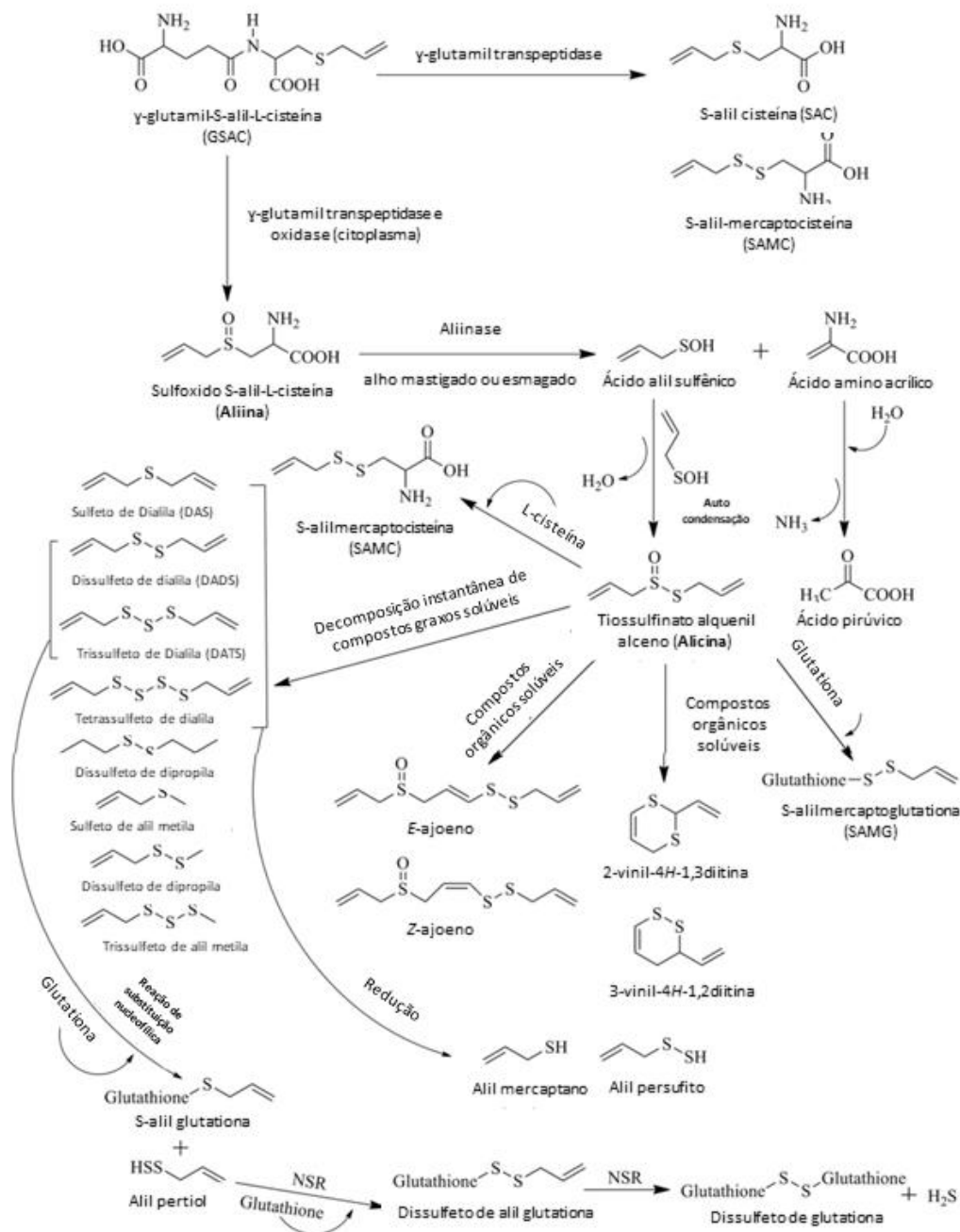
A análise fitoquímica do alho revelou a presença de compostos químicos bioativos com e sem enxofre (BOZIN et al., 2008; ZHANG et al., 2020). O alho é uma fonte rica de compostos organossulfurados com mais de 33 diferentes tipos. Esses compostos contribuem no sabor e benefícios para a saúde (NAGINI, 2008; BUTT et al., 2009; ZHANG et al., 2020). O bulbo de alho contém ~ 65% de água, ~ 28% de carboidratos, ~ 2,3% de compostos

organossulfurados, ~ 2% de proteína, ~ 1,2 % de aminoácidos livres e ~ 1,5% de fibra, bem como ácidos graxos, fenóis e oligoelementos (NAGINI, 2008; BUTT et al., 2009; ZHANG et al., 2020). O alho também contém vários compostos bioativos não-enxofre, como saponinas, sapogeninas, saponinas esteroides, compostos fenólicos, compostos polissacarídeos, alcaloides, aminoácidos essenciais, flavonoides, glicosídeos, adenosina, alixina, glicosídeos esteroides, lectinas, antocianinas, óleo essencial, prostaglandinas, frutano, pectina, vitaminas B1, B2, B6, C e E, biotina, ácido nicotínico, ácidos graxos, glicolipídios e fosfolipídios (DE GREEF et al., 2021).

Devido às diferenças na solubilidade, ambos os conjuntos de compostos têm diferentes biodisponibilidade e características farmacocinéticas. O composto hidrossolúvel que tem sido mais extensivamente estudado é o S-alilcisteína, enquanto o composto lipossolúvel mais estudado é a alicina (MILNER, 2006).

O principal composto organossulfurado tanto no alho cru quanto no alho em pó é a aliína, composto não volátil devido aos seus grupos amino e carboxila. Quando o alho cru é fatiado, mastigado ou esmagado, uma enzima vacuolar chamada aliinase é liberada. Essa enzima reage com a aliína e produz intermediários reativos. Então, o ácido alilsulfênico reage espontaneamente com uns aos outros para formar um tiosulfinato de alquênil alceno, um alceno instável conhecido como alicina – responsável por seu odor pungente típico. A alicina imediatamente se decompõe formando uma variedade de compostos organossulfurados, incluindo sulfeto de dialila, dissulfeto de dialila (DADS), trissulfeto de dialila, ditíinas e ajoeno (Figura 1). Esta decomposição ocorre dentro de horas à temperatura ambiente e dentro de minutos durante o cozimento (DE GREEF et al., 2021).

Figura 1. Reações catalíticas enzimáticas da aliína e formação de diferentes compostos organossulfurados do alho



Fonte: Adaptado de De Greef et al., 2021.

Os componentes do alho exercem efeitos quimioterápicos por meio da modulação de várias vias de sinalização e genes envolvidos na oncogênese, invasão e metástase. Foi demonstrado que os compostos derivados do alho aumentam a regulação das proteínas de sinalização envolvidas na apoptose

(Bax, FAS, caspases, citocromo c, Rb, p21 e p53), diminuem os fatores pró-inflamatórios (NF- κ B, COX-2, interleucinas e citocinas), aumentam a parada do ciclo celular, aumentam os marcadores (GSH) e enzimas antioxidantes (catalase, SOD, glutathiona peroxidase), diminuem os fatores angiogênicos (VEGF e HIF-1 α), inibem os fatores proliferativos (ciclina, EGRF e MEK1), e diminuem os fatores pró-invasivos (MMP-9, MMP-2 e Snai1) (DE GREEF et al., 2021).

Seus efeitos imunomoduladores e antitumorais têm sido demonstrados *in vitro* e *in vivo*. Shang et al. (2019) relataram que os mecanismos anticâncer dos extratos de alho foram atribuídos à inibição do crescimento e proliferação celular, regulação do metabolismo carcinogênico, estimulação da apoptose, prevenção da angiogênese, invasão e migração e, portanto, redução de efeitos adversos. Compostos organossulfurados presentes nos extratos lipossolúveis podem promover parada no ciclo celular, induzir a morte celular por apoptose, aumentar a acetilação de histonas, influenciar a comunicação intercelular na junção *gap* e modular o estado redox intracelular (ICIEK et al., 2009). Em relação ao câncer, estudos epidemiológicos têm demonstrado associação negativa do alho com uma variedade de tipos de cânceres, com a maioria desses efeitos mencionados sendo atribuídos principalmente aos compostos organossulfurados do alho (CHU et al., 2013; RYU; KANG, 2017; AGBANA et al., 2020). Por causa dessas atividades sobre o câncer, o alho se tornou um dos principais temas de interesse em pesquisas quimiopreventivas e quimioterápicas (DE GREEF et al., 2021).

O DADS é um composto organossulfurado derivado de alho e algumas outras plantas do gênero *Allium*. Junto com o trissulfeto de dialila e o tetrassulfeto de dialila é um dos principais componentes do óleo destilado de alho (YI; SU, 2013). É um líquido amarelado, insolúvel em água e com um forte odor de alho. É produzido durante a decomposição da alicina, que é liberada após esmagamento do alho e outras plantas do gênero. É um componente importante do alho cozido e um composto organossulfurado natural no alho processado que representa 40-60% do total de sulfetos lipossolúveis (YI; SU, 2013).

Estudos farmacológicos demonstraram que DADS possui inúmeras atividades biológicas, entre as quais a antimicrobiana (LI et al., 2018; UZUN et

al., 2019) e anticâncer (YI; SU, 2013; XIA et al., 2019) são as atividades mais eficazes e com maior número de estudos, sendo consideradas as principais razões para a ingestão de alho em humanos. Além de suas atividades anticâncer, os efeitos farmacológicos do DADS também são estendidos as células, tecidos ou órgãos não cancerosos. Anti-inflamação e anti-oxidação são dois principais mecanismos para os efeitos protetores celulares de DADS (QIU et al., 2020; XU et al., 2020). Mecanismos incluindo a ativação de proteínas quinase B (Akt) e quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2) (KHATUA et al., 2016; MA et al., 2020; XU et al., 2020) e a inibição de histona desacetilases (HDACs) (MYZAK et al., 2006), também medeiam os efeitos protetores celulares do DADS, constituindo um modulador efetivo de proteínas quinases/fosfatases, que inibe as fases de iniciação e promoção tumoral (YI; SU, 2013). Seus mecanismos de ação incluem: a ativação de enzimas metabolizadoras que detoxificam carcinógenos, supressão da formação de adutos de DNA, regulação da parada do ciclo celular, indução de apoptose, inibição da angiogênese, modificação das histonas e diminuição da invasão tumoral (MILNER, 2006; MIRODDI et al., 2011). Sua atividade antitumoral *in vitro* já foi descrita em células de câncer de mama (LEI et al., 2008), cólon (SONG et al., 2009), próstata (XIAO et al., 2020) e fígado (WEN et al., 2004).

Antioxidantes são substâncias que previnem, reduzem ou reparam danos nos tecidos causados por espécies reativas. Vários estudos mostraram que o DADS possui uma variedade de propriedades antioxidantes (LOCATELLI et al., 2017; JANG et al., 2018; LIU et al., 2018; ZHANG et al., 2020), o que inclui um efeito direto na produção de espécies reativas (SONG et al., 2021). O tratamento com DADS pode ativar enzimas antioxidantes, como glutathione S-transferase (GST), catalase, heme oxigenase-1 (HO-1) e superóxido dismutase, que podem converter peróxidos em substâncias menos tóxicas ou inativas por meio da redução da oxidação, protegendo células e tecidos de espécies reativas (LEE; JOHNSON, 2004; KRAJKA-KUZNIAK et al., 2017; LIU et al., 2018).

As propriedades antiproliferativas do DADS em diferentes linhagens de células tumorais humanas, estão relacionadas com a capacidade desse composto bioativo em bloquear as células na fase G2/M do ciclo celular (YI; SU, 2013). Suangtamai e Tanyong (2016) verificaram que o dissulfeto de dialila

foi capaz de induzir morte celular por apoptose e autofagia em linhagens de leucemia mielóide (K562 e NB4) por meio da ativação da via mTOR. O DADS também aumentou a taxa de células em apoptose pela redução da expressão do gene *BCL-2*, apesar de baixa citotoxicidade em células epiteliais humanas do esôfago de Barrett (BAR-T), que são reconhecidas como precursoras do adenocarcinoma de esôfago (FENG et al., 2017). Em células de leucemia humana (linhagem HL-60) esse composto bioativo apresentou múltiplos alvos para intervenção, tais como indução de apoptose e bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e alterou a expressão de proteínas associadas com os processos de invasão e migração celular (LING et al., 2017), sendo a sua ação antitumoral regulada pela via Rac1-ROCK1-LIMK1-cofilina 1 (LING et al., 2020). Nas células da linhagem de câncer de mama triplo-negativo o DADS foi capaz de aumentar a frequência de células em apoptose e reduzir o potencial metastático dessas células, por meio da redução da expressão dos genes *BCL-2* e *MMP-9* (HUANG et al., 2015).

A linhagem celular humana endotelial de cordão umbilical (HUVEC) foi utilizada em alguns experimentos a fim de comparar os resultados encontrados com aqueles obtidos na linhagem tumoral hepática HepG2 e observar se há seletividade dos resultados. Outros estudos na literatura também utilizaram a linhagem HUVEC como modelo de células não tumoral comparando seus resultados com os obtidos em células HepG2 (HAN et al., 2008; CORIAT et al., 2012; XIANG et al., 2015; VAKILI ZAHIR et al., 2018; YURDACAN et al., 2019; MUSTAFA et al., 2020). As células endoteliais estão envolvidas na troca de metabólitos entre o sangue e os tecidos, na homeostase sanguínea, na cicatrização de feridas e podem ser alvo de numerosos xenobióticos (HENDERSON, 1991; GUTIERREZ-PRAENA et al., 2012).

Os resultados promissores do dissulfeto de dialila em diferentes linhagens tumorais estimulam novas pesquisas com esse composto bioativo na prevenção ou tratamento, em novas abordagens para pacientes oncológicos com hepatocarcinoma celular em estágio avançado. Assim, a hipótese desse estudo foi avaliar um possível efeito sinérgico na combinação do dissulfeto de dialila e do quimioterápico sorafenibe sobre a indução de morte das células HepG2, por mecanismos de autofagia e/ou apoptose, indução de danos no DNA e modulação da expressão de proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do dissulfeto de dialila sobre a citotoxicidade, apoptose, autofagia, migração e invasão tumoral, genotoxicidade e expressão de proteínas em células HepG2. Assim como a avaliação destes parâmetros em células HepG2 tratadas com a associação de dissulfeto de dialila e o agente quimioterápico sorafenibe.

2.2 Objetivos específicos

Analisar em células HepG2 e HUVEC o efeito do dissulfeto de dialila, isolado e associado ao quimioterápico sorafenibe, os seguintes parâmetros:

- viabilidade celular após 24, 48 ou 72 horas de tratamento por meio do ensaio da resazurina;
- citotoxicidade/viabilidade celular pelo kit *LIVE/DEAD*TM;
- proliferação celular por meio do ensaio clonogênico;
- indução de autofagia;
- migração por *wound healing* e invasão celular;
- expressão de genes relacionados a sinalização de morte tumoral por RT-qPCR;
- expressão de proteínas relacionadas a sinalização de morte tumoral por western blot;
- análise da rede de interações entre os compostos, genes e proteínas por meio da plataforma STITCH.

Avaliar em células HepG2 o efeito do dissulfeto de dialila e/ou sorafenibe sobre:

- indução de apoptose por marcação com Anexina V-FITC/PI por meio da citometria de fluxo;
- alteração do ciclo celular por meio de citometria de fluxo;
- modulação de espécies reativas utilizando marcador fluorescente CM-

H₂DCFDA;

- genotoxicidade por meio do ensaio do cometa.

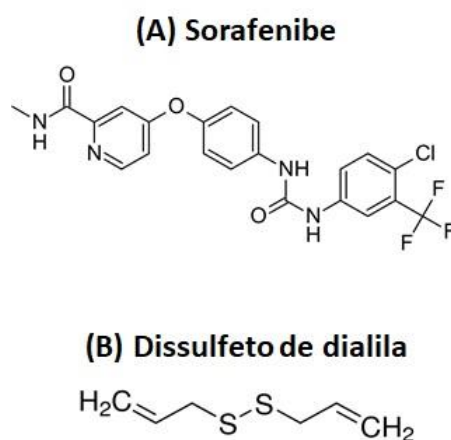
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Agentes químicos e reagentes

O dissulfeto de dialila (Figura 2; CAS 2179-57-9), sorafenibe (Figura 2; CAS 284461-73-0), resazurina (CAS 62758-13-8), azul de tripan (CAS 72-57-1), Tris (CAS 77-86-1), dimetilsulfóxido (DMSO, CAS 67-68-5), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, CAS 60-00-4), Triton X-100 (CAS 9002-93-1) e metanossulfonato de metila (MMS; CAS: 66-27-3) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA). O meio de cultura RPMI 1640, DMEM, mix de antibióticos (penicilina/estreptomicina/neomicina), soro bovino fetal, TrypLE™ Express, agarose de baixo ponto de fusão (CAS: 39346-81-1) e agarose de ponto de fusão normal (CAS: 9012-36-6) e o kit de Anexina V-FITC/PI (cat. #V13242) foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). O corante GelRed™ (Biotium, Hayward, California, EUA) foi obtido da Uniscience (São Paulo, São Paulo, Brasil). O corante Giemsa foi obtido da Merck (Rockville, Maryland, EUA). O cloridrato de doxorubicina 50 mg/10 mL foi obtido da Eurofarma (São Paulo, São Paulo, Brasil).

Figura 2. Estruturas químicas do (A) sorafenibe e (B) dissulfeto de dialila



Fonte: www.sigmaaldrich.com

3.1.2 Linhagens celulares e condições de cultivo

A linhagem celular HepG2, de hepatocarcinoma humano, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Cat. Nº 0103). A linhagem celular HUVEC, de células endoteliais da veia umbilical humana, obtida da ATCC (*American Type Culture Collection*, Cat. Nº CRL-4053), foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

Para realização de todos os experimentos as células HepG2 e HUVEC foram manipuladas em capela de fluxo laminar classe II tipo A1 (Veco, Campinas, Brasil) e mantidas em estufa Forma Series II, Water Jacket CO₂ Incubator (ThermoFisher Scientific - Massachusetts, EUA) com 5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade, em meio de cultura DMEM (HepG2) e RPMI 1640 (HUVEC) suplementado com 4mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (estreptomicina, gentamicina e neomicina) de acordo com os procedimentos para manutenção de linhagens celulares propostos por Bal-Price e Coecke (2011). As células foram usadas entre a terceira e oitava passagem de descongelamento nos experimentos.

3.2 Métodos

3.2.1 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular das culturas após exposição ao dissulfeto de dialila e ao quimioterápico sorafenibe e a associação destes foi determinada pelo ensaio da resazurina, de acordo com o protocolo descrito por Page, Page e Noel (1993).

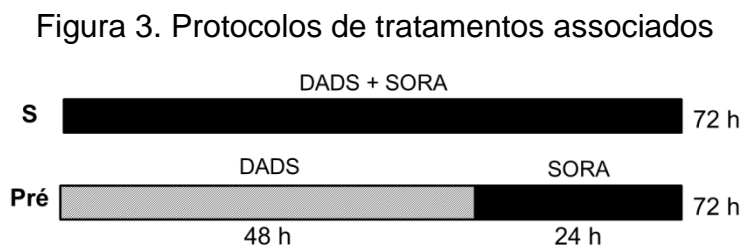
3.2.1.1 Análise dos compostos isolados

Inicialmente, as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços na densidade de 1×10^4 células por poço para a linhagem HepG2 e HUVEC. Posteriormente, foram incubadas em estufa a 37°C, 5 % CO₂ por 24

horas. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com dissulfeto de dialila (1 – 800 μM), sorafenibe (2 – 32 μM), controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (CS - 0,25% DMSO) e controle positivo (CP - MMS - 300 μM). Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, 50 μL de solução resazurina (0,01% m/v) diluída em tampão salino (PBS - *Phosphate buffered saline*) foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por 2h a 37°C, na ausência de luz. As leituras da fluorescência foram feitas em um espectrômetro de fluorescência CaryEclipse (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) utilizando filtro de excitação e emissão de 560 e 590 nm, respectivamente. Os valores de fluorescência do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular, e os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células viáveis.

3.2.1.2 Análise dos compostos associados

Foram feitos dois tipos de tratamentos associados a fim de verificar qual seria o mais efetivo. Um tratamento simultâneo de 72 horas e um pré-tratamento com dissulfeto de dialila por 48 horas, seguido de tratamento com sorafenibe por 24 horas. Esses tempos de tratamento foram os mesmos propostos por (HUANG et al., 2018).



Esquemática dos protocolos associados testados. S: tratamento simultâneo. Pré: pré-tratamento com dissulfeto de dialila seguido de sorafenibe. DADS: dissulfeto de dialila. SORA: sorafenibe.

Tratamento simultâneo

Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM), sorafenibe (8 μM), controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (0,25% DMSO) e controle positivo (MMS 300 μM) por 72 horas. A análise seguiu conforme descrito para os tratamentos isolados.

Pré-tratamento com dissulfeto de dialila

Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM), controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (0,25% DMSO) e controle positivo (MMS 300 μM) por 48 horas. O meio de cultura foi descartado e as células foram tratadas com sorafenibe (8 μM) por 24 horas. Após o tempo de tratamento, o método seguiu como descrito no item 3.2.1.1.

3.2.2 Ensaio de LIVE/DEAD

A análise da viabilidade celular também foi realizada utilizando-se o kit LIVE/DEAD™ (Thermo Scientific; Canoga Park, California, EUA) em células HepG2 e HUVEC tratadas com dissulfeto de dialila e/ou sorafenibe.

As células foram semeadas (5×10^3 células/poço) em placas pretas de 96 poços com fundo transparente, estabilizadas por 24 horas e tratadas por 72 horas. Após o tratamento, as culturas foram lavadas com PBS e coradas de acordo com as recomendações do fabricante. A calceína AM é retida nas células vivas produzindo uma fluorescência verde intensa, enquanto o homodímero de etídio (EthD-1) entra nas células com membranas danificadas, produzindo uma fluorescência vermelha nas células mortas.

Foram realizadas as leituras de fluorescência em leitor de placas Synergy H1 (BioTek®; Winooski, Vermont, EUA) com filtros de Excitação/Emissão de 485/530 e 530/645 para a calceína e EthD-1, respectivamente. Os valores de fluorescência do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular, e os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células viáveis. As imagens foram realizadas utilizando o Microscópio de Fluorescência Leica DMI 6000B (Leica; Wetzlar, Hessen, Alemanha). Essas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP.

3.2.3 Ensaio de sobrevivência clonogênica

O ensaio foi realizado segundo protocolo de Franken et al. (2006). As células HepG2 ou HUVEC foram semeadas em placa de cultivo de células de 24 poços na densidade de 5×10^4 com meio de cultura completo e incubadas por 24 horas a 37°C em CO₂. Posteriormente, foram tratadas com dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 µM) e/ou sorafenibe (8 µM), controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (0,25% DMSO) e controle positivo (MMS 300 µM) por 72 horas. No final dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, contadas e semeadas 150 células em placas de 6 poços em duplicada. Após 12 dias, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol:ácido acético:água (1:1:8 v/v) por 30 minutos. Foram, então, coradas com Giemsa:tampão fosfato (1:20 v/v) por 25 minutos e após lavagem com água destilada foram contadas em contador hematológico manual. Colônias contendo 50 células ou mais foram consideradas viáveis. A eficiência do plaqueamento (EP) e a fração de sobrevivência (FS) foram calculadas de acordo com as equações:

$$PE = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{número de células semeadas}} \times 100$$

$$FS = \frac{\text{número de colônias em cada tratamento}}{\text{número de colônias semeadas} \times PE}$$

3.2.4 Identificação da morte celular por apoptose

Para o ensaio de avaliação de morte celular por apoptose foi utilizado o kit Anexina V-FITC/PI e os procedimentos realizados de acordo com as instruções fornecidas pela Invitrogen. Foram semeadas 1×10^5 células por poço em placa de 12 poços e foram incubadas por 24 horas. Após, realizou-se o tratamento com dissulfeto de dialila nas concentrações de 50, 100 e 200 µM, sorafenibe 8 µM, associação dos compostos, controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (0,25% DMSO) e controle positivo (2 µM de doxorubicina) e incubadas por 72 horas. Ao término do tempo de tratamento, o meio de cultura dos poços foi recolhido em tubos de centrifugação. Os poços foram lavados com 1 mL de PBS a 37°C. As células foram dissociadas do poço

com 250 μ L de Tryple-Express™ por 10 minutos a 37°C. Após este tempo, inativou-se a enzima por diluição com o meio de cultura recolhidos dos poços e as células em suspensão foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi completamente retirado e as células ressuspendidas em 90 μ L 1X annexin-binding buffer e movidas para os tubos de citometria (Corning – Corning, Nova Iorque, EUA). Cerca de 15 minutos antes da análise, foram adicionados 10 μ L de solução de anexina (50% annexin V + 50% 1X annexin-binding buffer) em cada tubo, exceto no primeiro tubo, que foi usado para calibração e medir a voltagem das células. Imediatamente antes da análise, foram adicionados 100 μ L de solução PI (1 μ g/mL) nos tubos de citometria. A leitura de 10.000 eventos por tubo foi realizada no citômetro de fluxo BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences – San Jose, Califórnia, EUA) e analisada pelo software BD FACSDiva™ 6.1.3 (BD Biosciences – San Jose, Califórnia, EUA). Essas análises foram realizadas no laboratório multiusuário de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares (LIAREC) da FCFRP-USP.

3.2.5 Modulação do ciclo celular por citometria de fluxo

A modulação do ciclo celular foi avaliada utilizando-se marcação do DNA das células com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo seguindo o método proposto por Pozarowski e Darzynkiewicz (2004). Foram semeadas 2×10^4 células por poço em placas de 12 poços. Após a estabilização por 24 horas e tratamento com dissulfeto de dialila e/ou sorafenibe por 72 horas, as amostras foram fixadas em etanol 70% e armazenadas em freezer a -20°C. No dia da análise as amostras foram centrifugadas, o etanol 70% foi retirado e o pellet foi ressuspendido em solução de coloração (triton x-100 0,1% (v/v), PI 2 μ g/ml, RNase 100 μ g/ml em PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) e os resultados adquiridos foram analisados com o software Modfit LT 5.0.9. Os dados estão apresentados como porcentagem de distribuição de células entre as fases do ciclo celular. Essas análises foram realizadas no laboratório multiusuário de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares (LIAREC) da FCFRP-USP.

3.2.6 Identificação de morte celular induzida por autofagia

O ensaio foi conduzido de acordo com as especificações do kit utilizado na detecção (Autophagy Assay Kit (ab139484) Abcam, Cambridge, Reino Unido). As células HepG2 e HUVEC (1×10^4) foram semeadas em placa de 96 poços, estabilizadas por 24 horas e tratadas por 24 horas com dissulfeto de dialila e/ou sorafenibe, controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (0,25% DMSO), e controle positivo (cloroquina 100 μ M). As leituras das fluorescências foram realizadas em espectrofotômetro Synergy 2 (BioTek®; Winooski, Vermont, EUA) com filtros de Excitação/Emissão de 463/534 (verde) e 350/461 (azul). O fluoróforo verde marca vesículas autofágicas que contém a proteína LC3, o fluoróforo azul marca o núcleo das células. Os valores de fluorescência estão expressos como razão de autofagia (razão dos valores de fluorescência verde pela azul) (Tuszkorn et al., 2019). As imagens foram realizadas utilizando o Microscópio de Fluorescência Leica DMI 6000B (Leica; Wetzlar, Hessen, Alemanha). Essas análises foram realizadas no laboratório multiusuário de microscopia eletrônica (LMME) da FMRP-USP.

3.2.7 Migração celular

As células HepG2 e HUVEC (2×10^4 células/poço) foram cultivadas até obterem 90% de confluência em uma placa de 24 poços. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira estéril, foi efetuado um risco (cicatriz) na monocamada aderente de células (ensaio *wound healing*). O meio de cultura foi removido para retirar os restos celulares e as células soltas e um novo meio de cultura foi adicionado contendo dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μ M) e/ou sorafenibe (8 μ M), controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (0,25% DMSO) e controle positivo (300 μ M MMS). Imagens das feridas foram registradas com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio invertido (Zeiss - Primovert), nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas de incubação. A distância média da área interna foi determinada como a porcentagem de migração utilizando o software Image J (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EUA) empregando

a seguinte equação:

$$\text{Migração celular (\%)} = \frac{(\text{At} = 0\text{h} - \text{At} = 24\text{h})}{(\text{At} = 0\text{h})} \times 100$$

Onde,

At = área total

3.2.8 Invasão celular

Os ensaios de invasão foram realizados utilizando-se insertos Greiner Bio-One (Kremsmünster, Áustria). Matrigel[®] foi adicionado na parte superior das membranas porosas (tamanho de poro, 8 μm) overnight a 37°C. Os insertos revestidos foram então hidratados com meio de cultura e 5×10^5 de células HepG2 e HUVEC. Os compartimentos inferiores foram preenchidos com meio de cultura 10% soro bovino fetal. As células foram tratadas com dissulfeto de dialila e/ou sorafenibe, controle negativo (meio de cultura) e controle de solvente (0,25% DMSO) por 24 horas. As células que invadiram para o fundo do inserto foram fixadas com álcool etílico 70% e coradas com 0,1% de cristal violeta. A invasão foi determinada pela contagem de um número médio de células de quatro diferentes campos com auxílio do microscópio invertido (Zeiss - Primovert), e as taxas de invasão expressas como relações entre os valores do grupo tratado *versus* controle negativo.

3.2.9 Estresse oxidativo

Para quantificar a indução de espécies reativas foi utilizado o marcador CM-H₂DCFDA (Life Technologies, Eugene, Oregon, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. As células HepG2 (1×10^4 /poço) foram semeadas em placas pretas de 96 poços com fundo transparente, estabilizadas por 24 horas e tratadas com dissulfeto de dialila e/ou sorafenibe por 2, 3, 4 ou 24 horas. Os grupos controle negativo (meio de cultura), controle de solvente (0,25% DMSO), e controle positivo (H₂O₂ 1mM) também foram incluídos. As leituras das fluorescências foram realizadas em espectrômetro de fluorescência Synergy 2 (BioTek; Winooski, Vermont, EUA)

utilizando filtro de excitação e emissão de 450 e 520 nm, respectivamente. Os valores de fluorescência do controle negativo foram considerados como 100% de espécies reativas.

3.2.10 Ensaio de genotoxicidade

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo de Tice et al. (2000), que se baseia na avaliação da migração do DNA em um gel de agarose. Desse modo, as células com maior dano ao DNA apresentam maior quantidade de DNA na cauda (WITTE et al., 2007). A mensuração da cauda do cometa na imagem captada pela câmera é feita por meio da intensidade da luz emitida (fluorescência) a partir da transformação de cada pixel (cinza) da imagem em sinais elétricos que serão transformados em micron. A intensidade da fluorescência proveniente da cabeça e da cauda do cometa são utilizados para calcular diferentes parâmetros de cometas (KUMARAVEL et al., 2009).

Em cada poço de uma placa de 24 poços foi adicionado 1 mL de suspensão celular de células HepG2 na densidade de 5×10^4 células por mL. As células foram tratadas por 24 horas e as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5 % CO₂ com diferentes concentrações de dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 µM), sorafenibe (8 µM) e a associação de ambos. O controle positivo foi tratado com MMS (300 µM), o controle negativo recebeu meio de cultura e o controle de solvente DMSO (0,25%). Após o tempo de tratamento, a viabilidade das culturas foi avaliada pela técnica de exclusão por Azul de Tripán em contador de células automático Countess (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). Apenas as culturas que apresentaram viabilidade celular superior a 70% foram submetidas ao ensaio do cometa.

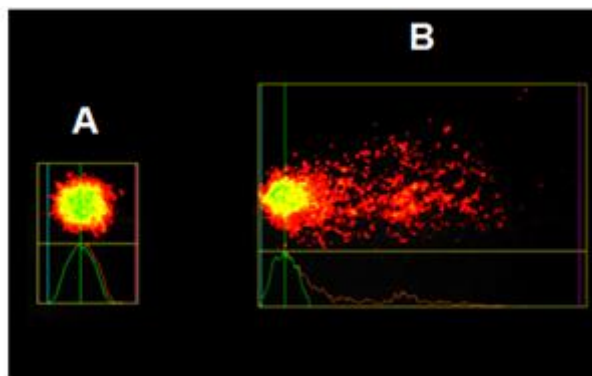
Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz. No preparo das lâminas foram adicionados à suspensão celular 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% e uma alíquota de 80 µL de suspensão de cada amostra foi depositada sobre lâminas previamente revestidas com agarose normal 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 20 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise recém preparada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM,

1% de Triton X-100 e 10% de DMSO, pH 10) e mantidas por 18 horas a 4°C.

Após a lise, as lâminas foram submersas em solução alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos a 4°C, e, posteriormente, levadas à cuba de eletroforese em banho de gelo. A eletroforese foi conduzida em solução alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos, com voltagem (0,87 V/cm) e amperagem (300 mA) constantes. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 minutos. Depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 5 minutos.

Imediatamente antes da análise, as lâminas foram coradas com o corante GelRed™ (1:10.000 (v/v)) por 3 minutos, e examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss - AxioStar Plus), acoplado a uma câmera usando filtro 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 20 x. Para cada tratamento foram analisadas 2 lâminas, em triplicata e os nucleoides (50 por lâmina) foram analisados com o software CometAssay IV™ (Perceptive Instruments®, Bury St Edmunds, Suffolk, Inglaterra). O parâmetro avaliado foi a porcentagem de DNA na cauda do cometa (*Tail intensity*).

Figura 4. Imagens de nucleoides capturados com o software CometAssay IV



(A) Nucleoide com ausência de dano ao DNA e (B) nucleoide com elevado grau de dano ao DNA. Fonte: Laboratório de Nutrigenômica – FCFRP, 2015. Captura: Carla da Silva Machado.

3.2.11 Expressão gênica

Para a extração de RNA, as linhagens celulares foram semeadas em frascos de 25 cm² ventilados para cultura celular (5 × 10⁵ células por frasco). As células foram tratadas com 0,25% DMSO, dissulfeto de dialila e/ou

sorafenibe por 24 horas.

O RNA foi extraído com o kit PureLink RNA Mini (Invitrogen; Carlsbad, California, EUA) seguindo as recomendações do fabricante e reversamente transcrito usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription. Para a remoção do DNA, as amostras foram tratadas com DNase I (1 U/ μ L). A PCR quantitativa foi realizada com Power SYBR[®] Green Master Mix em um sistema Step One Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), utilizando KiCqStart[®] SYBR[®] Green Primers pré-desenhados (Tabela 1) para análise de expressão gênica (Sigma-Aldrich): *ACTB*, *AKT1*, *BAX*, *BCL2*, *CCNB1*, *CD44*, *CDK1*, *CHEK2*, *CTNNB1*, *FOS2*, *FOXO3*, *GAPDH*, *HPRT1*, *MMP2*, *MYC* e *TNF*. A quantificação da expressão relativa de cada gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando genes de referência para normalização. *ACTB*, *HPRT1* e *GAPDH* foram usados como genes de referência.

Tabela 1. Primes utilizados para a análise da expressão gênica por RT-qPCR

Primers ID	Símbolo	Gene ID	Ref Seq ID	Primers ID	Símbolo	Gene ID	Ref Seq ID
H_ACTB_1	<i>ACTB</i>	60	NM_0011101	H_CTNNB1	<i>CTNNB1</i>	1499	NM_001904
H_AKT1_1	<i>AKT1</i>	207	NM_005163	H_FOS_2	<i>FOS2</i>	1151 1678 9	
H_BAX_1	<i>BAX</i>	581	NM_004324	H_FOXO_1	<i>FOXO</i>	2309	NM_0014554
H_BCL_2	<i>BCL2</i>	596	NM_0006333	H_GAPDH_1	<i>GAPDH</i>		NM_004964
H_CCNB1_2	<i>CCNB1</i>	891	NM_031966	H_HPRT1_1	<i>HPRT1</i>	3251	NM_000194
H_CD44_1	<i>CD44</i>	960	NM_0006104	H_MMP2_1	<i>MMP2</i>	4313	NM_00112789 13
H_CDK1_1	<i>CDK1</i>	983	NM_001170406	H_MYC_1	<i>MYC</i>	4609	NM_002467
H_CHECK_2	<i>CHECK2</i>	11200	NM_10057352	H_TNF_3	<i>TNF</i>	7124	NM_000594

3.2.12 Expressão de proteínas

Para a extração de proteínas, as linhagens celulares foram semeadas em frascos de 75 cm² ventilados para cultura celular (2×10^6 células por frasco). As células foram tratadas com 0,25% DMSO, dissulfeto de dialila e/ou sorafenibe por 24 horas. Após o tratamento, as proteínas foram extraídas com

RIPA buffer + 1% protease + 0,1% de fosfatase. A quantificação das proteínas foi feita por meio do kit Pierce™ BCA Protein Assay da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

Em seguida, foi adicionado Laemmli sample buffer 2x (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) às amostras (1:1) e fervidas a 95 °C por 5 min. As proteínas presentes nas amostras foram determinadas realizando eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, California, EUA). A ligação não específica foi bloqueada incubando a membrana com leite desnatado a 5% em TBS-T (Tris Buffer Saline with Tween 20 a 0,1%) durante 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight a 4 °C com os anticorpos primários (Tabela 2) lavadas com TBS-T, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugados com HRP por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente com TBS-T, e os anticorpos secundários detectados usando ECL (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). As bandas de proteína foram visualizadas usando o sistema ChemiDoc™ (Bio-Rad, Hercules, California, EUA).

Tabela 2. Anticorpos utilizados para a análise da expressão de proteínas por western blot.

Anticorpo	Hospedeiro	Marca	CAT number
Anti- β -Actina	Coelho	Cell Signaling Technology	8457S
Anti-Bax	Coelho	Cell Signaling Technology	2772S
Anti-Bcl-2	Coelho	Cell Signaling Technology	2876S
Anti-Caspase-3	Coelho	Abclonal	A2156
Anti-Caspase-8	Coelho	Abclonal	A0215
Anti-GAPDH	Coelho	Cell Signaling Technology	2118S
Anti-JNK	Coelho	Abclonal	A0288
Anti-LC3-II	Coelho	Abclonal	A5618
Anti-Nrf2	Coelho	Abclonal	a1244
Anti-IgG de coelho conjugado com HRP	Cabra	Abclonal	AS014

3.2.13 Análise da rede de interações entre compostos, genes e proteínas

A análise de bioinformática correlacionando os compostos e proteínas foi realizada por meio da plataforma online e gratuita STITCH. Primeiramente acessou-se a plataforma por meio do link <http://stitch.embl.de/> e selecionou-se

a aba “*multiple names*”, colocou-se os nomes dos compostos químicos no campo “*list of names*”, genes e proteínas modulados. Após escolher a espécie no campo “*organism*”, clicou-se em pesquisar (*search*) e continuar (*continue*). Depois de aparecer uma rede de interação, foi necessário definir os padrões desejados para a rede. Clicando em “*settings*” é possível definir os parâmetros de interesse. Para baixar os dados gerados clicou-se em tabelas/exportações (*Tables /Exports*), exportando a figura em alta resolução e a tabela. Análises da rede puderam ser obtidas utilizando o comando “*analysis*” e no final da página fazendo o download em salvar/exportar (*save/export*) dos arquivos processo biológico (*Biological Process*), função molecular (*Molecular Function*), componente celular (*Cellular Component*), caminhos KEGG (*KEGG Pathways*), domínios de proteína PFAM (*PFAM Protein Domains*), domínios e recursos da proteína INTERPRO (*INTERPRO Protein Domains and Features*).

3.3 Análise estatística

Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão da triplicata de três experimentos biológicos independentes. Os dados dos experimentos isolados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste K-S (Teste Kolmogorov-Smirnov) e submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey, com exceção do ensaio de wound healing cujo pós-teste escolhido foi Dunnett. Os dados dos tratamentos associados foram submetidos à análise de variância (Two-way ANOVA) seguido de comparação múltipla de Tukey onde letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo. A análise estatística dos tratamentos associados foi realizada levando-se em consideração a comparação entre três tratamentos (dissulfeto de dialila e sorafenibe isolados e a associação dos dois compostos), sem comparações intergrupos. Os dados do controle positivo foram submetidos ao teste *t* de Student, comparando-os com o controle negativo, para a validação da resposta do controle positivo com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 (La Jolla, Califórnia, EUA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para os parâmetros avaliados. O cálculo do IC₅₀ e o combination index (CI) foram calculados utilizando o software CompuSyn (CHOU.; MARTIN,

2005) onde $CI < 1$ indica efeito sinérgico, $CI = 1$ indica efeito aditivo e $CI > 1$ indica efeito antagônico. Para os ensaios de expressão gênica e western blot, a análise estatística foi feita por meio do teste t de Student ($p < 0,05$) associado à expressão relativa em relação ao grupo controle.

4. RESULTADOS

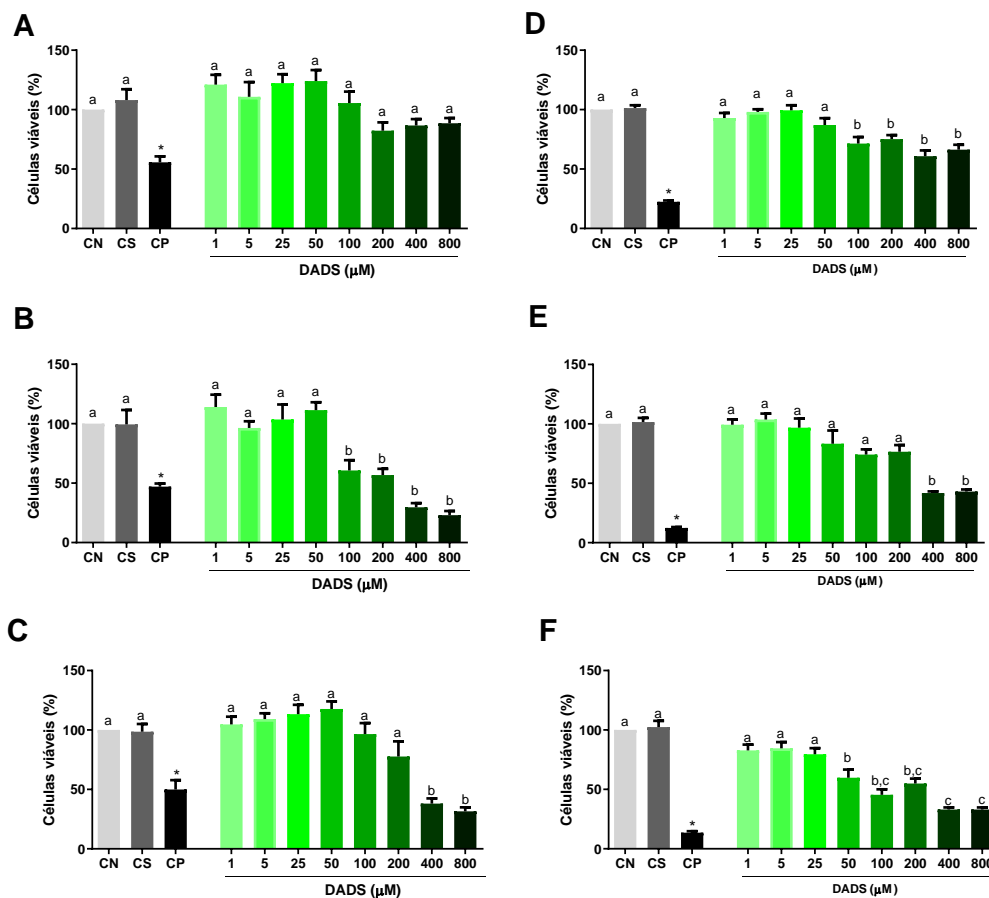
4.1 Viabilidade celular

4.1.1 Viabilidade em tratamento isolado

O tratamento de 24 horas em células HepG2 (Figura 5A) não diminuiu a viabilidade das células HepG2 em qualquer concentração testada. Em 48 e 72 horas de tratamento, houve uma redução significativa na viabilidade celular, quando comparada ao controle negativo. Em 48 horas (Figura 5B), as concentrações de DADS 100, 200, 400 e 800 μM diminuíram a viabilidade celular. No tratamento de 72 horas (Figura 5C), apenas as concentrações de 400 e 800 μM de dissulfeto de dialila diminuíram a viabilidade celular.

O tratamento com o dissulfeto de dialila reduziu a viabilidade de células HUVEC nos três tempos de tratamento testados. Em 24 horas, concentrações de 100 – 800 μM reduziram a viabilidade celular (Figura 5D), em 48 horas apenas as concentrações mais altas testadas (400 e 800 μM) foram eficientes na redução da viabilidade celular (Figura 5E) e em 72 horas de tratamento, concentrações a partir de 50 μM reduziram a viabilidade de células HUVEC quando comparadas ao controle negativo (Figura 5F).

Figura 5. Efeito do dissulfeto de dialila na viabilidade de células HepG2 e HUVEC



Viabilidade Celular (%) de células HepG2 após 24 (A), 48 (B) ou 72 (C) horas e células HUVEC após 24 (D), 48 (E) ou 72 (F) horas de tratamento com dissulfeto de dialila (1-800 μM). CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO 0,25%; CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média \pm desvio padrão (n = 3), One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$). * Diferente do controle negativo (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

O IC_{50} calculado do dissulfeto de dialila nas células HepG2 e HUVEC estão apresentados na Tabela 3.

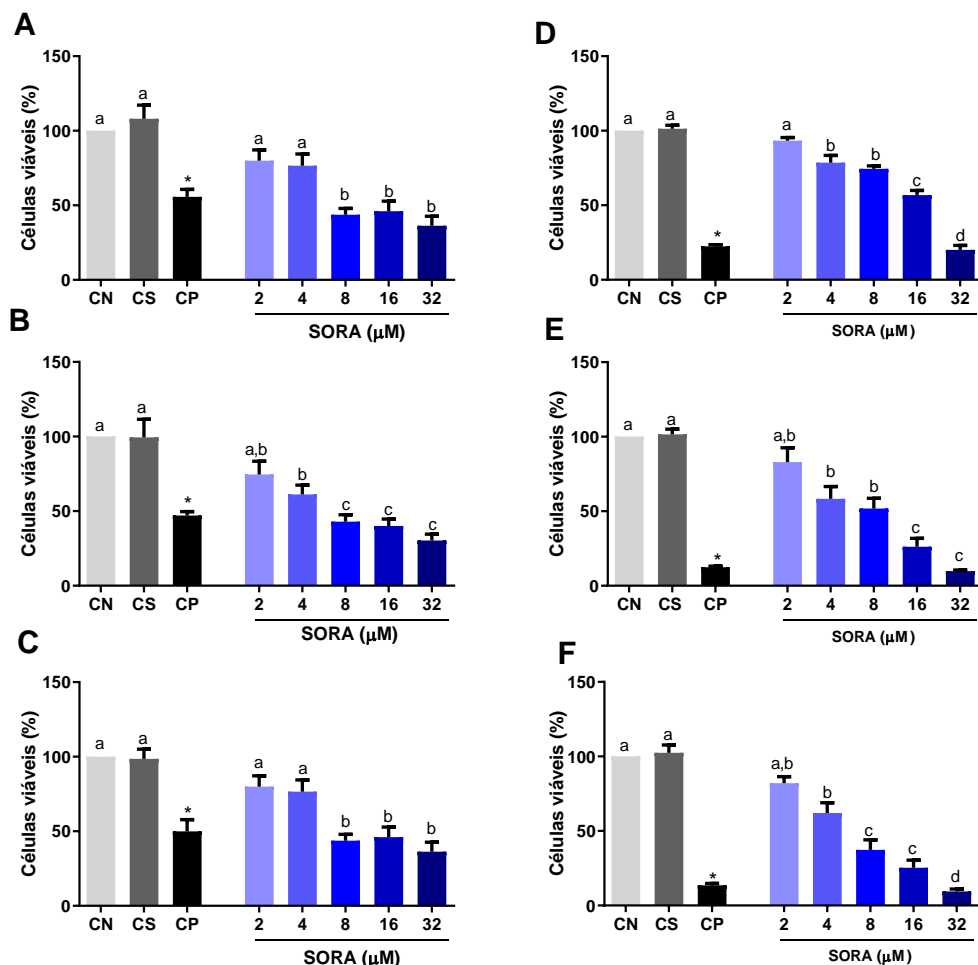
Tabela 3. Valores calculados de IC_{50} para dissulfeto de dialila (μM)

Linhagens	24 h	48 h	72 h
HepG2	1065,31	340,51	343,49
HUVEC	985,40	360,69	257,25

O tratamento com sorafenibe em células HepG2 foi efetivo em reduzir a viabilidade celular nos três tempos de tratamento testados. Em 24 horas de tratamento, as concentrações de 8, 16 e 32 μM reduziram significativamente a viabilidade celular quando comparadas ao controle negativo (Figura 5A). Enquanto em 48 horas de tratamento, as concentrações 4, 8, 16 e 32 μM diminuíram a viabilidade das células HepG2 (Figura 6B). Em 72 horas (Figura 6C) de tratamento, 8, 16 e 32 μM reduziram significativamente a viabilidade celular.

Células HUVEC tratadas com o quimioterápico sorafenibe tiveram a sua viabilidade celular diminuída a partir da concentração de 4 μM nos três tempos de tratamentos analisados. Em 24 (Figura 6D), 48 (Figura 6E) e 72 (Figura 6F) horas de tratamento, as concentrações de 4, 8, 16 e 32 μM diminuíram a viabilidade celular quando comparadas ao controle negativo.

Figura 6. Efeito do sorafenibe na viabilidade de células HepG2 e HUVEC



Viabilidade Celular (%) de células HepG2 após 24 (A), 48 (B) ou 72 (C) horas e células HUVEC após 24 (D), 48 (E) ou 72 (F) horas de tratamento com sorafenibe (2-32 μM). CN: controle negativo (meio de cultura); CS: DMSO 0,25%; CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média \pm desvio padrão ($n = 3$), One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$). * Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

O IC_{50} calculado do dissulfeto de sorafenibe nas células HepG2 e HUVEC estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores calculados de IC_{50} para sorafenibe (μM)

Linhagens	24 h	48 h	72 h
HepG2	13,54	8,46	9,44
HUVEC	21,04	10,43	5,62

4.1.2 Viabilidade celular em tratamentos associados

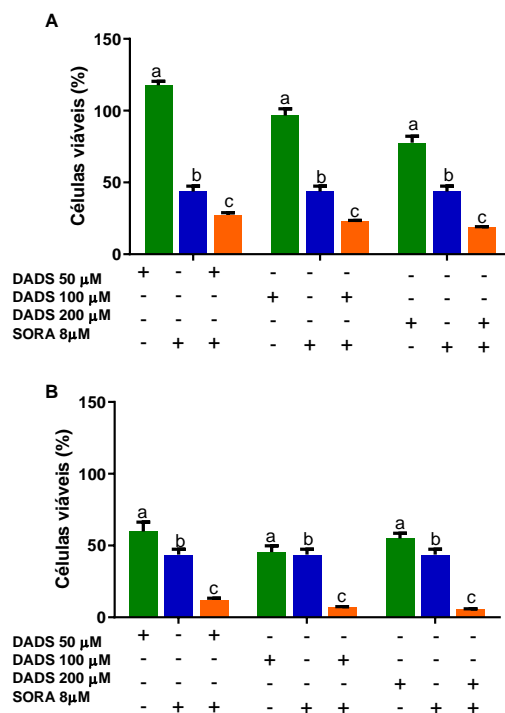
De acordo com os resultados da viabilidade celular dos compostos isolados, selecionou-se três concentrações de dissulfeto de dialila sendo uma concentração sem atividade citotóxica (50 μM) e duas com atividade citotóxica (100 e 200 μM) em células HepG2 para prosseguir com os experimentos. A concentração 8 μM de sorafenibe que foi selecionada está relacionada com a concentração plasmática do fármaco em humanos após a administração de dois comprimidos de 400 mg por dia (EDGINTON et al., 2016; TANDIA et al., 2017).

4.1.2.1 Viabilidade celular em tratamento simultâneo

O tratamento simultâneo de 72 horas com o dissulfeto de dialila e o quimioterápico sorafenibe foi mais eficiente na redução da viabilidade de células HepG2 do que o tratamento isolado apenas com o composto bioativo da dieta em todas as concentrações testadas (50, 100 e 200 μM - Figura 7A). Como pode ser observada, esta redução não é decorrente apenas do efeito do quimioterápico sobre as células, pois a redução da viabilidade celular na associação é ainda menor do que quando as células foram tratadas apenas com o sorafenibe (8 μM), indicando um efeito sinérgico ($\text{CI} < 1$) do composto bioativo com o quimioterápico. O *combination index* (CI) da associação é de 0,27; 0,31 e 0,42 para as concentrações de 50, 100 e 200 μM respectivamente.

Em células HUVEC (Figura 7B), a diminuição da viabilidade celular induzida pelo dissulfeto de dialila nas concentrações de 50, 100 e 200 μM são semelhantes àquela induzida por 8 μM do quimioterápico sorafenibe. Todavia, é possível observar que a associação dos dois compostos é ainda mais efetiva na redução da viabilidade das células, reduzindo a viabilidade em torno de 90%. O efeito sinérgico da associação também foi demonstrado pelo $\text{CI} < 1$ em todas as concentrações associadas. A concentração de 50 μM teve um CI de 0,30, a de 100 μM 0,19 e a de 200 μM de 0,15.

Figura 7. Efeito do dissulfeto de dialila associado ao sorafenibe em tratamento simultâneo na viabilidade de células HepG2 e HUVEC



Viabilidade Celular (%) de células HepG2 (A) e HUVEC (B) após 72 horas de tratamento simultâneo com dissulfeto de dialila (DADS: 50 –200 μM) e sorafenibe (Sora: 8 μM). CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente DMSO 0,25%; CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$).

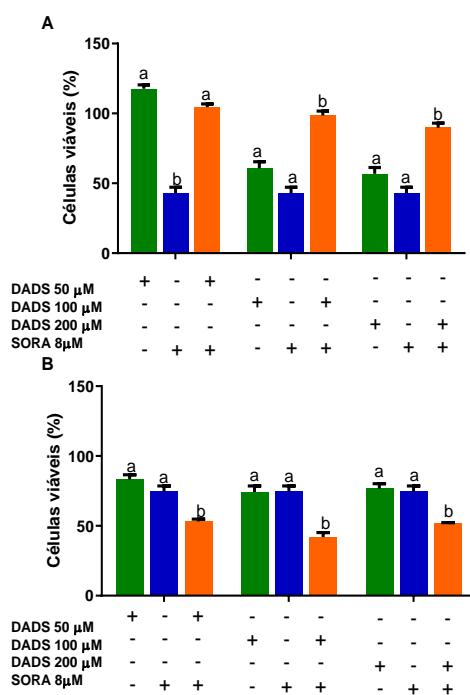
4.1.2.2 Viabilidade celular em protocolo de pré-tratamento

O pré-tratamento com dissulfeto de dialila e posterior tratamento com o quimioterápico sorafenibe não foi eficiente na redução da viabilidade celular das células HepG2 (Figura 8A) uma vez que a viabilidade das células tratadas com dissulfeto de dialila (50 μM) isolado e associado foram estatisticamente iguais, enquanto as maiores concentrações da associação (100 e 200 μM DADS + 8 μM SORA) induziram maior viabilidade que os tratamentos isolados. O tratamento com o sorafenibe isolado (8 μM) demonstrou maior redução da viabilidade celular do que o efeito do tratamento combinado. Em células HUVEC (Figura 8B), a associação diminuiu a viabilidade em todas as três concentrações testadas. O tratamento associado com o quimioterápico diminuiu mais viabilidade das células HUVEC do que o tratamento com o dissulfeto de dialila e sorafenibe isolados.

De acordo com os resultados apresentados acima, já que o objetivo do

trabalho é um tratamento com efeito sinérgico na redução da viabilidade das células tumorais, escolheu-se o tratamento associado simultâneo para os próximos ensaios, pois esse apresentou efeito sinérgico nos experimentos de viabilidade celular.

Figura 8. Efeito do pré-tratamento com dissulfeto de dialila seguido de sorafenibe na viabilidade de células HepG2 e HUVEC

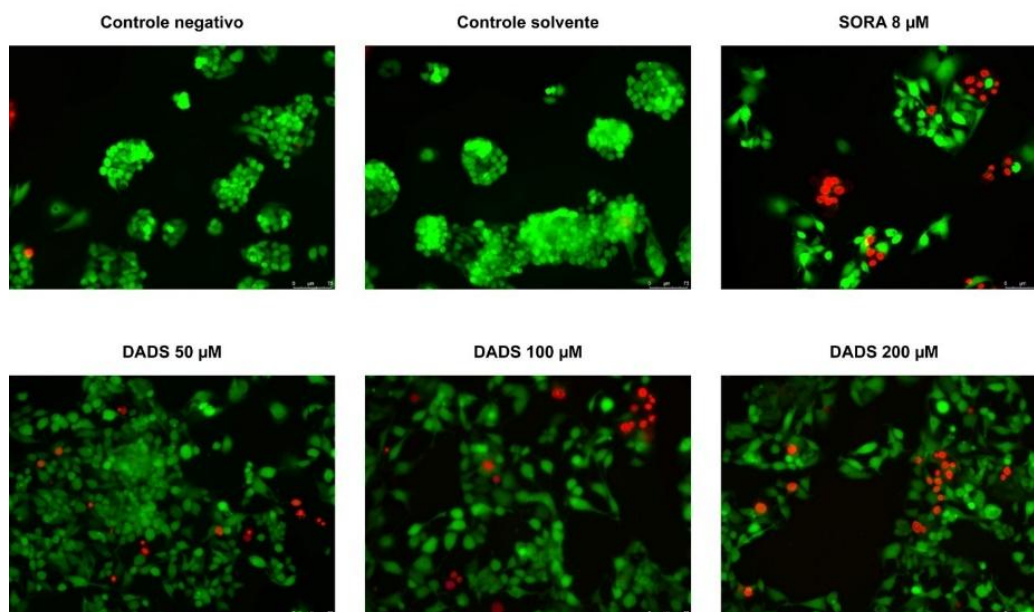


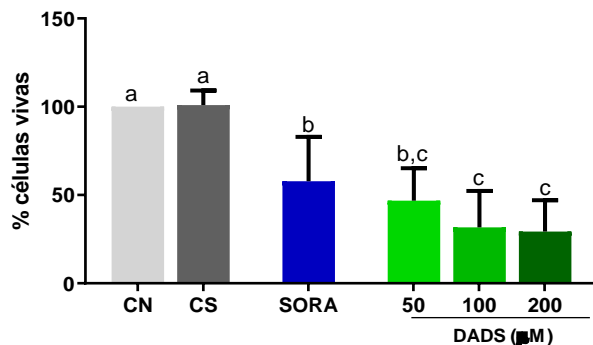
Viabilidade Celular (%) de células HepG2 (A) e HUVEC (B) após 48 horas de pré-tratamento com dissulfeto de dialila (DADS: 50 –200 μ M) seguido de 24 horas de tratamento com sorafenibe (Sora: 8 μ M). CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS-300 μ M). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$).

4.2 Dissulfeto de dialila induz citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC

As análises dos resultados de viabilidade celular por LIVE/DEAD mostram que o dissulfeto de dialila em todas as concentrações testadas (50, 100 e 200 μ M) induziu diminuição na viabilidade de células HepG2. O sorafenibe (8 μ M) também diminuiu a viabilidade celular e foi estatisticamente igual à concentração de 50 μ M de dissulfeto de dialila. Os dados do controle de solvente não foram estatisticamente diferentes do controle negativo (Figura 9).

Figura 9. Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HepG2 após 72 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila

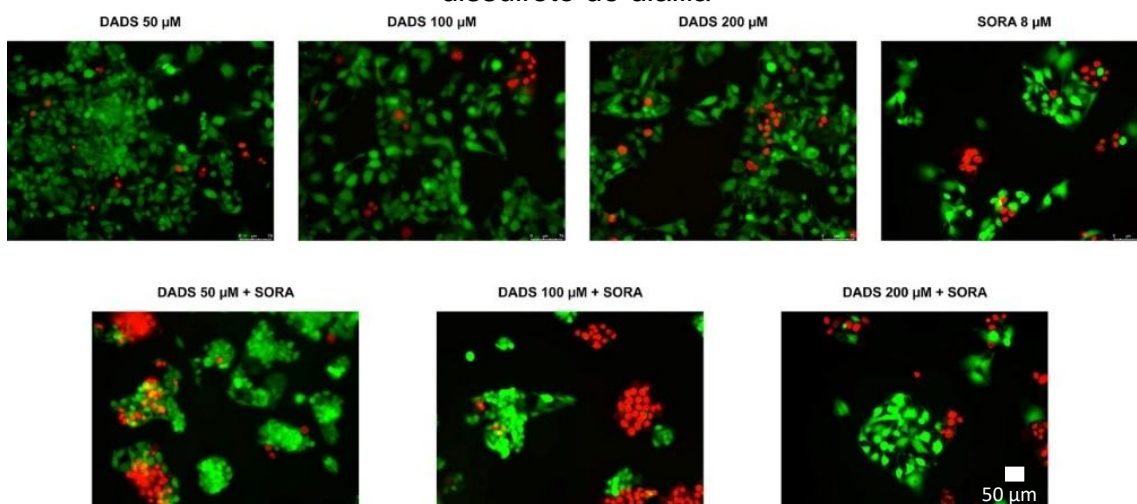


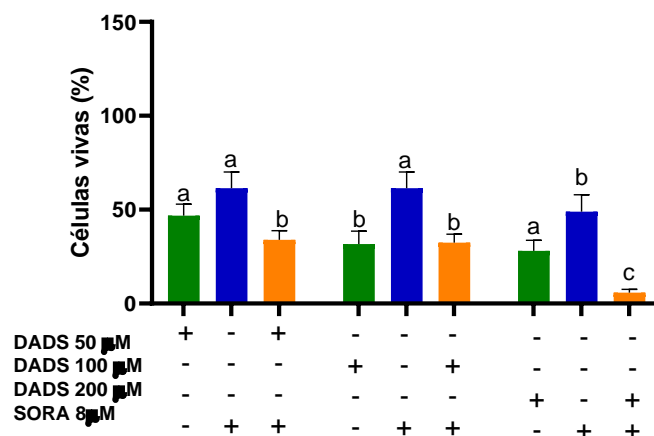


Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). DADS: dissulfeto de dialila; SORA: sorafenibe 8 μM ; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%). As células marcadas em verde correspondem às células vivas e marcadas com calceína AM. As células vermelhas correspondem às células mortas marcadas com homodímero de etídio (EthD-1). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

A associação sorafenibe (8 μM) ao dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) aumentou o efeito citotóxico do sorafenibe em todas as concentrações testadas. É possível ainda observar que não há diferença entre a associação de 50 e 100 μM de dissulfeto de dialila, no entanto, a associação de 200 μM diminuiu ainda mais a quantidade de células vivas (Figura 10).

Figura 10. Resultados da viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HepG2 após 72 horas de tratamento com sorafenibe associado ao dissulfeto de dialila

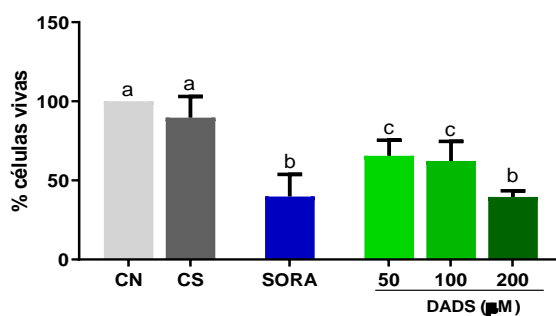
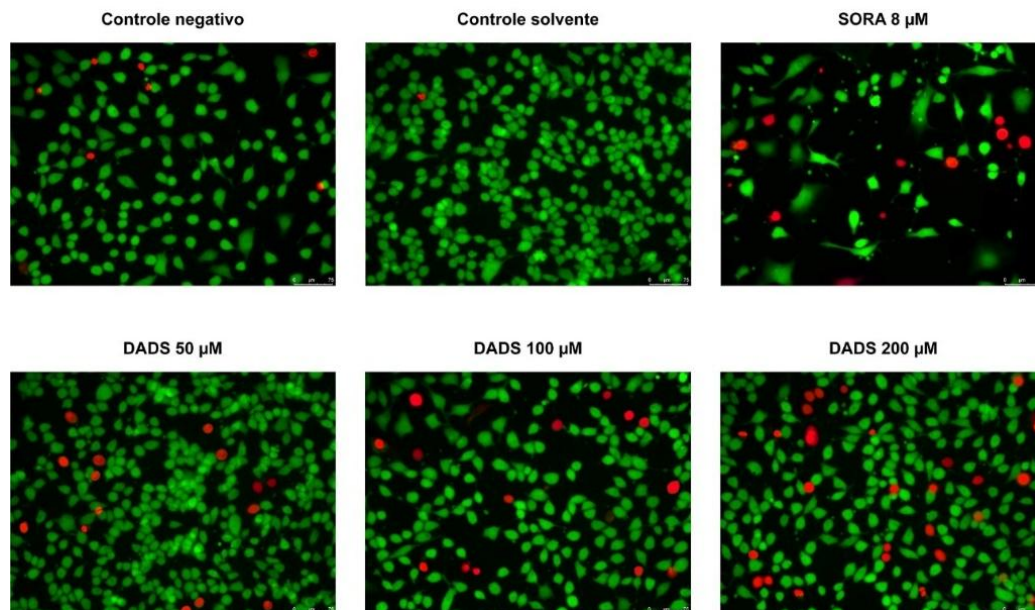




Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). DADS: dissulfeto de dialila; SORA: sorafenibe 8 μM . As células marcadas em verde correspondem às células vivas e marcadas com calceína AM. As células vermelhas correspondem às células mortas marcadas com homodímero de etídio (EthD-1). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Em células HUVEC as três concentrações testadas (50, 100 e 200 μM) induziram diminuição na viabilidade celular. As duas menores concentrações testadas foram estatisticamente iguais na indução de morte celular, a maior concentração (200 μM) testada foi mais citotóxica que 50 e 100 μM e tão citotóxica quanto o sorafenibe isolado (8 μM). Não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo solvente (Figura 11).

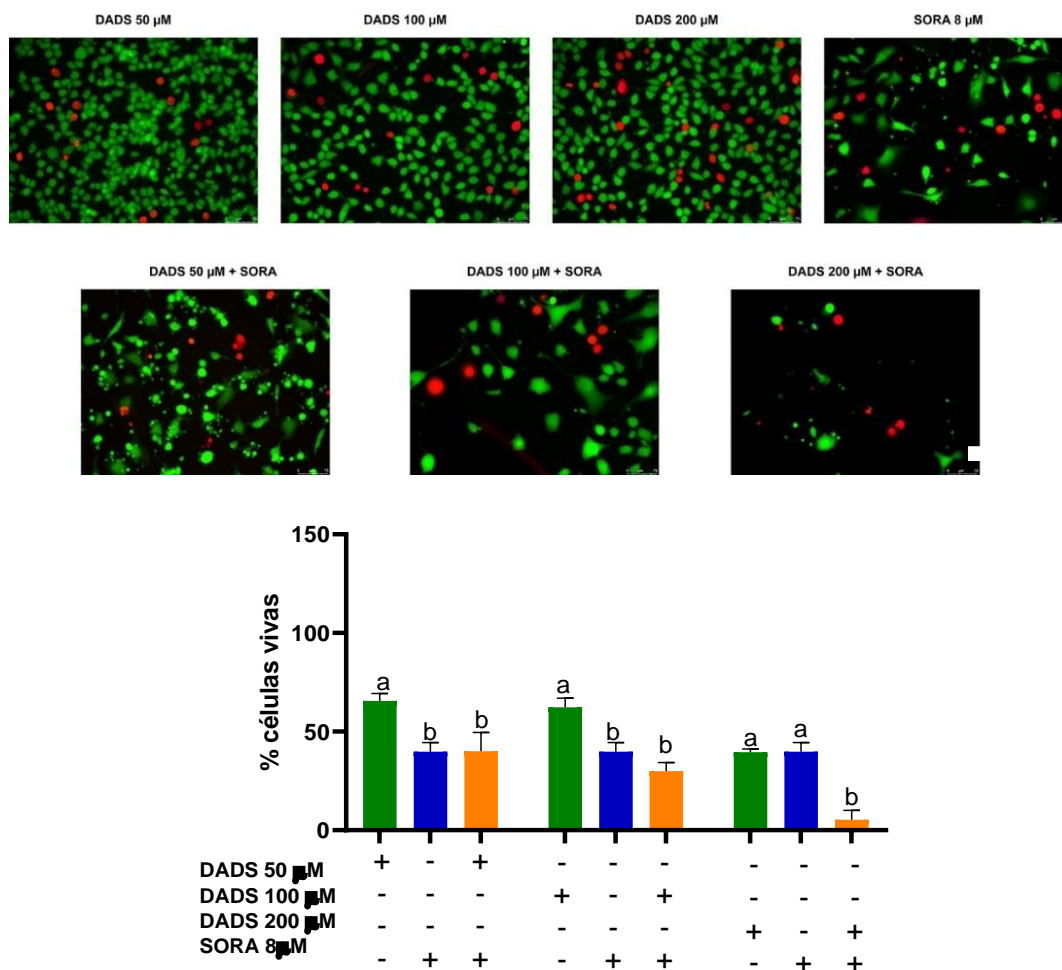
Figura 11. Resultados da viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HUVEC após 72 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila



Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). DADS: dissulfeto de dialila; SORA: sorafenibe 8 μM ; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%). As células marcadas em verde correspondem às células vivas e marcadas com calceína AM. As células vermelhas correspondem às células mortas marcadas com homodímero de etídio (EthD-1). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

A associação sorafenibe (8 μM) ao dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) demonstra que a citotoxicidade observada nas concentrações de 50 e 100 μM são provenientes do tratamento isolado com o sorafenibe, uma vez que são estatisticamente iguais. Somente a maior associação (200 μM DADS + 8 μM SORA) induziu maior porcentagem de citotoxicidade do que os tratamentos isolados (Figura 12).

Figura 12. Resultados da viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células HUVEC após 72 horas de tratamento com sorafenibe associado ao dissulfeto de dialila



Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). DADS: dissulfeto de dialila; SORA: sorafenibe 8 μM . As células marcadas em verde correspondem às células vivas e marcadas com calceína AM. As células vermelhas correspondem às células mortas marcadas com homodímero de etídio (EthD-1). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.3 Dissulfeto de dialila diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 e HUVEC

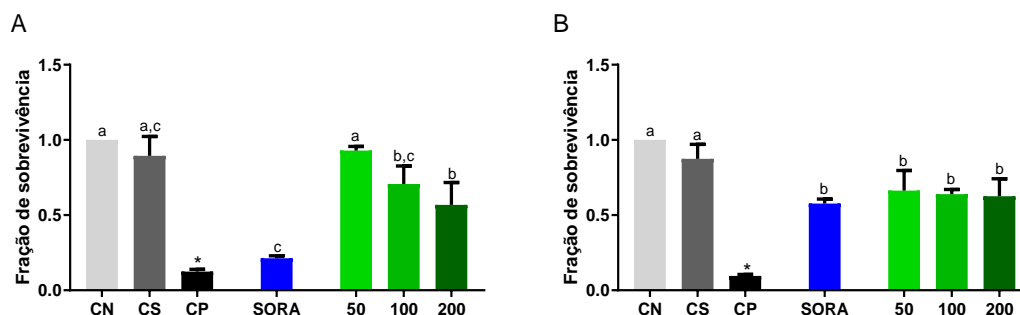
As colônias foram contadas para determinar a morte celular após o tratamento com dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (8 μM) em tratamento isolado. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com DMSO, utilizado como controle de solvente, manteve-se estatisticamente igual ao controle negativo em células HepG2 e HUVEC (Figura 13).

Em células HepG2, de acordo com a Figura 13A, apenas as concentrações de 100 e 200 μM de dissulfeto de dialila e 8 μM de sorafenibe

diminuíram a proliferação celular quando comparadas ao controle negativo. A concentração de 100 μM de DADS teve uma média de sobrevivência de 0,71, 200 μM uma média de 0,57 e sorafenibe isolado 0,21.

Nas células HUVEC, todas as concentrações testadas de dissulfeto de dialila diminuíram a proliferação celular quando comparadas ao controle negativo de maneira independente da concentração. A fração de sobrevivência foi de 0,66, 0,64 e 0,62 para os tratamentos de 50, 100 e 200 μM de dissulfeto de dialila, respectivamente e de 0,58 no tratamento com 8 μM de sorafenibe (Figura 13B).

Figura 13. Efeito do dissulfeto de dialila e sorafenibe na inibição da proliferação de células HepG2 e HUVEC



Fração de sobrevivência do efeito do dissulfeto de dialila e sorafenibe isolados na proliferação de células HepG2 (A) e HUVEC (B) por meio do ensaio clonogênico após 72 h de tratamento e 12 dias de incubação. CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%). CP: MMS 300 μM . Sora: 8 μM de sorafenibe. Média \pm desvio padrão (n = 3), One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Médias com a mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$). * Diferente do controle negativo (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

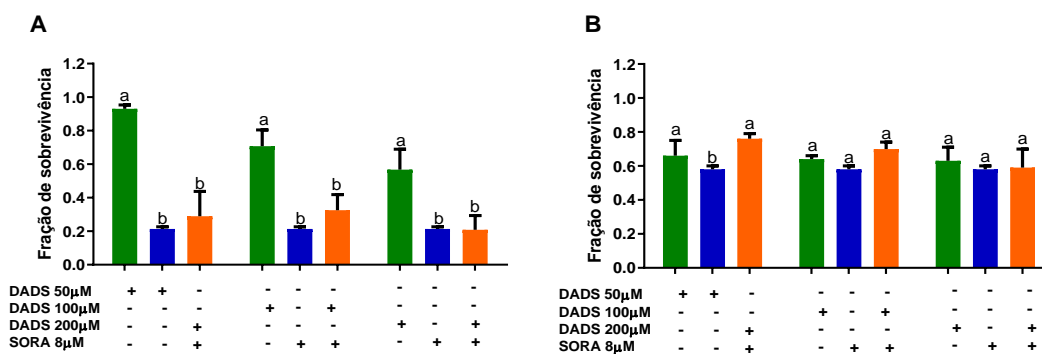
Quando se analisa a associação dos dois compostos, é possível perceber menor fração de sobrevivência da associação quando comparada ao tratamento com dissulfeto de dialila isolado, mas não é estatisticamente diferente do sorafenibe isolado, ou seja, o efeito de redução de fração de sobrevivência observado refere-se ao efeito do sorafenibe sobre as células HepG2 (Figura 14A).

Em tratamento associado, em células HUVEC, observa-se que o tratamento com sorafenibe reduz mais a fração de sobrevivência das células HUVEC do que quando comparado a menor associação testada (50 μM DADS + 8 μM Sora). Nas demais concentrações associadas, observa-se que não há

diferença estatística em relação aos tratamentos associados e isolados (Figura 14B).

Comparando-se as duas linhagens, observa-se que a fração de sobrevivência de células HepG2 tratadas com a associação do dissulfeto de dialila e sorafenibe foi menor em todas as concentrações testadas do que a fração de sobrevivência de células HUVEC (Figura 14).

Figura 14. Efeito do dissulfeto de dialila e sorafenibe em tratamento associado na proliferação de células HepG2 e HUVEC



Fração de sobrevivência do efeito do dissulfeto de dialila associado ao sorafenibe na proliferação de células HepG2 (A) e HUVEC (B) por meio do ensaio clonogênico. DADS: dissulfeto de dialila; SORA: 8 µM de sorafenibe. Média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$).

4.4 Dissulfeto de dialila isolado e associado induz apoptose nas células HepG2

A porcentagem de células HepG2 apoptóticas tratadas com dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 µM) isolado e associado ao sorafenibe (8 µM) foram marcadas com Anexina V FITC e iodeto de propídeo (PI) e quantificadas por citometria de fluxo.

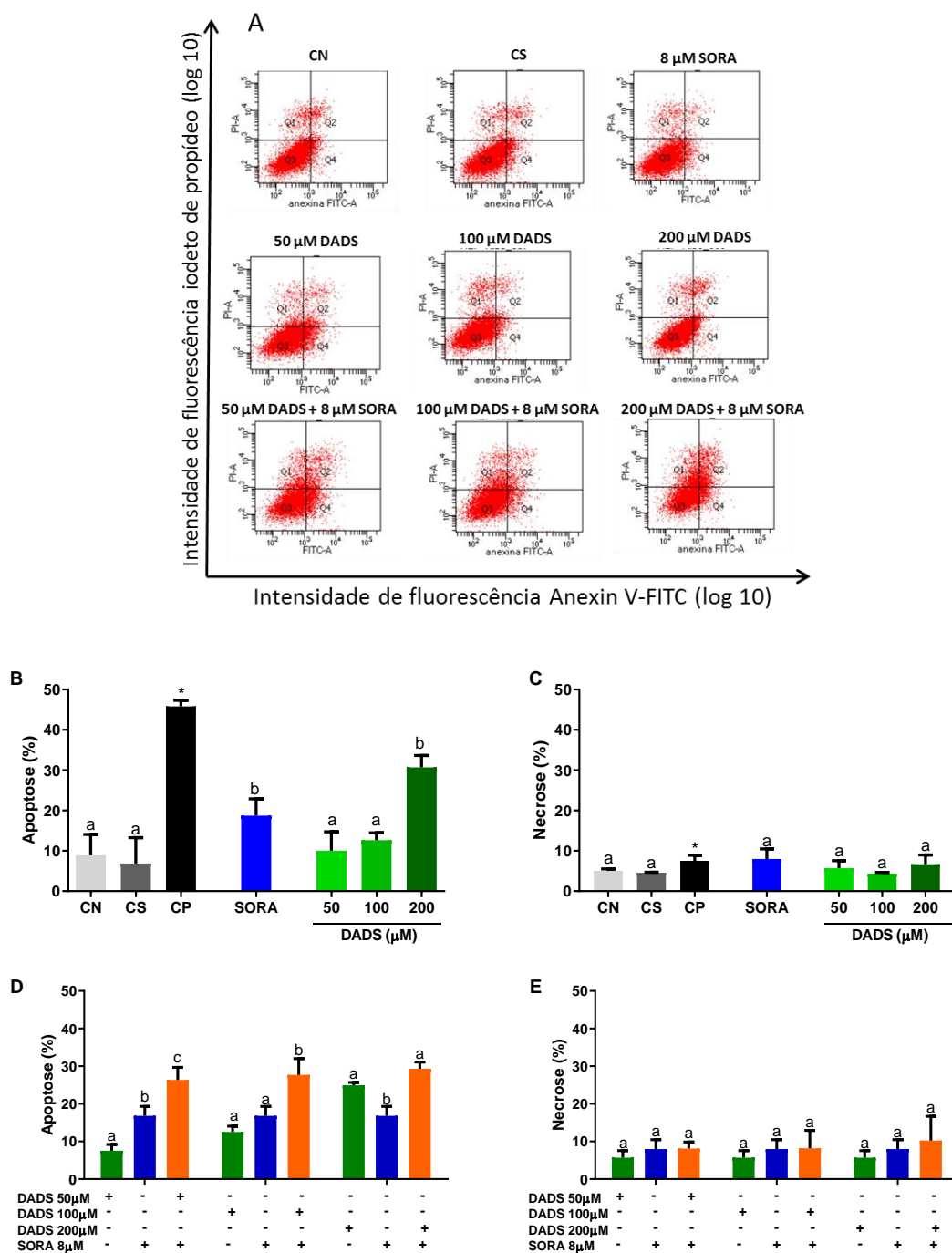
Na Figura 15A é possível observar o padrão de distribuição de células coradas com Anexina V-FITC/PI de todos os tratamentos. Os resultados mostraram aumento da taxa de células coradas com Anexina V nos tratamentos isolados com 8 µM de sorafenibe e 200 µM de dissulfeto de dialila. Nas demais concentrações testadas do composto bioativo não houve alteração significativa na indução de apoptose (Figura 15B). O controle de solvente foi

estatisticamente igual ao controle negativo, enquanto o controle positivo (doxorubicina 2 μM) demonstrou ser eficiente na indução de células apoptóticas.

Com relação aos tratamentos associados, nas concentrações de 50 e 100 μM de dissulfeto de dialila + 8 μM de sorafenibe, houve um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas quando comparadas com os dois tratamentos isolados. Na associação de 200 μM de dissulfeto de dialila + 8 μM de sorafenibe, esse efeito não foi observado, pois o tratamento isolado com dissulfeto de dialila induz a mesma porcentagem de células apoptóticas que a associação (Figura 15D).

Analisando-se a porcentagem de células marcadas com iodeto de propídeo, aqui chamadas de células necróticas, podemos observar que não há diferença estatística na indução de necrose nos grupos controle negativo, controle de solvente e tratamentos isolados com sorafenibe (8 μM) e dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) (Figura 15C). Da mesma forma que não há diferença estatística na indução de necrose nos três tratamentos associados (Figura 15E).

Figura 15. Efeito do dissulfeto de dialila isolado e associado ao sorafenibe na indução de apoptose



Caracterização do perfil de morte das células HepG2 após 72 horas de tratamento com dissulfeto de dialila, analisado pela coloração com anexina V-FITC/PI. A: Distribuição de células coradas com anexina V-FITC/PI. Quadrante inferior esquerdo: células negativas para os dois corantes. Quadrante inferior direito: células coradas com anexina V-FITC. Quadrante superior esquerdo: células PI positivas e anexina V-FITC negativa. Quadrante superior direito: células positivas para os dois corantes. B: porcentagem de células apoptóticas (Q2+Q4) em tratamento isolado. C: porcentagem de necróticas em tratamento isolado (Q1). Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way

ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). D: porcentagem de células apoptóticas (Q2+Q4) em tratamento associado. E: porcentagem de células necróticas (Q1) em tratamento associado. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). DADS: dissulfeto de dialila. Sora: 8 μM sorafenibe CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (0,25% de DMSO); CP: controle positivo (2 μM Doxorubicina). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

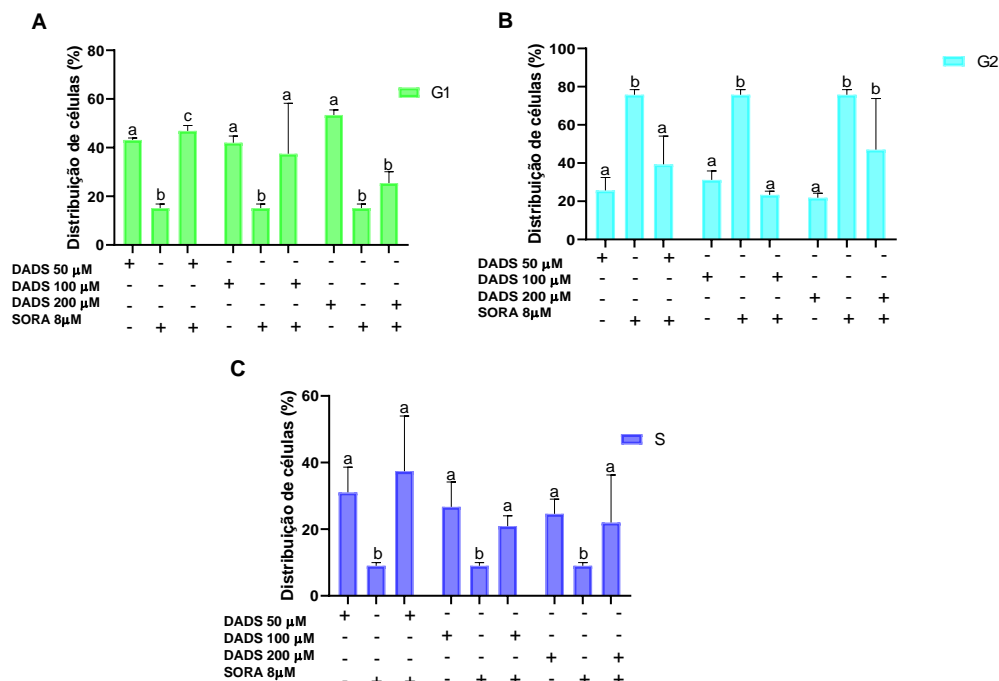
4.5 Alteração no ciclo celular por citometria de fluxo

Na fase G1 do ciclo celular, em tratamentos isolados, observamos uma diminuição do número de células tratadas com SORA quando comparado ao tratamento com DADS. O tratamento associado 50 μM DADS + 8 μM SORA aumentou ainda mais o número de células quando comparado aos tratamentos associados. As demais associações assemelharam-se aos tratamentos isolados (Figura 16C). Na fase G2, há um aumento na quantidade de células nos tratamentos 8 μM SORA e os tratamentos associados são significativamente iguais aos isolados (Figura 16D). Na fase S, há uma diminuição na porcentagem de células tratadas com SORA isolado. Não há diferença entre os tratamentos isolados e o associado na concentração 200 μM DADS + 8 μM SORA. A distribuição das células entre as fases do ciclo no controle do solvente foi igual à distribuição no controle negativo.

Figura 16. Análise da distribuição de células HepG2 entre as fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com sorafenibe e/ou dissulfeto de dialila

por citometria de fluxo

A



Regulação do ciclo celular pelo sorafenibe e dissulfeto de dialila. A, B e C: distribuição de células HepG2 em fase G1 (C), G2 (D) e S (E) do ciclo celular após tratamento associado e marcação do DNA com iodeto de propídeo. *Diferente do controle negativo (Two-way ANOVA-Dunnnett, $p < 0,05$). C, D e E: Controle negativo: meio de cultura; Controle de solvente DMSO (0,25%); SORA: sorafenibe; DADS: dissulfeto de dialila. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

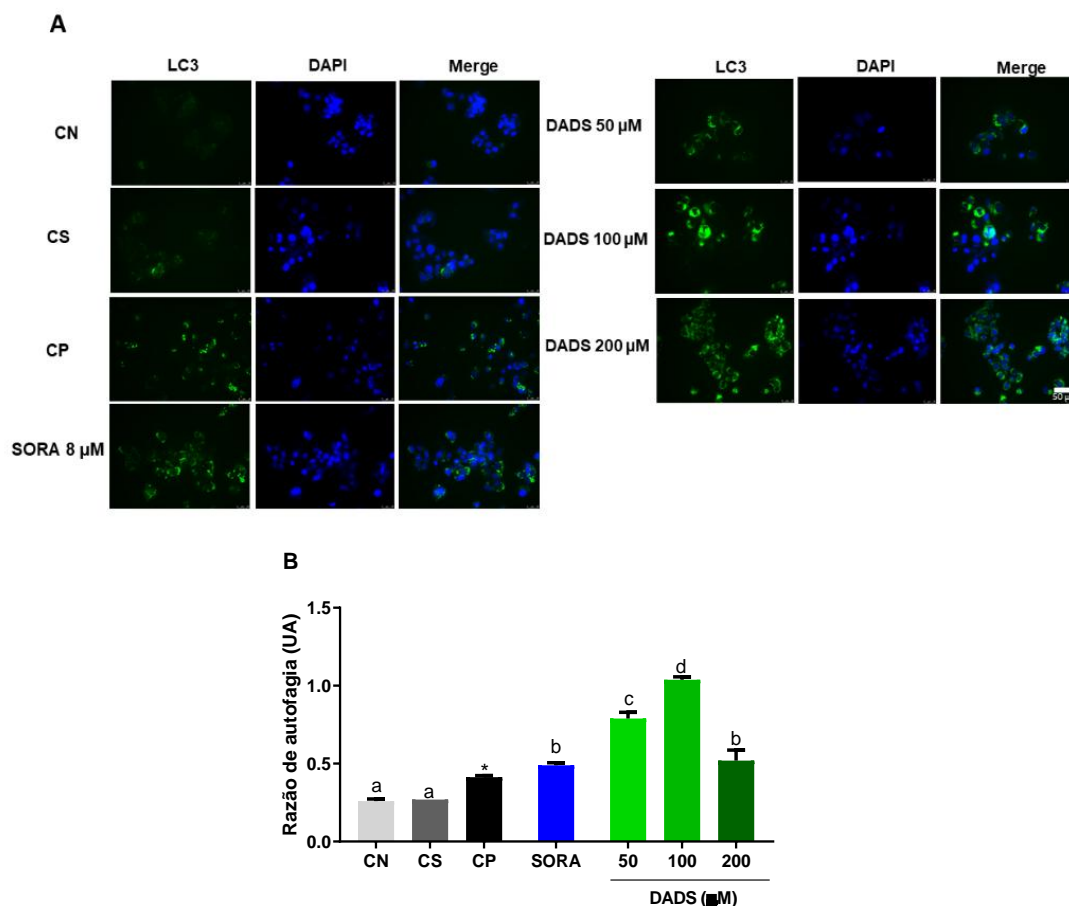
4.6 Morte celular mediada por autofagia

As análises dos resultados da indução de autofagia mostram que o DADS em todas as concentrações testadas (50, 100 e 200 μ M) induziu aumento de marcação autofágica em células HepG2. O SORA (8 μ M) também induziu aumento de células autofágica na mesma proporção que DADS 200 μ M. Os dados dos controles de solvente foram iguais aos dos controles negativos (Figura 17B).

A associação 200 μ M DADS + 8 μ M SORA foi a mais efetiva no aumento do número de células autofágicas quando comparado com os tratamentos isolados de ambos compostos. A associação 50 μ M DADS + 8 μ M SORA foi estatisticamente igual ao tratamento isolado com DADS e 100 μ M

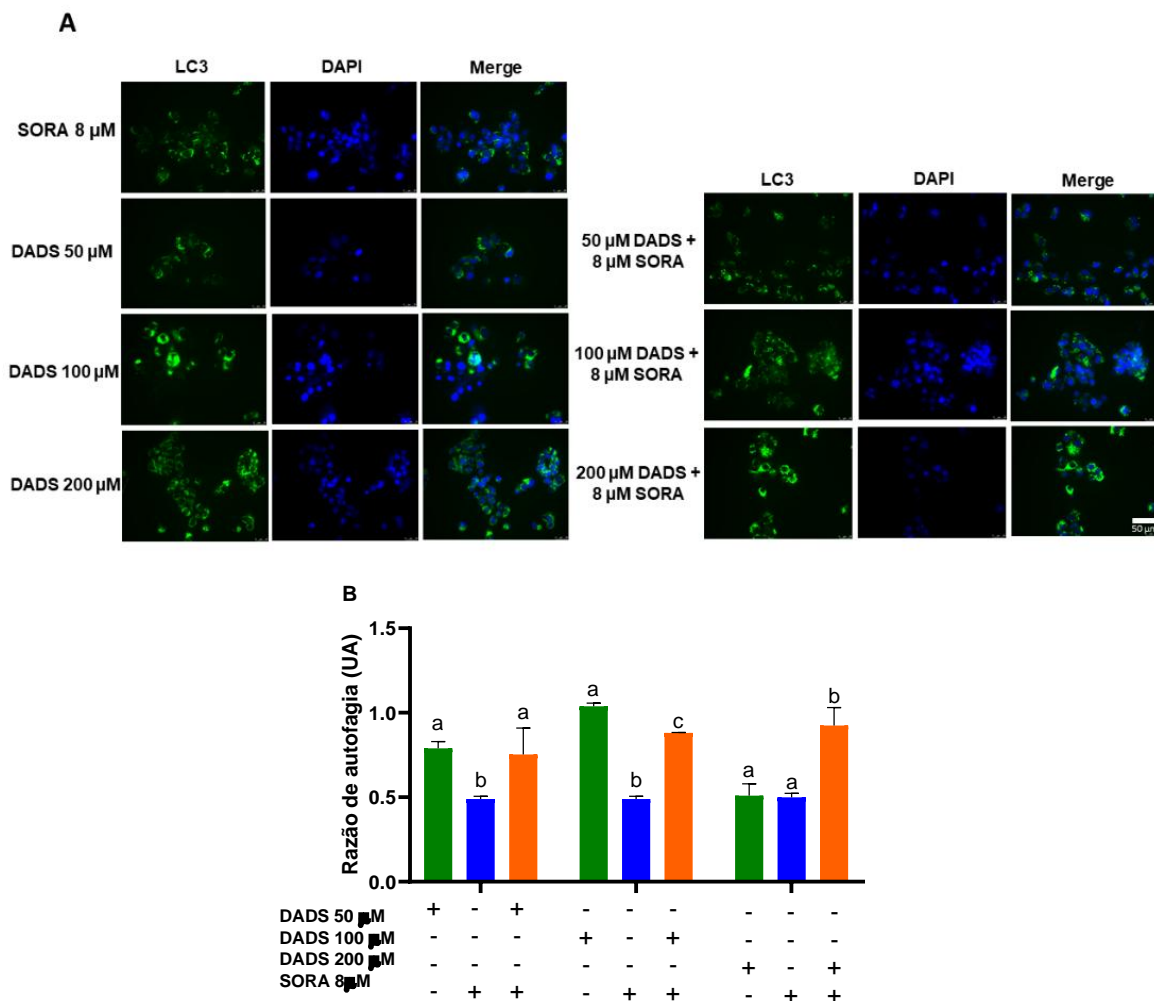
DADS + 8 μM SORA foi diferente dos tratamentos associados, mas menor que a indução pelo tratamento isolado com DADS (Figura 18B).

Figura 17. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em HepG2 após 24 horas de tratamento com sorafenibe ou dissulfeto de dialila



Morte celular induzida por autofagia após 24 horas de tratamento isolado em células HepG2. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: análise da indução de autofagia em tratamento isolado de DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (cloroquina 100 μM). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$). Barra de escala = 50 μm .

Figura 18. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em HepG2 após 24 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila

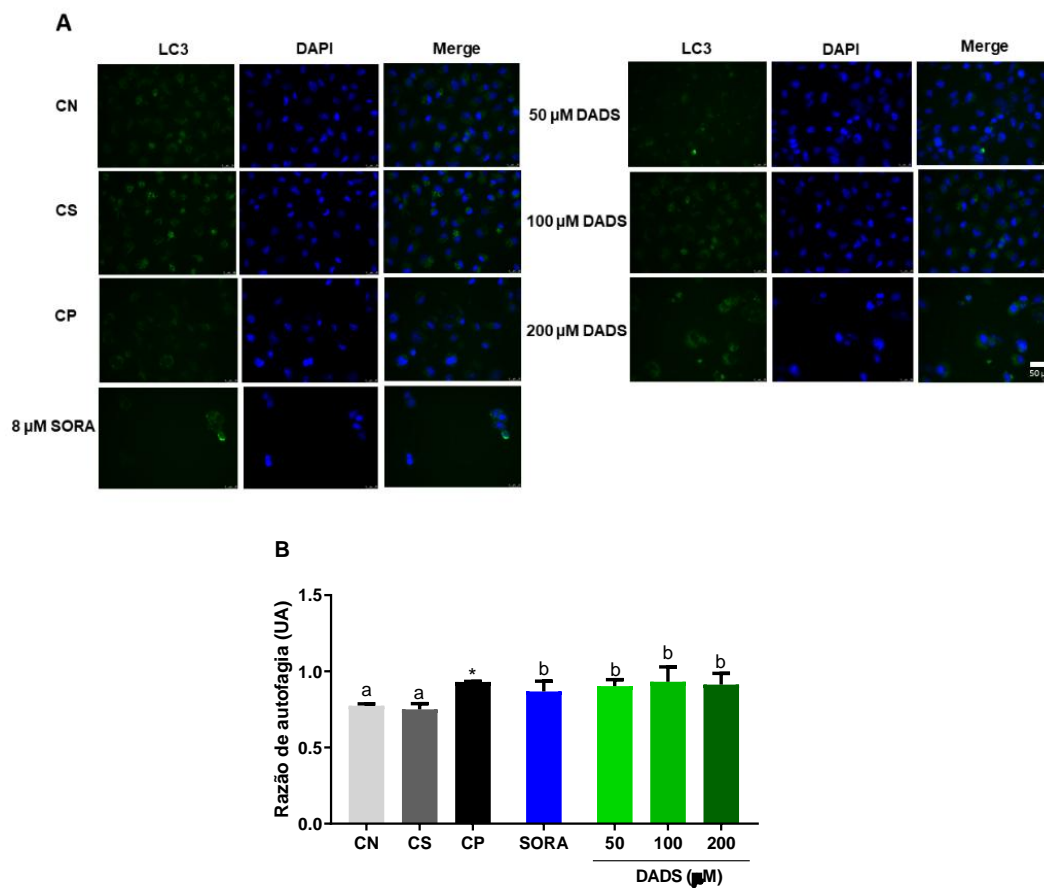


Morte celular induzida por autofagia após 24 horas de tratamento associado em células HepG2. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: análise da indução de autofagia após tratamento associado com DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). Barra de escala = 50 μm .

Em células HUVEC, temos um aumento das células autofágicas em todas as concentrações testadas de DADS e em 8 μM de SORA isolado. Não há diferenças estatísticas entre o grupo controle negativo e o grupo controle de solvente (Figura 19B). Apenas a associação SORA (8 μM) + 200 μM DADS aumentou o número de células autofágicas no tratamento associado. As demais associações não aumentaram o número de células autofágicas (Figura 20B).

Figura 19. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em

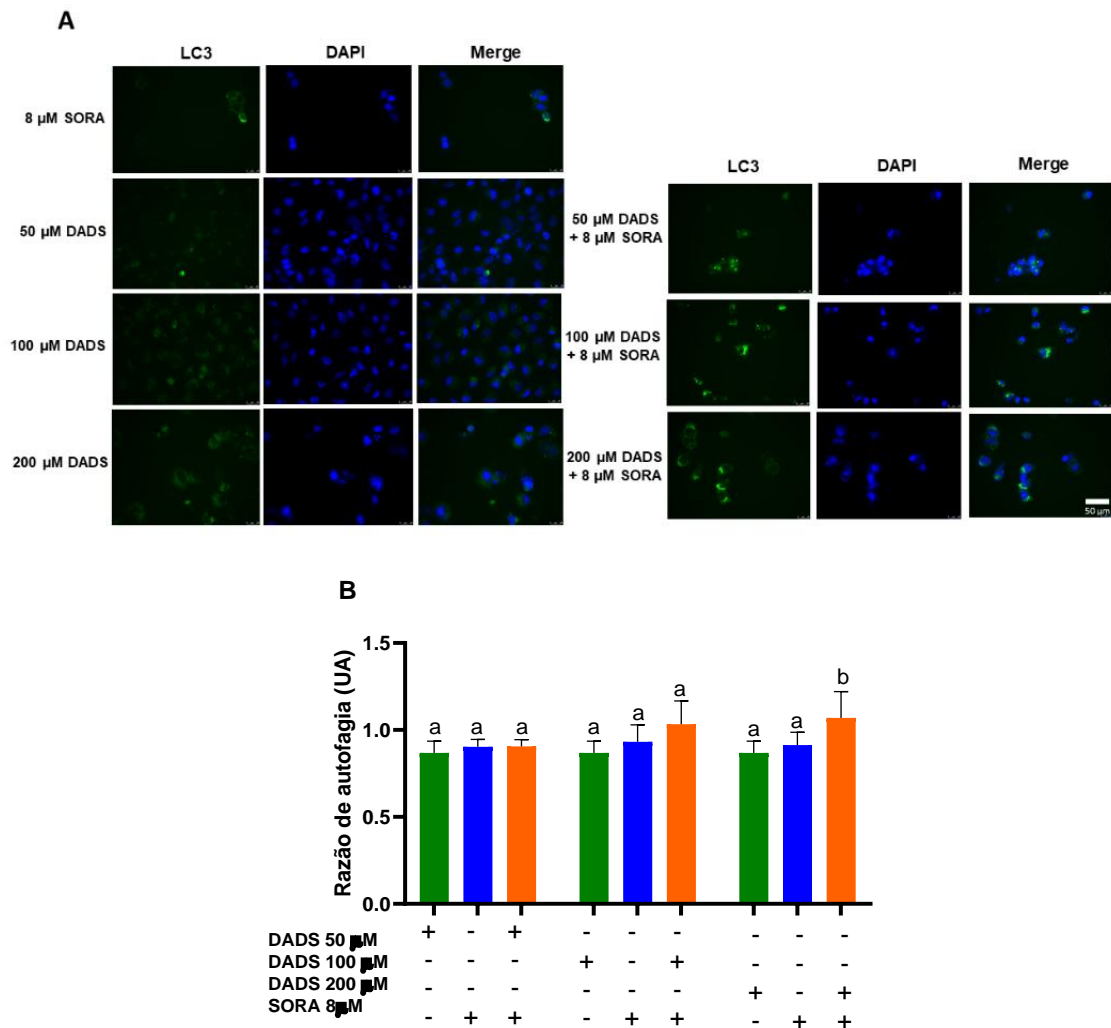
HUVEC após 24 horas de tratamento com sorafenibe ou dissulfeto de dialila



Morte celular induzida por autofagia após 24 horas de tratamento isolado em células HUVEC. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: Análise da indução de autofagia em tratamento isolado de DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (Cloroquina 100 μM). Média \pm desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$). Barra de escala = 50 μm .

Figura 20. Análise da indução de morte celular mediada por autofagia em

HUVEC após 24 horas de tratamento com sorafenibe e dissulfeto de dialila

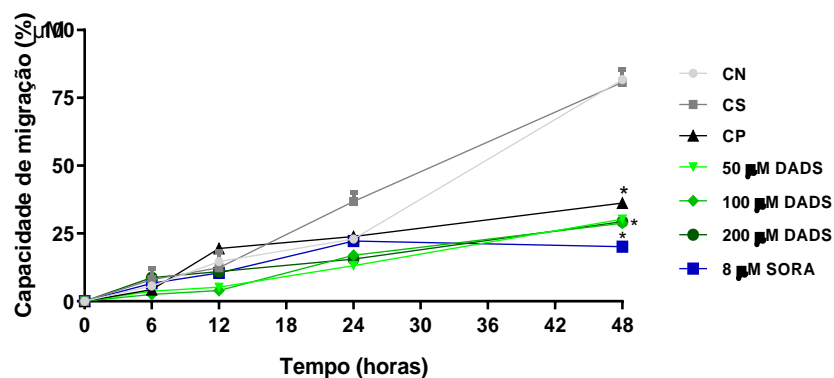
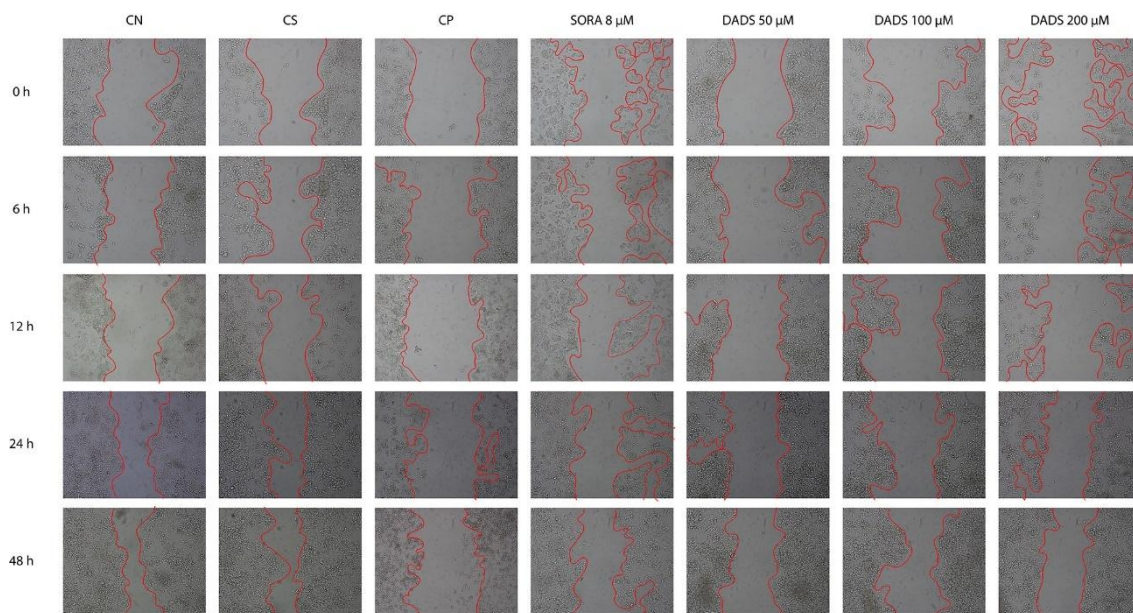


Morte celular induzida por autofagia após 24 horas de tratamento associado em células HUVEC. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: após tratamento associado com DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). Média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). Barra de escala = 50 μm.

4.7 Dissulfeto de dialila inibe a migração em tratamento isolado e associado nas células HepG2 e HUVEC

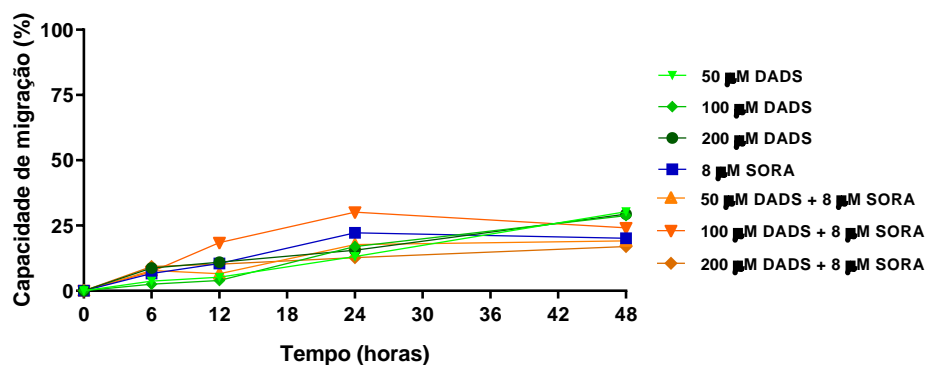
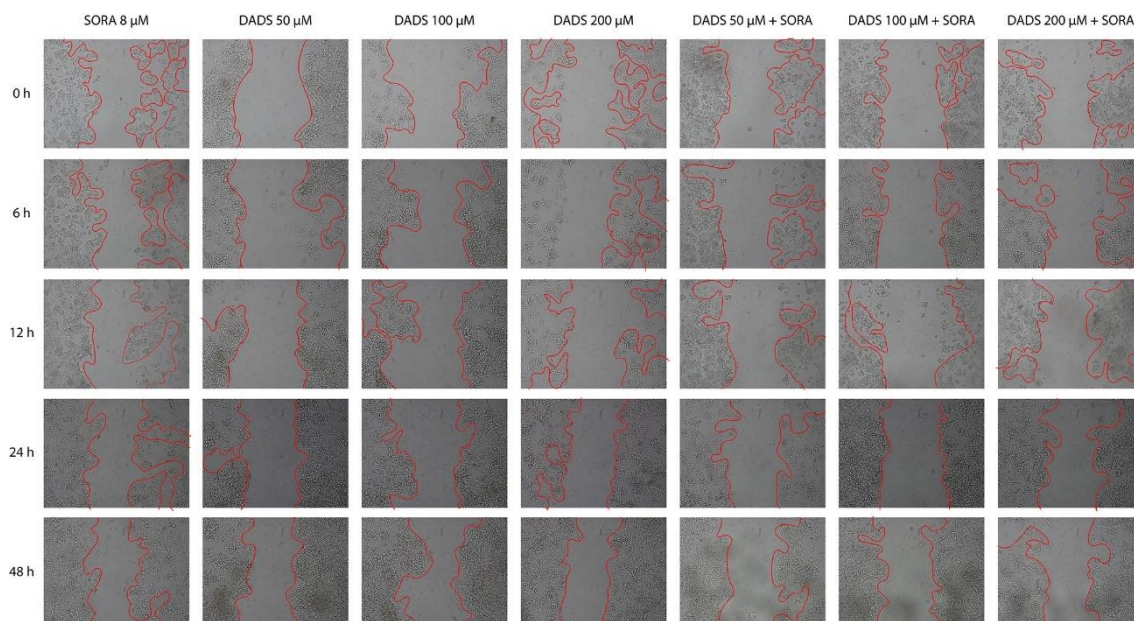
Os resultados obtidos no ensaio de *wound healing* para determinação da migração de células HepG2 e HUVEC tratadas com dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) isolado e/ou associado ao sorafenibe (8 μM), nos tempos de 0 a 48 horas estão apresentados nas Figuras 21, 22, 23 e 24 respectivamente.

Figura 21. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila e sorafenibe isolados na migração de células HepG2



Quantificação da migração relativa por cicatrização após tratamento com diferentes concentrações de dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (8 μM) isolados em 0, 6, 12, 24 e 48 horas. A cicatrização (%) foi identificada a partir de medições da distância de migração das células HepG2 do grupo controle em relação aos grupos tratados. CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média \pm desvio padrão ($n=3$), $p<0,05$ One-way ANOVA e pós teste de Dunnett. *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

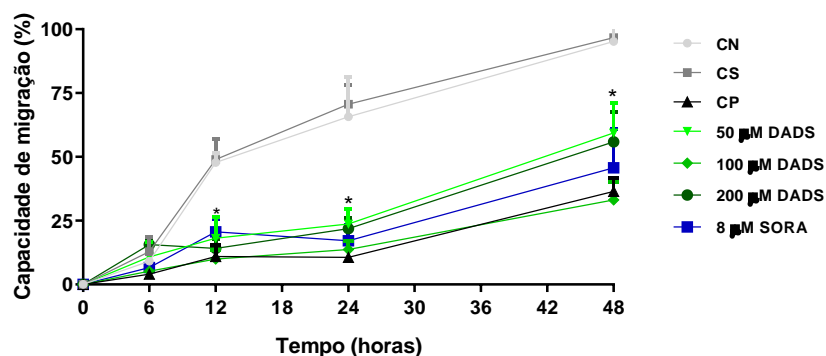
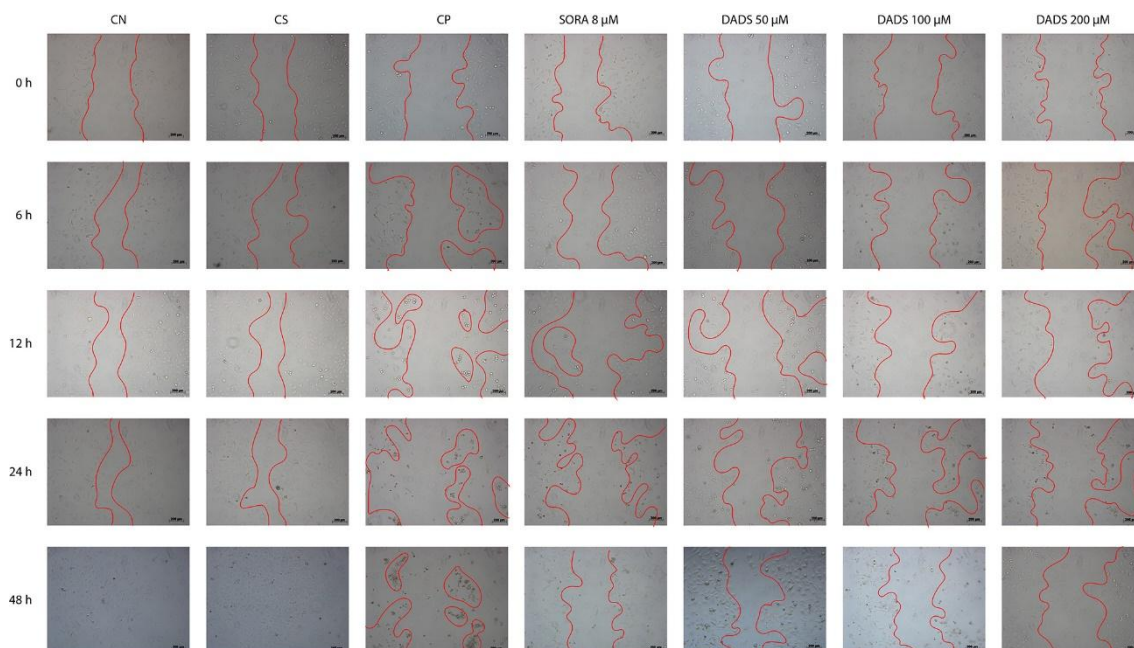
Figura 22. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila associado ao sorafenibe na migração de células HepG2



Quantificação da migração relativa por cicatrização após tratamento com diferentes concentrações de dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (8 μM) associados em 0, 6, 12, 24 e 48 horas. A cicatrização (%) foi identificada a partir de medições da distância de migração das células HepG2 do grupo controle em relação aos grupos tratados. CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média \pm desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ One-way ANOVA e pós teste de Dunnett. *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

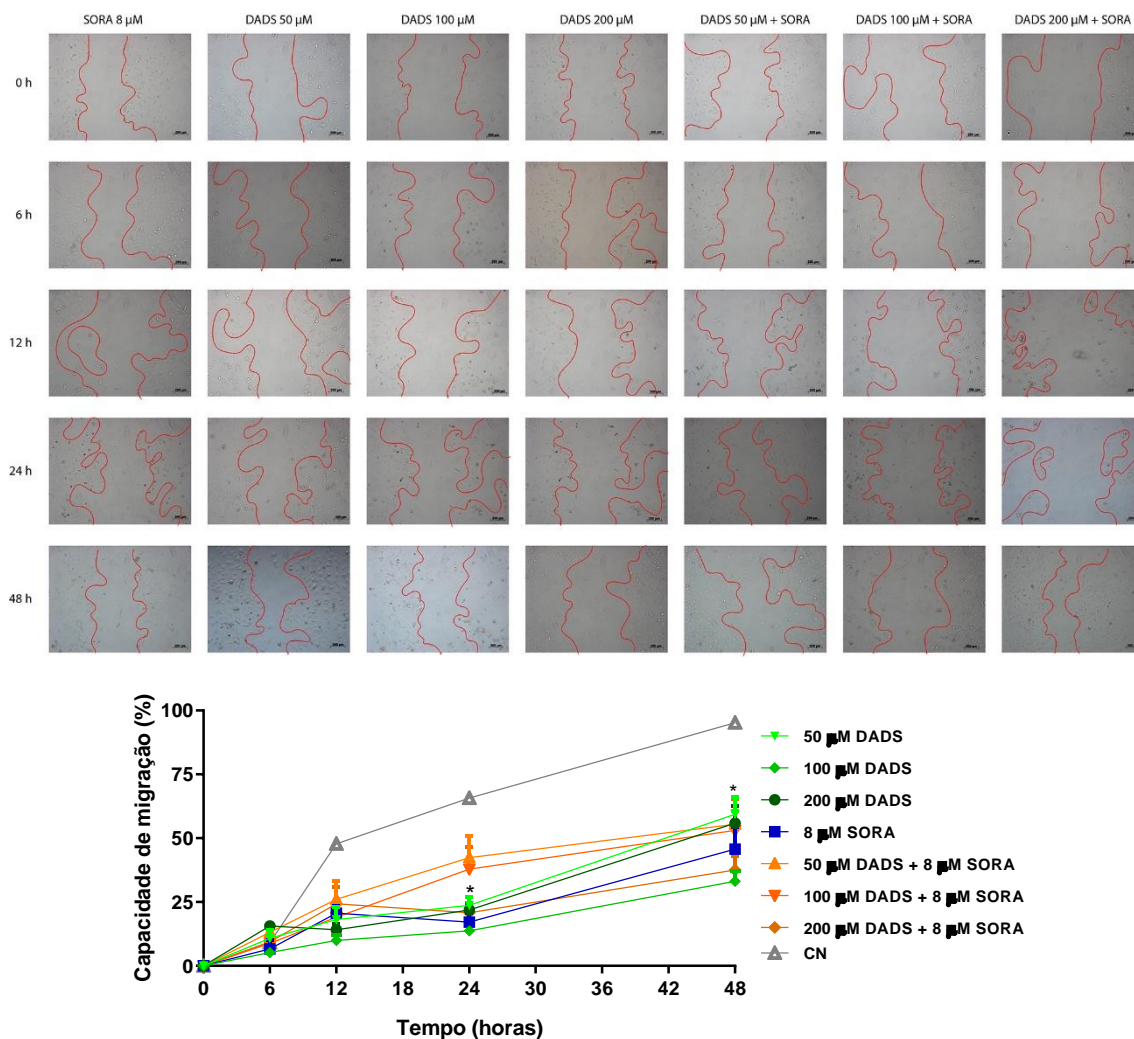
O tratamento com dissulfeto de dialila nas três concentrações testadas reduziu de maneira significativa a migração das células HepG2 em 48 horas de tratamento, assim como o tratamento com sorafenibe isolado e a associação dos dois compostos. Nos demais tempos avaliados não houve redução significativa da migração das células HepG2 dos grupos tratados, quando comparados ao controle negativo.

Figura 23. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila isolado e do sorafenibe na migração de células HUVEC



Quantificação da migração relativa por cicatrização após tratamento com diferentes concentrações de dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (8 μM) isolados em 0, 6, 12, 24 e 48 horas. A cicatrização (%) foi identificada a partir de medições da distância de migração das células HUVEC do grupo controle em relação aos grupos tratados. CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média ± desvio padrão (n=3), p<0,05 One-way ANOVA e pós teste de Dunnett. *Diferente do controle negativo (teste *t* de Student, p <0,05).

Figura 24. Efeito inibitório do dissulfeto de dialila associado ao sorafenibe na migração de células HUVEC



Quantificação da migração relativa por cicatrização após tratamento com diferentes concentrações de dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM), associado ao sorafenibe (8 μM) em 0, 6, 12, 24 e 48 horas. A cicatrização (%) foi identificada a partir de medições da distância de migração das células HUVEC do grupo controle em relação aos grupos tratados. CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média \pm desvio padrão (n=3), $p < 0,05$ One-way ANOVA e pós teste de Dunnett. *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

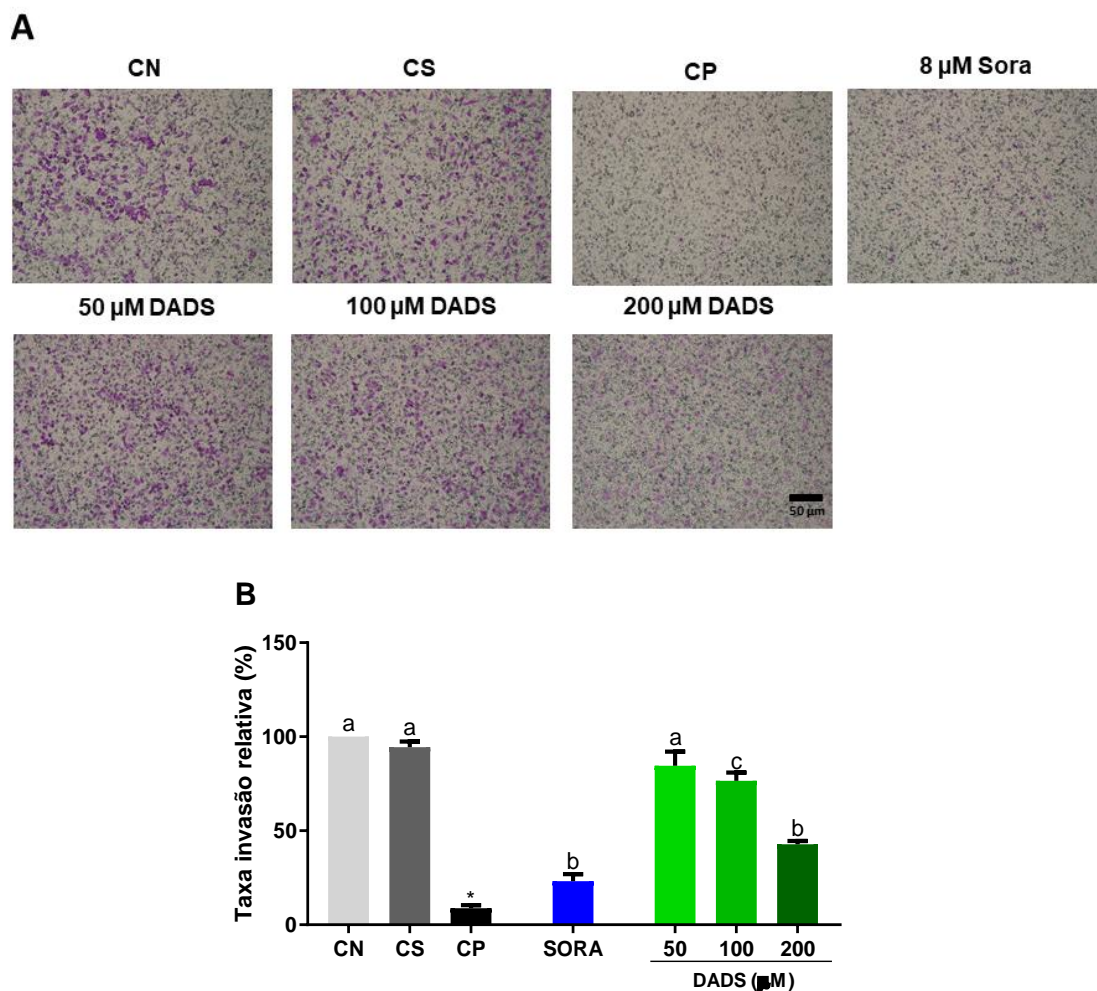
Em células HUVEC, a partir de 12h, todos os tratamentos isolados e associados diminuíram a migração celular. O dissulfeto de dialila isolado (50 e 100 μM) foi capaz de inibir a migração das células em 24 horas de tratamento, enquanto a associação com o sorafenibe não foi capaz de produzir mesmo efeito (Figura 24B). O tratamento com 200 μM foi eficiente na inibição da migração das células HUVEC tanto isolado quanto associado ao sorafenibe.

Em 48 horas de tratamento, todas as concentrações de dissulfeto de dialila reduziram a migração das células, da mesma maneira que a associação dos compostos. O sorafenibe isolado também inibiu a migração celular em 24 e 48 horas de tratamento.

4.8 Invasão celular

Em células HepG2, em tratamento isolado, podemos observar uma diminuição da invasão celular no tratamento isolado de SORA e 100 μM e 200 μM de DADS (Figura 25B).

Figura 25. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HepG2 em tratamento isolado

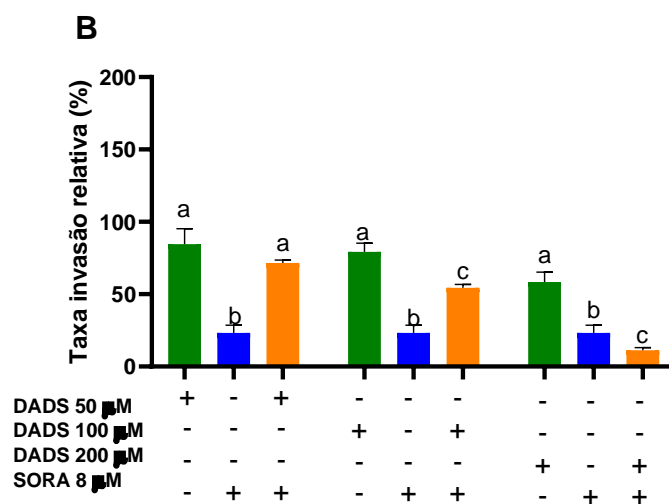
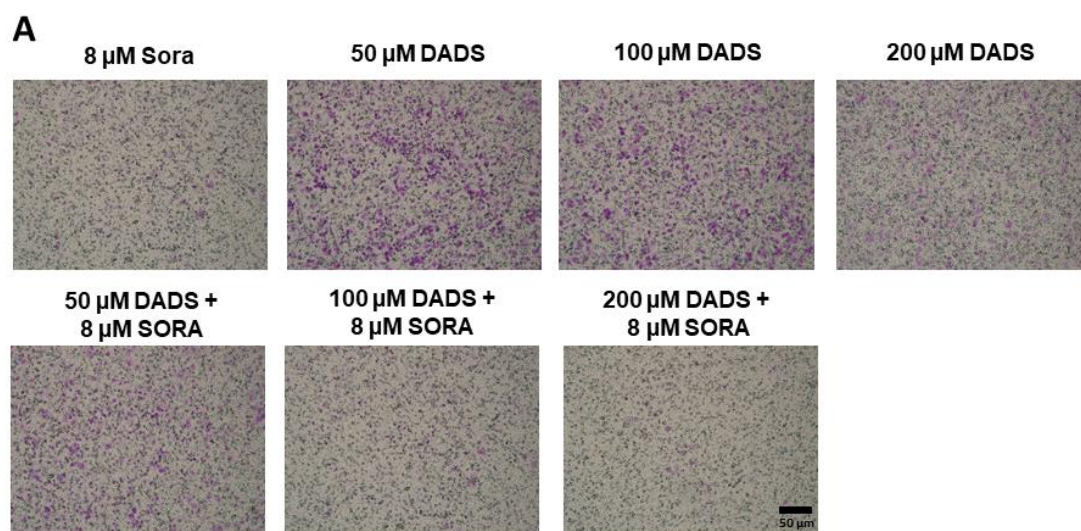


Invasão celular mediada por inserto em células HepG2. A: células vermelhas coradas com cristal violeta 0,2% são células fixadas na porção inferior do

inserto após 24 horas de tratamento. B: análise da indução invasão em tratamento isolado de DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (meio sem soro). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$). Barra de escala = 50 μm .

O sorafenibe isolado induziu menor taxa de invasão do que o tratamento associado nas combinações 50 μM DADS + 8 μM SORA e 100 μM DADS + 8 μM SORA. A maior combinação testada (200 μM DADS + 8 μM SORA) teve a mesma taxa de inibição da invasão que o sorafenibe isolado (Figura 26B).

Figura 26. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HepG2 em tratamento associado

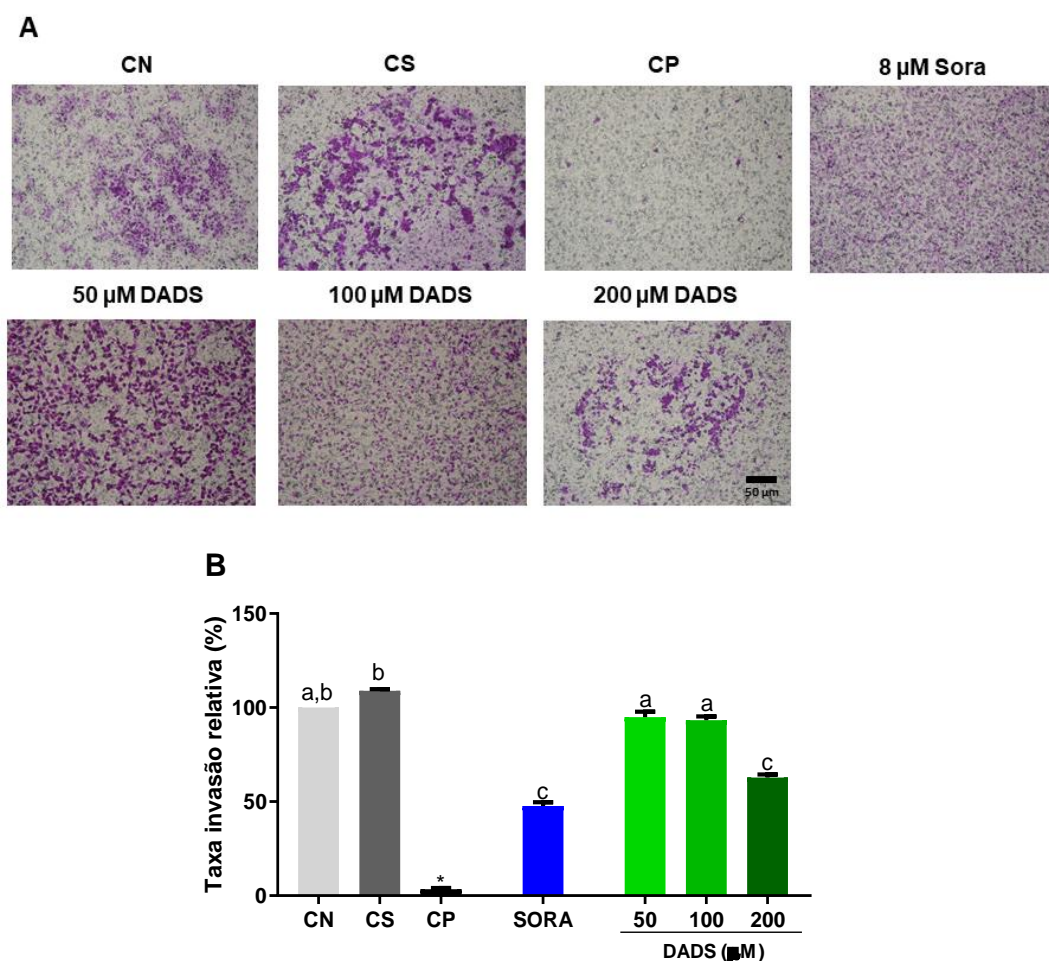


Invasão celular mediada por inserto em células HepG2. A: células vermelhas coradas com cristal violeta 0,2% são células fixadas na porção inferior do

inserto após 24 horas de tratamento. B: análise da indução invasão em tratamento associado de DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). Barra de escala = 50 μm .

Em células HUVEC, quando comparada ao controle negativo, há uma diminuição da porcentagem de invasão no tratamento isolado de SORA e no tratamento isolado com 200 μM DADS (Figura 27B).

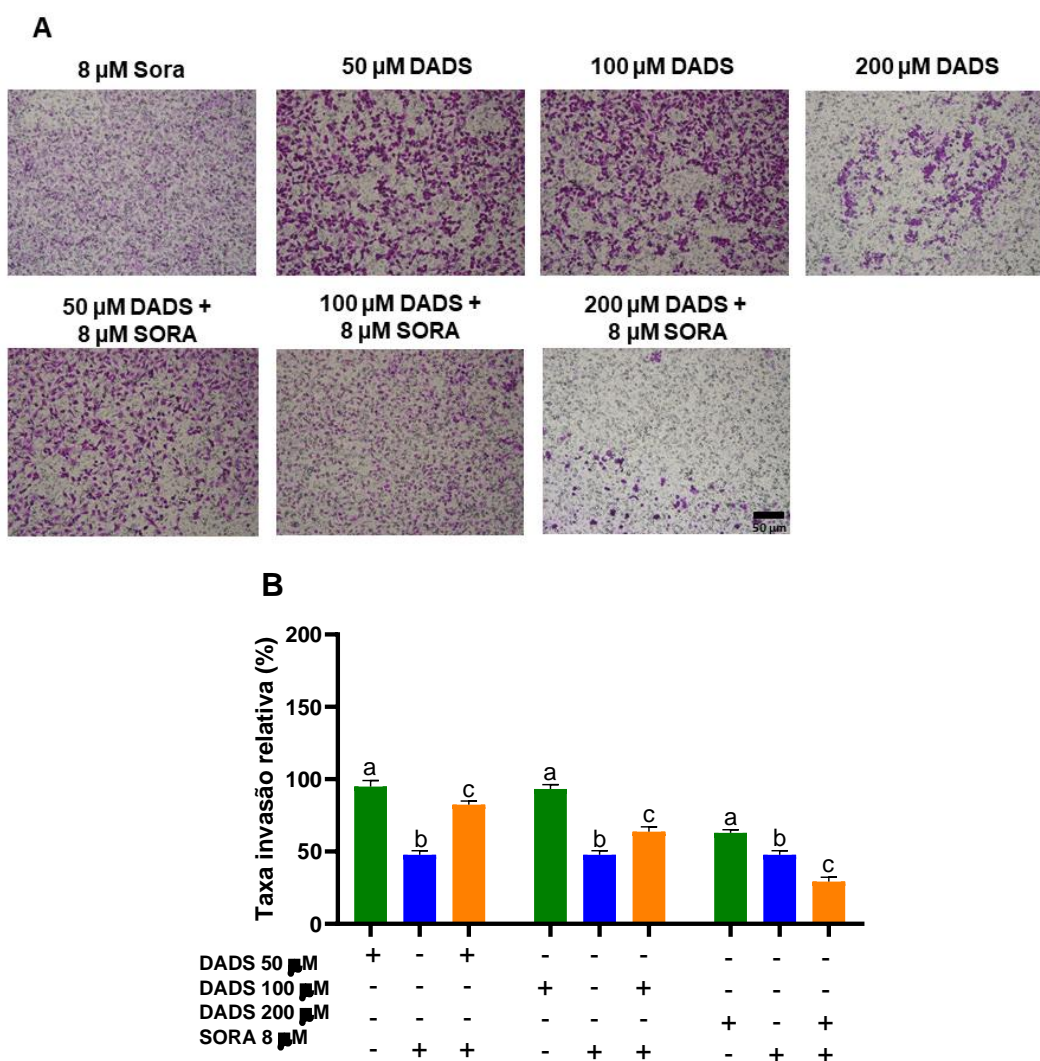
Figura 27. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HUVEC em tratamento isolado



Invasão celular mediada por inserto em células HUVEC. A: células vermelhas coradas com cristal violeta 0,2% são células fixadas na porção inferior do inserto após 24 horas de tratamento. B: análise da indução invasão em tratamento isolado de DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (meio de cultura sem soro). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). *Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$). Barra de escala = 50 μm .

No tratamento associado, a maior combinação testada (200 μM DADS + 8 μM SORA) induziu menor taxa de invasão que os tratamentos isolados com DADS e SORA. As outras duas combinações (50 μM DADS + 8 μM SORA e 100 μM DADS + 8 μM SORA) tiveram maior taxa de invasão que o tratamento isolado com SORA e menor taxa de invasão que os respectivos tratamentos isolados com DADS (Figura 28B).

Figura 28. Análise da invasão celular mediada por inserto em células HUVEC em tratamento associado



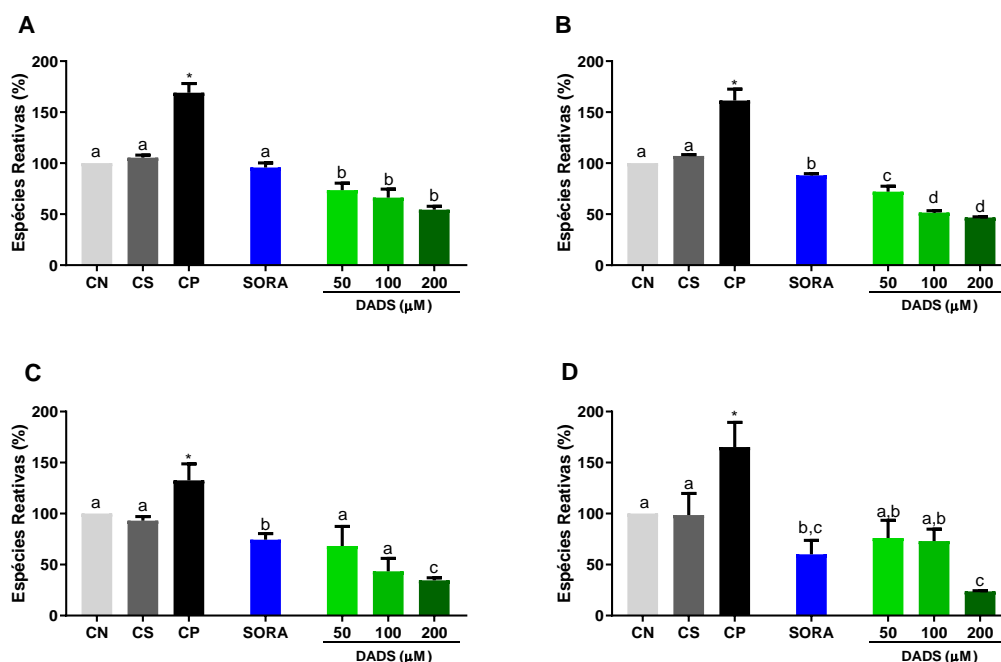
Invasão celular mediada por inserto em células HUVEC. A: células vermelhas coradas com cristal violeta 0,2% são células fixadas na porção inferior do inserto após 24 horas de tratamento. B: análise da indução invasão em tratamento associado de DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (SORA: 8 μM). Média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). Barra de

escala = 50 μm .

4.9 Estresse oxidativo em células HepG2

Os resultados mostram que o sorafenibe (8 μM) e o dissulfeto de dialila (50, 100 e 200 μM) não induziram aumento de espécies reativas após 2, 3, 4 e 24 horas de tratamento. Pelo contrário, há uma redução significativa das espécies reativas nos tratamentos de sorafenibe e dissulfeto de dialila isolados quando comparados ao controle negativo em todos os tempos de tratamento testados. O controle positivo foi significativamente diferente do controle negativo. A porcentagem de espécies reativas do controle de solvente é estatisticamente igual à porcentagem observada no controle negativo (Figura 29).

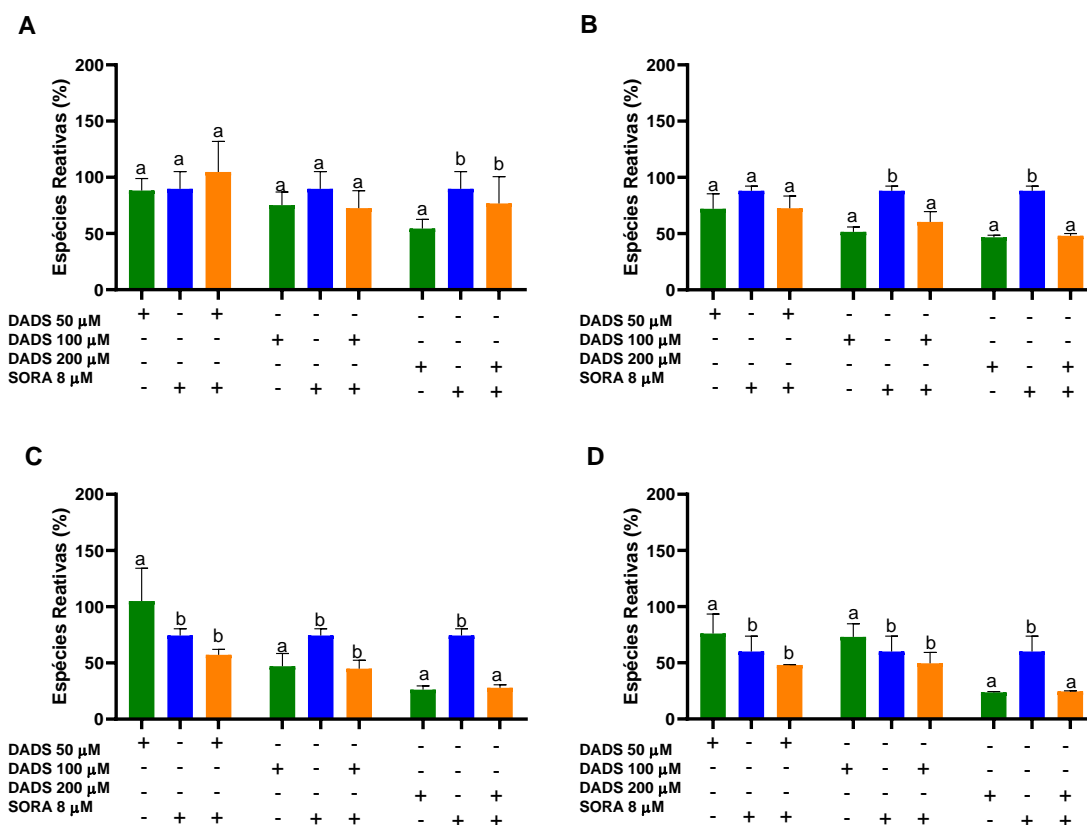
Figura 29. Análise da produção de espécies reativas em células HepG2 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sorafenibe e dissulfeto de dialila utilizando o marcador CM-H₂DCFDA



Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). *Diferente do controle negativo (Teste t de Student, $p < 0,05$). SORA: sorafenibe 8 μM ; DADS: dissulfeto de dialila; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (peróxido de hidrogênio 1mM). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Analisando-se a indução de espécies reativas no protocolo de tratamento associado, observa-se que a associação dos compostos não foi capaz de induzir estresse oxidativo quando comparado ao tratamento isolado com sorafenibe ou dissulfeto de dialila em 2 horas de tratamento (Figura 30A). Em 3 horas de tratamento (Figura 30B), as associações sorafenibe 8 μM + dissulfeto de dialila 100 μM e sorafenibe 8 μM + dissulfeto de dialila 200 μM induziram menor número de espécies reativas que o tratamento isolado com sorafenibe. Na menor associação testada (sorafenibe 8 μM + dissulfeto de dialila 50 μM) não houve diferença estatística entre o tratamento associado dos tratamentos isolados. Em 4 (Figura 30C) e 24 horas (Figura 30D) de tratamento, as associações sorafenibe 8 μM + dissulfeto de dialila 50 ou 100 μM induziram a mesma quantidade de espécies reativas que o tratamento isolado com sorafenibe. A associação 200 μM DADS + 8 μM SORA foi estatisticamente igual ao tratamento isolado com DADS.

Figura 30. Análise da produção de espécies reativas em células HepG2 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sorafenibe associado ao dissulfeto de dialila utilizando o marcador CM-H₂DCFDA



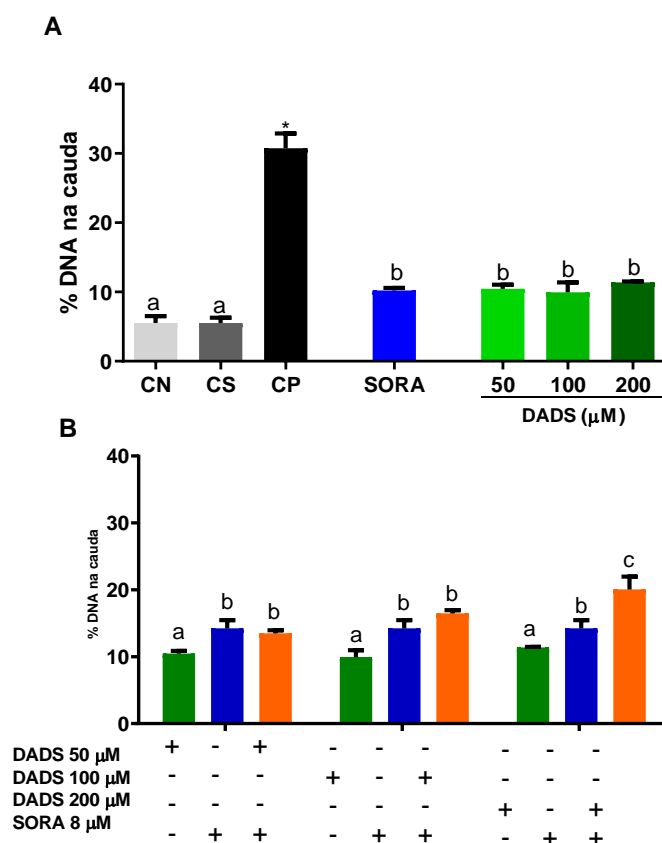
Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo

(Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). SORA: sorafenibe 8 μM ; DADS: dissulfeto de dialila. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.10 Dissulfeto de dialila induz danos ao DNA em células HepG2

Em comparação com o controle negativo, DADS nas três concentrações testadas e SORA sozinho aumentou significativamente o dano ao DNA em células HepG2 após 24 horas de tratamento, o controle de solvente não alterou a taxa de dano ao DNA e o controle positivo efetivamente induziu dano ao DNA (Figura 31A). Em comparação com SORA 8 μM sozinho, sua combinação com DADS 200 μM aumentou o dano ao DNA, mas sua combinação com DADS 50 e 100 μM não alterou os níveis de dano ao DNA (Figura 31B).

Figura 31. Efeito do dissulfeto de dialila e do sorafenibe na indução de danos ao DNA



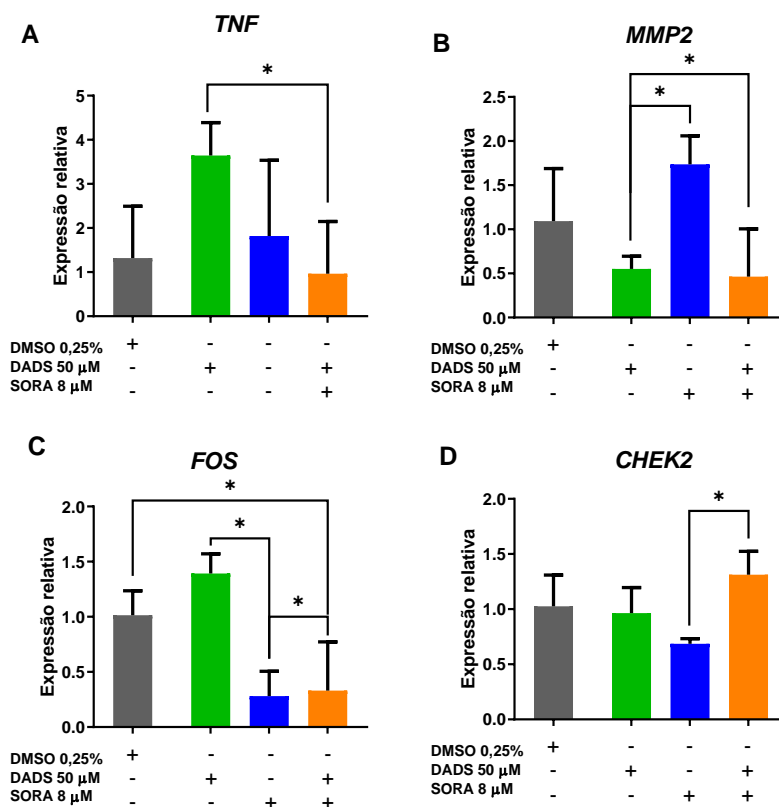
Porcentagem de DNA na cauda em células HepG2. A: após tratamento com dissulfeto de dialila (DADS: 50, 100 e 200 μM) ou sorafenibe (SORA: 8 μM) isolados por 24 horas. Média \pm desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferença significativa (One-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$). *Diferente do

controle negativo (teste *t* de Student, $p < 0,05$). B: após tratamento associado com DADS (50, 100 e 200 μM) e sorafenibe (Sora: 8 μM) por 24 horas. CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS-300 μM). Média \pm desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (Two-way ANOVA-Tukey, $p < 0,05$).

4.11 Análise da expressão relativa de genes

A análise da expressão relativa de genes diferencialmente expressos em células HepG2 está apresentada na Figura 32. Há uma diminuição na expressão relativa de TNF do grupo associado (50 μM DADS + 8 μM SORA) quando comparado ao tratamento isolado com DADS (Figura 32A). Podemos observar uma diminuição na expressão relativa de MMP2 do grupo tratado com 50 μM DADS e 50 μM DADS + 8 μM SORA quando comparado ao grupo tratado com 8 μM SORA isolado (Figura 32B). Na análise de expressão de FOS, há uma diminuição na associação 200 μM DADS + 8 μM SORA quando comparado ao controle e na comparação do tratamento isolado com DADS e SORA. Há um aumento da sua expressão na associação quando comparado ao tratamento SORA isolado (Figura 32C). Houve um aumento na expressão de CHEK2 no tratamento associado quando comparado ao grupo tratado com SORA (Figura 32D).

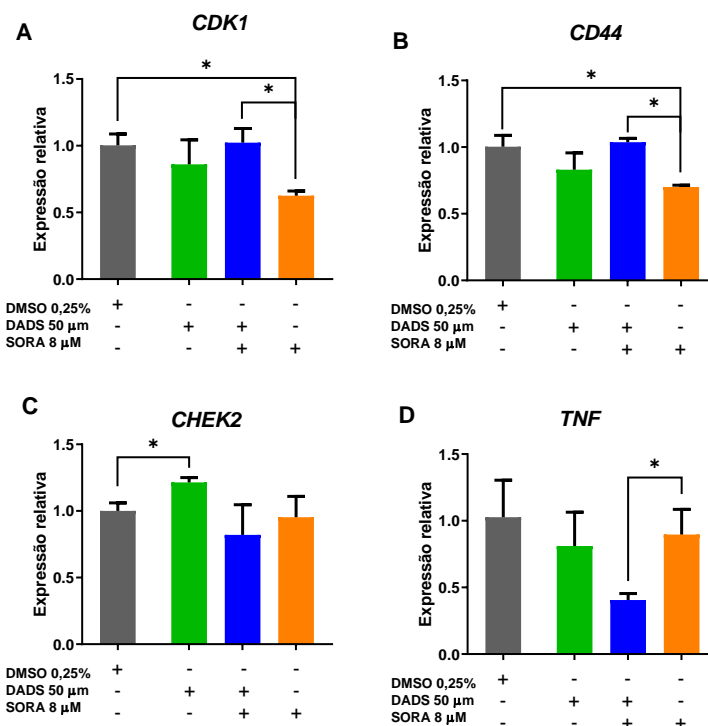
Figura 32. Análise da expressão relativa de genes em células HepG2



Expressão relativa dos genes *TNF*, *MMP2*, *FOS2* e *CHEK2* em relação aos genes de referência *ACTB*, *GAPDH* e *HPRT1* em células HepG2 tratadas com DADS, SORA e sua associação por 24 horas. Controle de solvente: DMSO 0,25%, DADS: 50 μ M dissulfeto de dialila, SORA: 8 μ M sorafenibe. * $P < 0,05$ (test *t* student).

Em células HUVEC, há uma diminuição na expressão relativa de CDK1 (Figura 33A) e CD44 (Figura 33B) no grupo tratado com 50 μ M DADS + 8 μ M SORA em relação ao grupo controle e sorafenibe isolado. Com relação a expressão de CHEK2, há um aumento da sua expressão quando comparado o grupo controle ao DADS (Figura 33C). Houve um aumento na expressão de TNF no grupo tratado com DADS + SORA em relação ao grupo tratado com SORA (Figura 33D).

Figura 33. Análise da expressão relativa de genes em células HUVEC



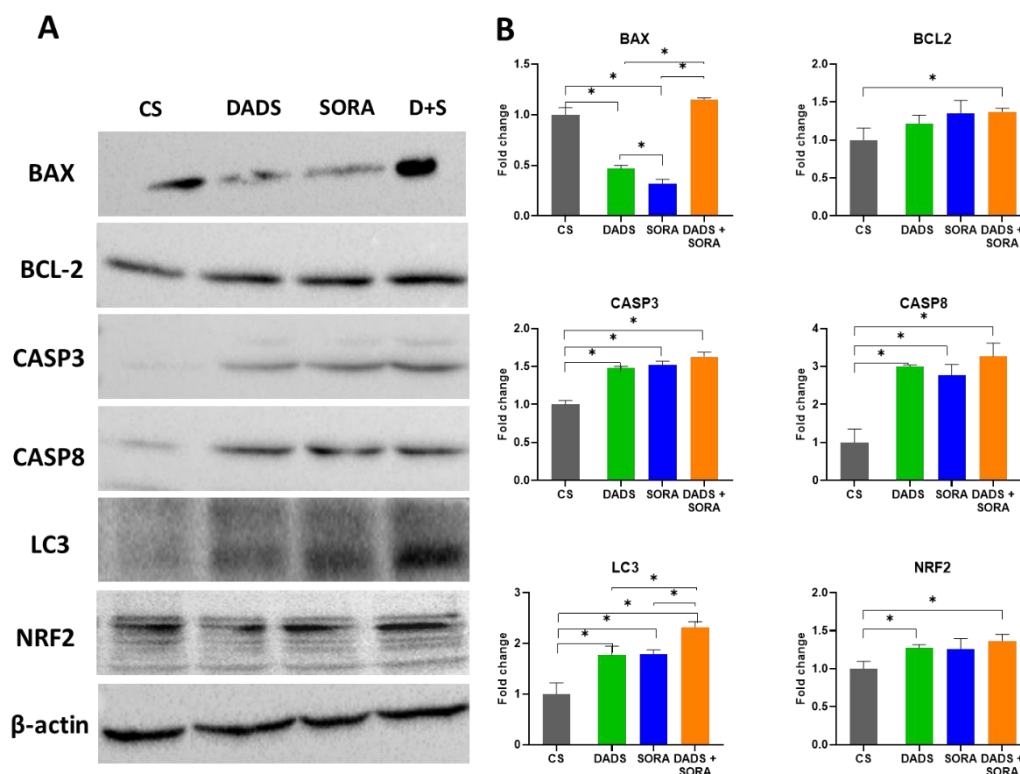
Expressão relativa dos genes *TNF*, *MMP2*, *FOS2* e *CHEK2* em relação aos genes de referência *ACTB*, *GAPDH* e *HPRT1* em células HUVEC tratadas com DADS, SORA e sua associação por 24 horas. Controle de solvente: DMSO 0,25%, DADS: dissulfeto de dialila, SORA: sorafenibe. * $P < 0,05$ (test t student).

4.12 Análise da expressão de proteínas

As análises de proteínas que mostram alteração na sua expressão em células HepG2 estão apresentadas na Figura 34.

Podemos observar que há uma diminuição na expressão de BAX dos tratamentos isolados em relação ao controle. E um aumento na expressão de BAX do tratamento associado quando comparado aos tratamentos isolados. Há um aumento na expressão de BCL2 comparando-se o tratamento associado com o controle. Todos os tratamentos testados aumentaram a expressão de CASP3 e CASP8 em relação ao controle. Há um aumento na expressão de LC3 de todos os grupos quando comparados ao controle e uma maior expressão da proteína do grupo associado, quando comparado aos tratamentos isolados. ACTB foi usado como proteína de referência e podemos observar que a sua expressão se mantém estável entre os grupos tratado e o controle de solvente.

Figura 34. Análise de *Western blot* de células HepG2 após tratamento combinado com dissulfeto de dialila e sorafenibe por 24 horas

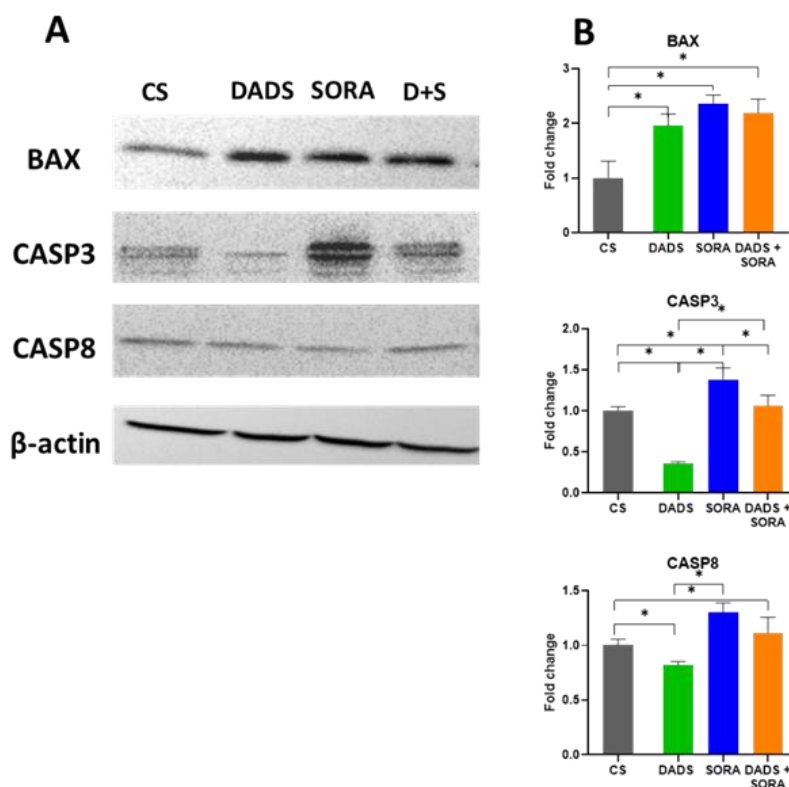


A: Representação das bandas das proteínas analisadas por western blot. B: Fold change da quantificação das bandas de proteína utilizando o ImageJ. CS: DMSO 0,25%; DADS: dissulfeto de dialila 50 μ M; SORA: sorafenibe 8 μ M. Resultados representativos de três experimentos independentes com resultados semelhantes.

As análises de proteínas que tiveram alteração na sua expressão em células HUVEC estão apresentadas na Figura 35. Podemos observar um aumento na expressão de BAX em todos os grupos tratados em relação ao controle. Há uma diminuição na expressão de CASP3 do grupo DADS e aumento na expressão da proteína nos grupos SORA e associado quando comparados ao controle. Há um aumento na expressão de BAX no tratamento associado e SORA quando comparado ao DADS isolado e uma diminuição na sua expressão no tratamento associado comparado ao SORA. Na expressão de CASP8, observamos uma diminuição na sua expressão no grupo DADS e um aumento no tratamento associado quando comparadas ao controle. Há um aumento da sua expressão no tratamento com SORA quando comparado ao tratamento com DADS. ACTB foi usado como controle e não observamos

diferença entre os grupos tratados e o controle.

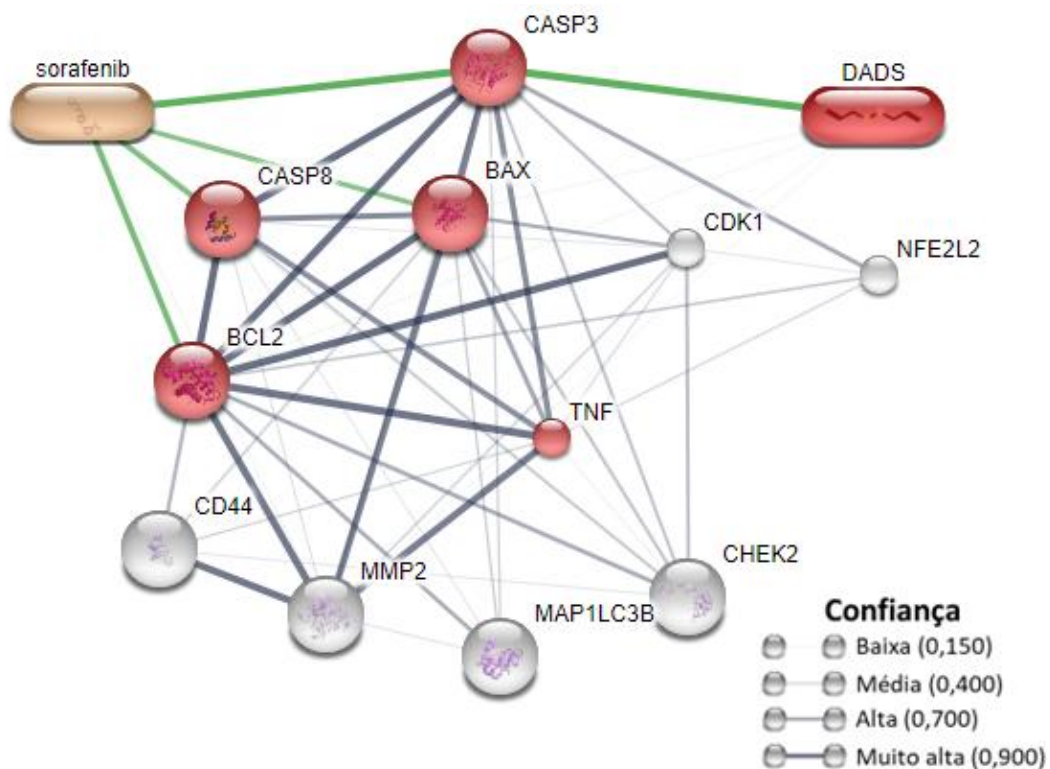
Figura 35. Análise de *Western blot* de células HUVEC após tratamento combinado com dissulfeto de dialila e sorafenibe por 24 horas



Análise de *Western blot* de células HUVEC após tratamento combinado com dissulfeto de dialila e sorafenibe por 24 horas. A: Representação das bandas das proteínas analisadas por western blot. B: Fold change da quantificação das bandas de proteína utilizando o ImageJ. CS: DMSO 0,25%; DADS: dissulfeto de dialila 50 μ M; SORA: sorafenibe 8 μ M. Resultados representativos de dois experimentos independentes com resultados semelhantes.

A rede de interações preditas construída utilizando a base de dados STITCH demonstrou que as interações entre os compostos, genes e proteínas estudadas formam um grupo biologicamente conectado (Figura 36), apresentando mais interações do que o esperado (observadas/esperadas 41/16) ($p < 0,001$), com coeficiente de agrupamento igual a 0,839, e vias de sinalização em câncer e regulação de morte celular por apoptose (<http://stitch.embl.de/cgi/network.pl?taskId=4YBoIFxEgZ99>).

Figura 36 - Rede de interações preditas entre dissulfeto de dialila, sorafenibe, genes e proteínas utilizando a base de dados STITCH



Interações entre proteínas estão representadas como linhas cinzas. Interações entre os compostos e as proteínas estão representadas como linhas verdes.

Fonte: STITCH (<http://stitch.embl.de>)

5. DISCUSSÃO

O ambiente tumoral hepático é complexo e multivariável, o que limita o sucesso do uso de monoterapias (DING et al., 2017). Portanto, a combinação de vários medicamentos parece ser uma forma razoável de prevenir a resistência do tumor. Neste estudo, fornecemos evidências que o tratamento combinado pode ser uma opção terapêutica útil no carcinoma hepatocelular. A quimioterapia é uma importante opção de tratamento e entre os agentes quimioterápicos, o sorafenibe é o medicamento de escolha, embora seus resultados estejam longe de serem satisfatórios devido a seus efeitos colaterais, eventos adversos relatados e quimiorresistência (GLIMELIUS et al., 1997; WILHELM et al., 2008; LLOVET et al., 2016). A ativação contínua, por exemplo, da sinalização Ras/Raf/MEK/ERK é apontada como a principal razão da resistência primária e a sensibilidade a este quimioterápico (MAO, J. et al., 2018). Vários estudos têm mostrado que compostos bioativos da dieta desempenham um papel importante na inibição e tratamento de cânceres (SUN et al., 2017; REN et al., 2018). Portanto, há um foco crescente sobre a aplicação de terapias combinadas com compostos bioativos no carcinoma hepatocelular, uma vez que estes geralmente não mostram citotoxicidade nas células não tumorais.

Vários estudos demonstraram que o tratamento combinado com compostos bioativos e agentes quimioterápicos pode melhorar a sensibilidade e citotoxicidade dos agentes quimioterápicos. A combinação de resveratrol e cisplatina resultou em efeitos citotóxicos sinérgicos nas células tumorais de pulmão A549 por meio da indução de apoptose e modulação da morte celular autofágica (HU et al., 2016).

A silibinina, um componente bioativo não tóxico do *Silybum marianum*, é usada como medicamento de proteção hepática na clínica principalmente por causa de suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (MAO, J. et al., 2018). Mao et al. (2018), estudaram os efeitos citotóxicos da silibinina combinada com sorafenibe em diferentes linhagens de carcinoma hepatocelular e os resultados indicaram que a combinação inibiu de maneira significativa a proliferação dessas células, além de induzir morte celular por apoptose. Da mesma maneira, a combinação de fisetina e sorafenibe induziu

sinergicamente apoptose nas células HeLa, que foi acompanhada por um aumento acentuado na perda do potencial da membrana mitocondrial (LIN et al., 2016).

O extrato de alho cru foi considerado o extrato mais eficaz e altamente específico quando comparado com 33 outros extratos vegetais em diferentes células cancerosas, sem afetar as células não tumorais (BOIVIN et al., 2009). Shang et al. (2019) relataram que os mecanismos antitumoral dos extratos de alho foram atribuídos à inibição do crescimento e proliferação celular, regulação do metabolismo carcinogênico, estimulação da apoptose, prevenção da angiogênese, invasão e migração. Os compostos organossulfurados como alicina, DADS e trissulfeto de dialila, desempenham papéis essenciais na atividade antitumoral das espécies *Allium*, e pequenas mudanças em seus valores afetam significativamente sua capacidade de inibir a proliferação de células cancerosas e indução de apoptose sendo o grupo alil associado à molécula de enxofre essenciais para esses resultados (XIAO et al., 2004). O DADS demonstrou diminuir o risco de câncer induzido por carcinógenos em animais experimentais e inibir a proliferação de vários tipos de células cancerosas (YI; SU, 2013). Nesse trabalho, estudamos os efeitos desse composto bioativo em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) e em células não tumorais de cordão umbilical humano (HUVEC) isolado e associado ao sorafenibe.

Em células HUVEC, as maiores concentrações testadas de DADS (400 e 800 μM) diminuíram a viabilidade celular nos três tempos de tratamento testados (24, 48 e 72 horas). Hosseinzadeh et al. (2017) utilizando células não tumorais de condrócitos humanos (C28/I2), em tratamento de 24 horas, observaram que concentrações de 50 e 100 μM foram capazes de reduzir a viabilidade celular em torno de 20% na maior concentração testada.

Chiu et al. (2016), testando concentrações de 100, 200 e 400 μM de DADS em células HepG2, encontrou uma diminuição da viabilidade celular de aproximadamente 20% em tratamento de 24 horas. Ji et al. (2010), demonstraram uma inibição de 30% na viabilidade das células HepG2 após tratamento com 100 μM do composto bioativo também em 24 horas.

O tratamento das células HepG2 com o quimioterápico sorafenibe demonstrou reduzir a viabilidade celular nos três tempos de tratamento em

concentrações próximas às plasmáticas do fármaco em humanos (EDGINTON et al., 2016; TANDIA et al., 2017). Como não é um fármaco seletivo, também se observou diminuição da viabilidade celular nas células HUVEC nos três tempos de tratamento.

O tratamento associado foi feito em dois protocolos diferentes: (i) um pré-tratamento que permitiu o estudo da possível sensibilização das células pelo dissulfeto de dialila em resposta ao fármaco; (ii) um protocolo de tratamento simultâneo. A terapia combinada consiste na administração simultânea de um medicamento quimioterápico convencional juntamente com um ou mais compostos bioativos naturais. Essa combinação pode ser aplicada a culturas de células tumorais *in vitro*, a um modelo animal ou a um ensaio clínico em pacientes (REDONDO-BLANCO et al., 2017). Além disso, a terapia combinada permite estudar diferentes vias envolvidas no câncer simultaneamente, elucidando os mecanismos de ação para reduzir o desenvolvimento de resistência a fármacos antineoplásicos por meio da ativação de fatores de transcrição, de receptores de membrana, moléculas de adesão, regulação do ciclo celular e indução de apoptose (REDONDO-BLANCO et al., 2017). Para esses ensaios, foram escolhidas duas concentrações de DADS que foram citotóxicas e uma concentração não citotóxica de acordo com os ensaios de viabilidade celular do composto bioativo isolado e que se correlacionam com concentrações plasmáticas. Para isso, selecionou-se concentrações de 50, 100 e 200 μM , uma vez que 50 μM de DADS está dentro da concentração plasmática *in vivo* (GERMAIN et al., 2002).

Os resultados do pré-tratamento das células HepG2 demonstraram aumento na viabilidade celular quando comparadas aos tratamentos isolados. Em células HUVEC, a associação induziu diminuição da viabilidade celular. Todavia, o tratamento simultâneo de 72 horas em células HepG2 mostram uma diminuição efetiva da viabilidade das células quando comparado ao tratamento isolado dos dois compostos, indicando que o DADS associado ao sorafenibe exerce um efeito sinérgico. A coadministração de SORA e quercetina diminuiu a taxa de proliferação, adesão e migração celular, aumentou a expressão de E-caderina e diminuiu de N-caderina, indicando uma transição epitelial-mesenquimal reduzida em células tumorais de tireoide (CELANO et al., 2020).

Em células de próstata (PC-3), a combinação de SORA e nobiletina, aumentou a porcentagem de células apoptóticas com bloqueio do ciclo celular em G0/G1 e aumentou a expressão de *Bax*, *Rb1*, e *CDKN1A* (GUNEY ESKILER et al., 2019).

Outros compostos bioativos da dieta também já demonstraram esta característica. Como por exemplo, o resveratrol associado ao quimioterápico oxaliplatina, induziu a quimiossensibilização de células de carcinoma colorretal (Caco-2) *in vitro* (KAMINSKI et al., 2014). Quando associado ao 5-fluorouracil, em células HCT-116 e SW480 (carcinoma colorretal), desempenhou um efeito sinérgico, diminuindo a viabilidade celular e induzindo apoptose nestas células (BUHRMANN et al., 2015). Em pré-tratamento, o resveratrol foi capaz de sensibilizar células de câncer de cólon (HT-29) ao subsequente tratamento com etoposídeo (HWANG et al., 2005).

Nesse estudo, foram realizados ensaios de viabilidade celular que avaliam diferentes parâmetros. O ensaio de resazurina baseia-se na ação da resazurina como aceitador intermediário de elétrons. Após redução por NAD(P)H ou FADH, resazurina não fluorescente de coloração azul é convertida em resorufina fluorescente rosa, portanto, a captação da fluorescência ou absorbância reflete a viabilidade celular (PAGE; PAGE; NOEL, 1993). Enquanto no ensaio de LIVE/DEAD o corante de calceína AM permeável às células é convertido no produto fluorescente altamente verde calceína por esterases celulares, e o corante de etídio-homodímero-1 impermeável às células produz fluorescência vermelha ao se ligar aos ácidos nucleicos (WINGETT et al., 2016).

Esse mostrou-se mais sensível à determinação da viabilidade celular das células HepG2 já que as três concentrações testadas isoladas de DADS induziram citotoxicidade, resultado que não foi observado no ensaio da resazurina. No tratamento associado, a maior associação testada obteve o melhor resultado, já que a associação com 50 µM de DADS foi tão citotóxica quanto DADS isolado e a associação de 100 µM de DADS estatisticamente igual ao DADS e SORA isolados. Em células HUVEC, em tratamento isolado, apenas a maior concentração de DADS (200 µM) foi tão citotóxica quanto o tratamento isolado com sorafenibe. Em tratamento associado, apenas a maior associação foi mais citotóxica que o sorafenibe isolado.

A viabilidade celular é definida como o número de células saudáveis em uma amostra e a proliferação de células é um indicador vital para a compreensão dos mecanismos de ação de genes, proteínas e vias envolvidas na sobrevivência ou morte celular após exposição a agentes tóxicos. Geralmente, os métodos usados para determinar a viabilidade também são comuns para a detecção de proliferação celular. Os ensaios de citotoxicidade e proliferação celular são geralmente usados para triagem de fármacos para detectar se as moléculas teste têm efeitos na proliferação celular ou exibem efeitos citotóxicos diretos (AYSUN, 2016). Há uma variedade de métodos de ensaios baseados em diferentes funções celulares, como atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, adesão celular, produção de ATP, produção de coenzima e atividade de captação de nucleotídeos (ISHIYAMA et al., 1996). Esses métodos podem ser classificados basicamente em diferentes categorias: (I) métodos de exclusão de corantes (II) métodos baseados na atividade metabólica, (III) ensaio de ATP, (IV) ensaio de sulforrodamina B, (V) protease ensaio de marcadores de viabilidade, (VI) ensaio de sobrevivência de células clonogênicas, (VII) ensaios de proliferação celular de síntese de DNA e (V) espectroscopia Raman (AYSUN, 2016).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* medem se um composto é tóxico para células em cultura, geralmente determinando o número de células viáveis remanescentes após um período de incubação definido. Os métodos para estimar o número de células viáveis em cultura se baseiam na medição de um indicador de atividade metabólica (RISS et al., 2011). Já a premissa do ensaio clonogênico é que cada célula viável restante após a exposição formará uma colônia (grupo de células resultante de uma célula primária semeada após o tratamento) após determinado período de tempo (FRANKEN, N. A. P. et al., 2006). Ainda, o ensaio de sobrevivência clonogênica é amplamente utilizado para avaliar e prever a citotoxicidade de antitumorais, e é considerado como o “padrão ouro” porque avalia a soma de todas as formas de morte celular e verifica a sobrevivência das células tratadas (SUMANTRAN, 2011).

Considerando os resultados de sobrevivência do ensaio clonogênico, DADS isolado apresentou diminuição da viabilidade celular em HepG2 e HUVEC assim como o tratamento isolado com o sorafenibe. No tratamento associado, o resultado encontrado em células HepG2 refere-se apenas ao

efeito do tratamento do sorafenibe. A diminuição da viabilidade de células HUVEC tratadas com DADS e sorafenibe isolados foi semelhante àquela da associação dos dois compostos. A inibição da proliferação celular e atraso no tempo de duplicação das colônias induzidas por concentrações semelhantes de DADS (205 - 478 μM) também foi relatada na literatura em células de câncer de cólon humano (SW480) (LIAO et al., 2009).

Estudos demonstraram que o DADS inibe o crescimento de vários tumores induzindo apoptose e parada do ciclo celular. No presente estudo, avaliando-se exposição de células HepG2 ao DADS isolado por 72 horas, apenas a maior concentração testada (200 μM) aumentou a porcentagem de células apoptóticas. Esses resultados estão de acordo com os publicados por De Martino et al. (2006) que não encontrou aumento da porcentagem de células HepG2 apoptóticas em tratamento de 12, 24 e 48 horas com 50 μM de DADS. Um trabalho utilizando concentrações semelhantes ao nosso estudo (50, 100 e 150 μM) demonstrou que o DADS induz apoptose de maneira dependente do tempo e da dose em células HepG2 (WEN et al., 2004).

Compostos bioativos estão ganhando grande atenção por suas atividades anticancerosas. Estudos demonstraram que compostos bioativos naturais podem aumentar a eficácia da quimioterapia e, em alguns casos, melhorar alguns dos efeitos colaterais de fármacos quimioterápicos (SUBRAMANIAM; SELVADURAY; RADHAKRISHNAN, 2019). Diferentes formas de morte celular têm sido descritas, como apoptose, autofagia e necrose. Apoptose refere-se à morte ordenada de células controladas por genes com o objetivo de manter a homeostase. As características morfológicas da apoptose incluem invaginações da membrana celular, encolhimento da célula e formação de corpos apoptóticos (NIRMALA; LOPUS, 2020). A apoptose é um processo complexo estritamente regulado e coordenado principalmente pela ativação de uma cascata de cisteína protease específica do ácido aspártico (caspase), incluindo duas vias principais: uma dependente da mitocôndria e outra que envolve a interação entre o receptor de morte e seu ligante (D'ARCY, 2019). A necrose é uma forma alternativa de morte celular não controlada que é induzida por lesão externa, como hipóxia ou inflamação. Esse processo geralmente envolve a regulação positiva de vários fatores pró-inflamatórios, como NF- κ B, resultando na ruptura da membrana celular

causando derramamento do conteúdo da célula em áreas circundantes, resultando em uma cascata de inflamação e dano tecidual (D'ARCY, 2019). Nos resultados aqui apresentados, não há indução de morte celular mediada por necrose nos tratamentos isolados por DADS e/ou sorafenibe isolados, bem como nas associações dos compostos analisadas. Mas, todas as concentrações testadas de DADS, SORA e suas maiores associações induziram morte celular por autofagia em HUVEC e HepG2. Yue et al. (2019) propuseram que DADS induziu apoptose e autofagia em células tumorais de osteosarcoma humano (MG-63) pela interferência na via molecular PI3K/Akt/mTOR. Nas maiores concentrações de DADS (60 e 100 μM) testadas pelos autores, houve um aumento significativo na expressão das proteínas caspase-3 e BAX e uma redução significativa na expressão da proteína BCL-2, p-Akt e mTOR.

Um estudo com células de osteosarcoma (MG-63) expostas a DADS em concentrações de 2 - 100 μM em 24, 48 e 72 horas de tratamento demonstrou inibição da proliferação celular em ensaio clonogênico a partir da concentração de 20 μM , além de aumento na porcentagem de células em apoptose e parada de ciclo celular em G2/M com aumento das concentrações de DADS (YUE et al., 2019). Observamos um aumento de células em fase G1 tratadas com dissulfeto isolado em todas as concentrações testadas em suas associações.

O DADS induziu efeito citotóxico e fragmentação inter-nucleossômica pró-apoptótica de DNA em células leucêmicas HL-60. O efeito quimiopreventivo do DADS se dá por diferentes caminhos: (i) aumentando a apoptose por meio do aumento da expressão de *BAX*, e diminuição de *BCL-2* (ii) aumentando espécies reativas (ER), (iii) inibindo a proliferação em células tumorais e reprimindo a atividade da histona desacetilase (FERNANDEZ-BEDMAR et al., 2019).

O ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) é amplamente conhecido por induzir morte celular por apoptose. Kim et al. (2019) demonstraram que doses não citotóxicas de DADS aumentaram a morte celular associada a TRAIL em linhagens celulares de câncer cólon retal e esses efeitos sinérgicos foram validados *in vivo* em camundongos nocauteados. A eficácia sinérgica da combinação de sorafenibe e genisteína em células oriundas de neuroblastoma maligno humano (SK-N-DZ e SH-SY5Y)

mostrou uma diminuição na viabilidade celular dependente da concentração sendo que a terapia combinada inibiu mais proeminentemente a proliferação em ambas as linhagens celulares do que no tratamento isolado (ROY CHOUDHURY et al., 2010). Esses resultados sugerem que a combinação de sorafenibe e genisteína inibiu fatores de sobrevivência e aumentou a apoptose por meio de vias mediadas por receptores e mitocôndrias em ambas as linhagens celulares de neuroblastoma SK-N-DZ e SH-SY5Y (ROY CHOUDHURY et al., 2010). Esses resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo, uma vez que a associação de DADS e sorafenibe aumentou a citotoxicidade e a porcentagem (SUAREZ-ARNEDO et al., 2020) de células apoptóticas em linhagem de células tumorais hepáticas HepG2 *in vitro*.

A capacidade de migração e invasão celular são essenciais para muitos processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, reparo de feridas, invasão tumoral, angiogênese e metástase (WU et al., 2019). Vários estudos indicaram que a reorganização do citoesqueleto de actina é a base da migração, adesão e invasão das células tumorais (ZHOU et al., 2013). O ensaio de *wound healing in vitro*, uma técnica simples e de baixo custo que funciona em conjunto com outras ferramentas de análise de imagens, é um dos métodos 2D mais utilizados para determinar a migração e proliferação celular em processos como regeneração e doença na busca de novos fármacos candidatos (SUAREZ-ARNEDO et al., 2020). O princípio básico do ensaio de cicatrização de feridas 2D é uma destruição da monocamada de células confluentes, gerando uma região livre de células, que é disponível para as células para migração e reparo (MARTINOTTI; RANZATO, 2020). Nossos resultados demonstram a inibição da migração de células HepG2 após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de DADS (50, 100 e 200 μM). A associação com sorafenibe não demonstrou aumentar a capacidade de inibição da migração dessas células, resultado semelhante ao observado em células HUVEC. Analisando a invasão celular, apenas as duas maiores concentrações testadas em HepG2 induziram menor taxa de invasão, enquanto em células HUVEC, apenas DADS 200 μM . A associação dos compostos foi efetiva nas duas células apenas na maior combinação testada. Xiong et al. (2018), usando ensaio clonogênico e *wound healing*, também demonstraram

que o DADS inibiu significativamente a formação de colônias e migração de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Os mecanismos responsáveis pela atividade antimetastática do DADS ainda não estão completamente elucidados. No entanto, no estudo de Yin et al. (2018), os pesquisadores observaram que em linhagens de células de adenocarcinoma gastroesofágico do tipo II (OE19), concentrações não citotóxicas de DADS (< 68 μ M) foram capazes de bloquear a invasão e migração das células OE19 pela redução da expressão dos genes das metaloproteases MMP-2 e MMP-9.

Foi demonstrado que DADS tem propriedades antioxidantes e antitumorais e que estas funções dependem de sua concentração. Concentrações baixas de DADS pode ser um potencial agente terapêutico ou modulador em doenças associadas a danos oxidativos, enquanto altas concentrações podem ser uma ferramenta poderosa contra a proliferação, por meio da indução de apoptose em células tumorais (FILOMENI et al., 2005). Filomeni et al. (2005) demonstraram aumento na produção de espécies reativas e bloqueio do ciclo celular na fase G2/M em células de neuroblastoma (SH-SY5Y) tratadas com DADS por 30 minutos. Nossos resultados são diferentes dos demonstrados por Filomeni et al. (2005) uma vez que os tratamentos com DADS não foram capazes de induzir a produção de espécies reativas nos tempos de tratamentos testados. Wu e colaboradores (2005) explicam essa ausência de espécies reativas pela escolha equivocada do tempo. No estudo citado, a indução de espécies reativas em células A549 tratadas com DADS acontece com tempo de tratamento inferior a 30 minutos, indicando que este pode ser um evento precoce na apoptose modulada por DADS. O tratamento das células A549 com N-acetilcisteína interrompeu completamente a parada do ciclo celular e apoptose indicando que o estresse oxidativo modula a proliferação celular e a morte celular induzida pelo DADS.

Nosso tratamento isolado com o sorafenibe também não induziu estresse oxidativo, resultado contrário ao demonstrado na literatura onde o sorafenibe exerce uma influência positiva na produção de espécies reativas em células de carcinoma hepatocelular tendo como alvo a cadeia de transporte mitocondrial de elétrons e a síntese de ATP (ZHANG et al., 2017). Mondal e Beneti (2016) também demonstraram aumento na concentração de espécies reativas de células de mama (MCF7) tratadas por 48h com sorafenibe.

No protocolo de tratamento associado, a detecção de espécies reativas foi ainda menor do que o tratamento com sorafenibe isolado, o que pode ser explicado pela capacidade antioxidante do DADS que interfere com o estresse oxidativo induzido por sorafenibe, excluindo-se esse mecanismo de ação da relação com o efeito sinérgico observado na citotoxicidade. Min et al. (2017) encontrou um resultado semelhante ao citado acima onde o sorafenibe isolado induziu aumento de estresse oxidativo, mas quando associado ao *kahweol*, um diterpenoide encontrado nos grãos de café-arábica, anulou esse efeito.

Em relação às propriedades genotóxicas, DADS isolado foi capaz de induzir danos ao DNA nas três concentrações testadas (50, 100 e 200 μM). Quando em associação, a indução de danos ao DNA foi estatisticamente igual aos tratamentos isolados de DADS e sorafenibe nas concentrações de 50 e 100 μM . A associação de 200 μM de DADS e sorafenibe induziu maior dano ao DNA que os tratamentos isolados com 200 μM de DADS e sorafenibe. Arranz et al. (2006) utilizando o ensaio do cometa alcalino não observou indução de danos ao DNA de células HepG2 quando tratadas com concentrações entre 1 e 5 μM de DADS. Da mesma forma, Belloir et al. (2006) não encontraram aumento na indução de danos ao DNA em tratamentos com DADS em concentrações variando de 5 – 100 μM após 20 horas de tratamento no mesmo modelo *in vitro*. DADS foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo nos danos do DNA analisados pelo ensaio do cometa em células HL-60 nas concentrações de 28 e 56 μM . Os autores foram os primeiros a descrever a indução de danos no DNA pelo DADS no ensaio alcalino do cometa em células leucêmicas HL-60 (FERNANDEZ-BEDMAR et al., 2019).

A fim de elucidar o mecanismo de morte celular encontrado na associação dos dois compostos em células HepG2 e HUVEC, investigamos alteração na expressão de genes e proteínas envolvidos nos processos de morte celular, apoptose, autofagia, migração e ciclo celular.

Em células HepG2, identificamos alteração na expressão dos genes *TNF*, *MMP2*, *FOS* e *CHEK2*. Dentre os mediadores inflamatórios, a citocina pró-inflamatória, $\text{TNF-}\alpha$, tem um papel crucial na patogênese de diferentes tipos de cânceres. Está envolvida no crescimento, diferenciação, função e sobrevivência celular, são produzidas por diversos tipos de células que compreendem macrófagos, neutrófilos e fibroblastos (ANDERSON et al., 2004).

Nesse estudo, observamos uma diminuição na expressão relativa de *TNF* do grupo associado quando comparado ao tratamento isolado com DADS. Um tratamento associado de sorafenibe e quercetina nano encapsuladas diminuiu a expressão relativa de NF- κ B e TNF- α em um modelo de câncer hepático em camundongos induzido por dietilnitrosamina (ABDELMONEEM et al., 2019).

Metaloproteinases de matriz podem danificar o equilíbrio da degradação da matriz extracelular e, assim, promover a metástase. A metaloproteinase 2 da matriz (MMP2) é capaz de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular e é amplamente aceito que o efeito da MMP2 na matriz extracelular está intimamente associado a invasão tumoral e metástase (LITTLEPAGE et al., 2010). Podemos observar uma diminuição na expressão relativa de MMP2 do grupo associado, quando comparado ao grupo SORA isolado. A zingerona, também chamada de vanilacetona, principal componente do sabor do gengibre, associada ao sorafenibe, inibiu a migração de células HepG2 diminuindo as expressões das proteínas MMP-2 e MMP-9 (XU et al., 2019). A combinação de curcumina nano encapsulada com sorafenibe inibiu sinergicamente o crescimento tumoral e metástase em células de carcinoma hepatocelular (Huh7 e MHCCLM3) por meio da indução de apoptose e parada do ciclo celular, reduzindo a expressão de MMP9 via via de sinalização NF- κ B/p65 (HU et al., 2015).

A família de proteínas FOS dimerizada com proteínas Jun formam um complexo de fator de transcrição AP-1, que tem papel central na proliferação e diferenciação do tecido, bem como na transformação oncogênica e progressão tumoral (LI et al., 2010). Na análise de expressão de FOS, há uma diminuição na associação comparado ao controle e aos tratamentos associados.

O gene ponto de verificação da quinase 2 do ciclo celular (CHEK2), faz parte da via p53 e modula a função de p53 por fosforilação em resposta a danos no DNA, levando à parada do ciclo celular em G1 (CHEHAB et al., 2000; SHIEH et al., 2011). Houve um aumento na expressão de CHEK2 no tratamento associado quando comparado ao grupo tratado com SORA.

Observamos alteração das proteínas BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, LC3 e NRF2. BAX é um membro pró-apoptótico da família BCL-2 que regula a morte celular programada mediada por apoptose (BRADY, 1998). A regulação da apoptose é vital para o desenvolvimento e sobrevivência sendo necessária

para manter o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular e, portanto, as interrupções no programa apoptótico estão associadas a patologias como câncer (STENNICKE et al., 1998). Os principais mediadores que iniciam e executam o programa apoptótico são membros da família das caspases, cuja ativação é considerada essencial (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997). As caspases-3, -6 e -7 estão envolvidas na execução de células em resposta a muitos estímulos apoptóticos, incluindo a ligação de receptores de morte da família de receptores TNFR-1, resultando na clivagem de uma série de proteínas cuja proteólise limitada é definitiva de apoptose. No entanto, essas caspases executoras não são ativadas diretamente pela ligação do receptor, mas dependem da atividade proteolítica das caspases-8 e -10 iniciadoras a montante (BOLDIN et al., 1996; MUZIO et al., 1996).

Podemos observar que há uma diminuição na expressão de BAX dos tratamentos isolados em relação ao controle. E um aumento na expressão de BAX quando comparamos o tratamento associado com os isolados. Há um aumento na expressão de BCL2 comparando-se o tratamento associado com o controle. Todos os tratamentos testados aumentaram a expressão de CASP3 e CASP8 em relação ao controle. Há um aumento na expressão de LC3 de todos os grupos quando comparados ao controle e uma maior expressão da proteína do grupo associado, quando comparado aos tratamentos isolados. Foi demonstrado que o DADS tem capacidade de modulação da via PI3K/Akt/mTOR por meio da alteração da expressão de proteínas caspase-3, Bax, Bcl-2, LC3-II/LC3-I e p62, bem como a supressão da via mTOR. A super expressão da proteína LC3-II revelou que DADS induziu a formação de autofagossomo em células de osteossarcoma humano (YUE et al., 2019). A melitina, um composto bioativo presente no mel, associada ao sorafenibe demonstrou efeito sinérgico na regulação positiva de p53, Bax, Cas3, Cas7 e PTEN e regulação negativa de Bcl-2, Cyclin-D1, Rac1, Nf-κB, HIF-1a, VEGF e MMP9 em células HepG2 e THLE-2 (MANSOUR et al., 2021).

Em células HUVEC, o tratamento associado alterou a expressão dos genes CDK1, CD44, CHEK2 e TNF. E alteração na expressão das proteínas BAX, CASP3 e CASP8. As quinases dependentes de ciclina (CDKs) são serina/treonina quinases que regulam o ciclo celular em cooperação com ciclinas regulatórias. CDK1 promove as transições G2/M e G1/S, bem como

progressão em G1. A regulação positiva de CDK1 está intimamente relacionada com o prognóstico de vários tumores malignos (MALUMBRES; BARBACID, 2009; ENSERINK; KOLODNER, 2010). CD44 é uma proteína de adesão celular e está envolvida nas interações célula-célula e célula-matriz, também está envolvida na motilidade celular, migração celular, diferenciação celular, sinalização celular e transcrição gênica (MISHRA et al., 2019).

A análise preditiva da via de sinalização envolvida nos efeitos observados na associação dos dois compostos foi obtida por meio da plataforma STITCH e demonstrou que a correlação entre eles altera a expressão de proteínas como BAX, BCL-2 e caspases. Essa informação pode ser confirmada por meio do ensaio de western blotting onde observamos alteração em células HepG2 e HUVEC, quando comparadas aos tratamentos isolados/associados. Genes e proteínas alterados estão correlacionados com a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. Muitos fármacos antitumorais induzem a apoptose e autofagia pela inibição por meio dessa via (RODENAK-KLADNIEW et al., 2018; YANG et al., 2018). Foi relatado que a desregulação da via PI3K/Akt/mTOR desempenha um papel significativo no prognóstico do carcinoma hepatocelular e o nível de expressão de Akt foi regulado positivamente em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular resistentes (YANG; PI; WANG, 2018). Essa via de sinalização afeta a maioria das principais funções celulares, por isso desempenha um papel importante na regulação de comportamentos celulares básicos, como crescimento e proliferação e está associada a uma variedade de doenças, incluindo câncer, obesidade e neurodegeneração. Gao et al. (2021) avaliando uma associação de resveratrol e sorafenibe identificaram um aumento de células na fase S do ciclo celular e de células apoptóticas além da diminuição na expressão de proteínas relacionadas à via como clivagem de caspase 3, 8 e 9, aumento de ciclina A e redução de CDK2, CDC25A, PKA, p-AMPK, e eEF2K. Bahman e colaboradores (2018) observaram um aumento na eficácia do tratamento de células HepG2 com sorafenibe quando associado à quempferol e curcumina, com bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e indução de apoptose. O tratamento associado com curcumina diminuiu a expressão de ciclinas A, B2 e D1 e BCL2 e aumentou a expressão de caspases 3 e 9 clivadas. Portanto os resultados encontrados no presente estudo corroboram os descritos na

literatura, e com a predição das interações dos compostos com os alvos e entre os alvos, podemos verificar uma possível rede de sinalização responsável pelos efeitos observados pela associação de sorafenibe e dissulfeto de dialila.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, nas condições experimentais descritas, podemos concluir:

- No ensaio de viabilidade celular por resazurina, o dissulfeto de dialila diminuiu a viabilidade celular em células HepG2 após 48h de tratamento à partir de 100 μM e em células HUVEC após 24h. E o sorafenibe a partir de 4 μM .

- Na viabilidade pelo ensaio de LIVE/DEAD, observamos diminuição da viabilidade celular a partir da concentração de 50 μM em ambas linhagens celulares.

- O tratamento simultâneo por 72h foi o mais efetivo na redução da viabilidade celular e em células HepG2 todas as combinações testadas foram mais efetivas que o tratamento isolado na avaliação da viabilidade celular por resazurina e LIVE/DEAD em células HepG2 e as associações de 50 e 200 μM DADS + 8 μM SORA. Em células HUVEC, todos os tratamentos isolados e somente a maior concentração associada reduziu a viabilidade celular.

- Houve inibição da proliferação de células HepG2 nas concentrações de 100 e 200 μM de DADS e em todas as concentrações testadas em células HUVEC. 8 μM de sorafenibe diminuiu a proliferação de ambas as linhagens celulares. Todavia, o tratamento associado demonstrou inibir a proliferação celular de maneira igual ao tratamento isolado com sorafenibe.

- Há um aumento na proporção de células HepG2 apoptóticas no tratamento de 200 μM de dissulfeto de dialila e 8 μM de sorafenibe e um efeito sinérgico na combinação dos compostos. Há um aumento na porcentagem de células em G1/S no tratamento com sorafenibe.

- A razão de células autofágicas aumentou em todos os tratamentos isolados em HepG2 e na maior combinação associada testada. Em células HUVEC, todos os tratamentos isolados aumentaram a razão, mas apenas a maior combinação associada testada foi maior que os tratamentos isolados.

- Há uma diminuição na migração de células HepG2 e HUVEC em todos os tratamentos (isolados e associados) à partir de 24h de tratamento sem alteração estatística entre eles.

- A invasão celular foi inibida em células HepG2 e HUVEC no tratamento isolado por sorafenibe e 200 μ M DADS e na maior associação testada.
- Observa-se diminuição na produção de ER nas células HepG2 nas concentrações testadas de dissulfeto de dialila e sorafenibe em todos os tempos testados e uma inibição do efeito na produção de ER do sorafenibe quando associado ao dissulfeto, observando-se seu efeito antioxidante.
- Todas as concentrações testadas aumentaram o dano genotóxico pelo ensaio do cometa, mas apenas a maior associação foi mais efetiva que os compostos isolados em células HepG2.
- Há alteração na expressão de genes *TNF*, *MMP2*, *FOS* e *CHEK2* em células HepG2 e das proteínas BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, LC3 e NRF2.
- Em células HUVEC, os genes alterados foram *CDK1*, *CD44*, *CHEK2*, *TNF* e as proteínas BAX, CASP3 e CASP8.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados mostraram efeito sinérgico do efeito do medicamento sorafenibe na inibição da viabilidade celular e na indução de morte celular por apoptose e autofagia, indução de gentotoxicidade em células humanas HepG2 na associação com o DADS no protocolo de tratamento simultâneo. Os dados de proliferação celular, migração e invasão não apresentaram os mesmos efeitos sinérgicos entre o sorafenibe e o DADS.

O tratamento associado também não foi seletivo para as células tumorais e apresentou efeitos sinérgicos na inibição da viabilidade de células HUVEC. Contudo, a fração de sobrevivência no ensaio clonogênico observada nos tratamentos associados foi maior nas células HUVEC em comparação com as células HepG2. As alterações na expressão de genes e proteínas demonstram que a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR está envolvida nos resultados encontrados.

Considerando o *combination index* da associação do sorafenibe e diferentes concentrações de DADS sobre a viabilidade e morte celular, além da baixa citotoxicidade do DADS em células HepG2 e HUVEC, essa associação pode representar uma promissora e alternativa opção terapêutica no desenvolvimento de novos protocolos clínicos para o tratamento de pacientes

com carcinoma hepatocelular em estágios avançados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMID, N. M. et al. Herbal management of hepatocellular carcinoma through cutting the pathways of the common risk factors. **Biomed Pharmacother**, Nova Iorque, 107, p. 1246-1258, Nova Iorque, 2018.
- ABDELMAGEED, M. M. et al. Indole-3- carbinol enhances sorafenib cytotoxicity in hepatocellular carcinoma cells: A mechanistic study. **Sci Rep**, Londres, 6, p. 32733, Londres, 2016.
- ABDELMONEEM, M. A. et al. Dual-Targeted Lactoferrin Shell-Oily Core Nanocapsules for Synergistic Targeted/Herbal Therapy of Hepatocellular Carcinoma. **ACS Appl Mater Interfaces**, Washington, 11, n. 30, p. 26731-26744, Washington, 2019.
- ADAKI, S. et al. Garlic: Review of literature. **Indian J Cancer**, Mumbai, 51, n. 4, p. 577-581, Mumbai, 2014.
- AGBANA, Y. L. et al. Garlic-derived bioactive compound S-allylcysteine inhibits cancer progression through diverse molecular mechanisms. **Nutr Res**, Nova Iorque, 73, p. 1-14, Nova Iorque, 2020.
- ALALI, M. et al. Nutraceuticals: Transformation of Conventional Foods into Health Promoters/Disease Preventers and Safety Considerations. **Molecules**, Basel, 26, n. 9, Basel, 2021.
- ANVISA. **Bula Nexavar**. Brasil, 2019. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23228582017&pIdAnexo=10313265. Acesso em: 29 de set. de 2019.
- ARRANZ, N. et al. Protective effects of isothiocyanates towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. **J Appl Toxicol**, Philadelphia, 26, n. 5, p. 466-473, Philadelphia, 2006.
- AYAZ, E. et al. [Garlic (*Allium sativum*) and traditional medicine]. **Turkiye Parazit Derg**, İzmir, 31, n. 2, p. 145-149, İzmir, 2007.
- AYSUN, A. Y., K; Yusuf, B. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, 17, n. 14, p. 1213-1221, Hilversum, 2016.
- BAEK, S. C. et al. Anti-adipogenic Effect of beta-Carboline Alkaloids from Garlic (*Allium sativum*). **Foods**, Basel, 8, n. 12, Basel, 2019.
- BAHMAN, A. A. et al. Sequencedependent effect of sorafenib in combination with natural phenolic compounds on hepatic cancer cells and the possible mechanism of action. **Int J Mol Med**, Atenas, 42, n. 3, p. 1695-1715, Atenas, 2018.
- BAL-PRICE, A. et al. Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). **Neuromethods** New York, 56, p. 1-25, New York, 2011.
- BELLOIR, C. et al. Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct- and indirect-acting genotoxic agents in HepG2 cells. **Food Chem Toxicol**, Oxford, 44, n. 6, p. 827-834, Oxford, 2006.
- BISHAYEE, A. et al. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and

promise. **Semin Cancer Biol**, Filadélfia, 40-41, p. 1-3, Filadélfia, 2016.

BOIVIN, D. et al. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. **Food Chem**, Barking, 112, n. 2, p. 374-380, Barking, 2009.

BOLDIN, M. P. et al. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. **Cell**, Cambridge, 85, n. 6, p. 803-815, Cambridge, 1996.

BORTEL, N. et al. Effects of curcumin in pediatric epithelial liver tumors: inhibition of tumor growth and alpha-fetoprotein in vitro and in vivo involving the NFkappaB- and the beta-catenin pathways. **Oncotarget**, Albany, 6, n. 38, p. 40680-40691, Albany, 2015.

BOZIN, B. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele essential oils. **Molecules**, Basel, 13, n. 9, p. 2058-2068, Basel, 2008.

BRADY, H. J. M. G.-G., G. Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. **Int J Biochem Cell Biol**, Amsterdam, 30, n. 6, p. 647-650, Amsterdam, 1998.

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

BUHRMANN, C. et al. Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer. **Biochem Pharmacol**, Oxford, 98, n. 1, p. 51-68, Oxford, 2015.

BUTT, M. S. et al. Garlic: nature's protection against physiological threats. **Crit Rev Food Sci Nutr**, Filadélfia, 49, n. 6, p. 538-551, Filadélfia, 2009.

CELANO, M. et al. Quercetin improves the effects of sorafenib on growth and migration of thyroid cancer cells. **Endocrine**, Tóquio, 67, n. 2, p. 496-498, Tóquio, 2020.

CHACKO, S. et al. "Hepatocellular carcinoma: A life-threatening disease". **Biomed Pharmacother**, New York, 84, p. 1679-1688, New York, 2016.

CHEN, W. L. et al. Amentoflavone enhances sorafenib-induced apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells in vitro. **Oncol Lett**, Atenas, 14, n. 3, p. 3229-3234, Atenas, 2017.

CHOU, T. C. M., N. CompuSyn for Drug Combinations and for General Dose-Effect Analysis. **COMBOSYN**, I. P., NJ. 2005.

CHU, Y. L. et al. Autophagy therapeutic potential of garlic in human cancer therapy. **J Tradit Complement Med**, Amsterdam, 3, n. 3, p. 159-162, Amsterdam, 2013.

CORIAT, R. et al. Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. **Mol Cancer Ther**, Filadélfia, 11, n. 10, p. 2284-2293, Filadélfia, 2012.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**, Londres, 43, n. 6, p. 582-592, Londres, 2019.

DAI, W. et al. Quercetin induces apoptosis and enhances 5-FU therapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma. **Tumour Biol**, Amsterdam, 37, n. 5, p. 6307-6313, Amsterdam, 2016.

- DE GREEF, D. et al. Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. **Semin Cancer Biol**, Filadélfia, 73, p. 219-264, Filadélfia, 2021.
- DING, X. X. et al. Precision medicine for hepatocellular carcinoma: driver mutations and targeted therapy. **Oncotarget**, Albany, 8, n. 33, p. 55715-55730, Albany, 2017.
- EDGINTON, A. N. et al. Sorafenib metabolism, transport, and enterohepatic recycling: physiologically based modeling and simulation in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, Berlim, 77, n. 5, p. 1039-1052, Berlim, 2016.
- EL-SABER BATIHA, G. et al. Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. **Nutrients**, Basel, 12, n. 3, Basel, 2020.
- EL-SERAG, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, Filadélfia, 142, n. 6, p. 1264-1273 e1261, Filadélfia, 2012.
- EL-SERAG, H. B. et al. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. **Clin Gastroenterol Hepatol**, Filadélfia, 4, n. 3, p. 369-380, Filadélfia, 2006.
- ENSERINK, J. M. et al. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. **Cell Div**, Londres, 5, p. 11, Londres, 2010.
- FENG, C. et al. Diallyl Disulfide Suppresses the Inflammation and Apoptosis Resistance Induced by DCA Through ROS and the NF-kappaB Signaling Pathway in Human Barrett's Epithelial Cells. **Inflammation**, Filadélfia, 40, n. 3, p. 818-831, Filadélfia, 2017.
- FERNANDEZ-BEDMAR, Z. et al. Nutraceutical Potential of Two *Allium* Species and Their Distinctive Organosulfur Compounds: A Multi-Assay Evaluation. **Foods**, Basel, 8, n. 6, Basel, 2019.
- FILOMENI, G. et al. Glutathione-related systems and modulation of extracellular signal-regulated kinases are involved in the resistance of AGS adenocarcinoma gastric cells to diallyl disulfide-induced apoptosis. **Cancer Res**, Chicago, 65, n. 24, p. 11735-11742, Chicago, 2005.
- FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, London, 1, n. 5, p. 2315-2319, London, 2006.
- FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, Londres 1, n. 5, p. 2315-2319, Londres 2006.
- GAO, J. J. et al. Sorafenib-based combined molecule targeting in treatment of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, Beijing, 21, n. 42, p. 12059-12070, Beijing, 2015.
- GAO, M. et al. Synergistic antitumor effect of resveratrol and sorafenib on hepatocellular carcinoma through PKA/AMPK/eEF2K pathway. **Food Nutr Res**, Bålsta, 65, Bålsta, 2021.
- GERMAIN, E. et al. In vivo metabolism of diallyl disulphide in the rat: identification of two new metabolites. **Xenobiotica**, 32, n. 12, p. 1127-1138, 2002.
- GLIMELIUS, B. et al. Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. **Ann Oncol**, Londres, 8, n. 2, p. 163-168, Londres, 1997.

GOUAS, D. et al. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. **Cancer Lett**, Amsterdam, 286, n. 1, p. 29-37, Amsterdam, 2009.

GULLETT, N. P. et al. Cancer prevention with natural compounds. **Semin Oncol**, Nova Iorque, 37, n. 3, p. 258-281, Nova Iorque, 2010.

GUNEY ESKILER, G. et al. Synergistic Effects of Nobiletin and Sorafenib Combination on Metastatic Prostate Cancer Cells. **Nutr Cancer**, Filadélfia, 71, n. 8, p. 1299-1312, Filadélfia, 2019.

GUTIERREZ-PRAENA, D. et al. Alterations observed in the endothelial HUVEC cell line exposed to pure Cylindrospermopsin. **Chemosphere**, Oxford, 89, n. 9, p. 1151-1160, Oxford, 2012.

HAN, S. X. et al. Secretory Transactivating Transcription-apoptin fusion protein induces apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **World J Gastroenterol**, Pleasanton, 14, n. 23, p. 3642-3649, Pleasanton, 2008.

HENDERSON, A. H. St Cyres lecture. Endothelium in control. **Br Heart J**, Londres, 65, n. 3, p. 116-125, Londres, 1991.

HOSHIDA, Y. et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, Blatimore, 69, n. 18, p. 7385-7392, Blatimore, 2009.

HOSSEINZADEH, A. et al. Evaluating the Protective Effects and Mechanisms of Diallyl Disulfide on Interlukin-1beta-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptotic Signaling Pathways in Cultured Chondrocytes. **J Cell Biochem**, Nova Iorque, 118, n. 7, p. 1879-1888, Nova Iorque, 2017.

HOUSMAN, G. et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)**, Basel, 6, n. 3, p. 1769-1792, Basel, 2014.

HSIEH, T. C. et al. Treating hepatocellular carcinoma with (90)Y-bearing microspheres: a review. **Biomedicine (Taipei)**, Taichung, 6, n. 4, p. 19, Taichung, 2016.

HU, B. et al. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin in combination with sorafenib synergistically inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun**, Nova Iorque, 468, n. 4, p. 525-532, Nova Iorque, 2015.

HU, S. et al. The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, Shanghai, 48, n. 6, p. 528-535, Shanghai, 2016.

HUANG, A. et al. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. **Signal Transduct Target Ther**, Londres, 5, n. 1, p. 146, Londres, 2020.

HUANG, J. et al. Diallyl disulfide inhibits growth and metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells through inactivation of the beta-catenin signaling pathway. **Mol Nutr Food Res**, Weinheim, 59, n. 6, p. 1063-1075, Weinheim, 2015.

HUANG, Y. et al. Berberine, a natural plant alkaloid, synergistically sensitizes human liver cancer cells to sorafenib. **Oncol Rep**, Atenas, 40, n. 3, p. 1525-1532, Atenas, 2018.

HWANG, J. T. et al. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, Nova Iorque, 332, n. 2, p. 433-440, Nova Iorque, 2005.

ICIEK, M. et al. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. **Environ Mol Mutagen**, Nova Iorque, 50, n. 3, p. 247-265, Nova Iorque, 2009.

ISHIYAMA, M. et al. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. **Biol Pharm Bull**, Tóquio, 19, n. 11, p. 1518-1520, Tóquio, 1996.

JANG, H. J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents. **Food Sci Biotechnol**, Seoul, 27, n. 1, p. 219-225, Seoul, 2018.

Jl, C. et al. The roles of p38MAPK and caspase-3 in DADS-induced apoptosis in human HepG2 cells. **J Exp Clin Cancer Res**, Londres, 29, p. 50, Londres, 2010.

JO, J. Y. et al. Cytotoxicity of bioactive polymeric fractions from grape cell culture on human hepatocellular carcinoma, murine leukemia and non-cancerous PK15 kidney cells. **Food Chem Toxicol**, 44, n. 10, p. 1758-1767, 2006.

KAMINSKI, B. M. et al. Resveratrol-induced potentiation of the antitumor effects of oxaliplatin is accompanied by an altered cytokine profile of human monocyte-derived macrophages. **Apoptosis**, Londres, 19, n. 7, p. 1136-1147, Londres, 2014.

KENMOCHI, K. et al. Relationship of histologic grade of hepatocellular carcinoma (HCC) to tumor size, and demonstration of tumor cells of multiple different grades in single small HCC. **Liver**, Londres, 7, n. 1, p. 18-26, Londres, 1987.

KEW, M. C. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. **Liver Int**, Malden, 23, n. 6, p. 405-409, Malden, 2003.

KHATUA, T. N. et al. Diallyl disulfide ameliorates isoproterenol induced cardiac hypertrophy activating mitochondrial biogenesis via eNOS-Nrf2-Tfam pathway in rats. **Biochem Biophys Res**, Amsterdam, 5, p. 77-88, Amsterdam, 2016.

KIM, E. et al. Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks. **Exp Mol Med**, Seul, 52, n. 12, p. 1898-1907, Seul, 2020.

KIM, H. J. et al. Diallyl disulfide (DADS) boosts TRAIL-Mediated apoptosis in colorectal cancer cells by inhibiting Bcl-2. **Food Chem Toxicol**, Oxford, 125, p. 354-360, Oxford, 2019.

KOTECHA, R. et al. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. **Oncotarget**, Albany, 7, n. 32, p. 52517-52529, Albany, 2016.

KOULOURIS, A. et al. Hepatocellular Carcinoma: An Overview of the Changing Landscape of Treatment Options. **J Hepatocell Carcinoma**, Auckland, 8, p. 387-401, Auckland, 2021.

KRAJKA-KUZNIAK, V. et al. The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. **Pharmacol Rep**, Kraków, 69, n. 3, p. 393-402, Kraków, 2017.

- KUHAD, A. et al. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. **J Agric Food Chem**, Washington, 55, n. 25, p. 10150-10155, Washington, 2007.
- KUMARAVEL, T. S. et al. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biol Toxicol**, Princeton, 25, n. 1, p. 53-64, Princeton, 2009.
- LEE, J. M. et al. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **J Biochem Mol Biol**, 37, n. 2, p. 139-143, 2004.
- LEI, X. Y. et al. Apoptosis induced by diallyl disulfide in human breast cancer cell line MCF-7. **Acta Pharmacol Sin**, Beijing, 29, n. 10, p. 1233-1239, Beijing, 2008.
- LI, W. R. et al. Diallyl disulfide from garlic oil inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by inactivating key quorum sensing genes. **Appl Microbiol Biotechnol**, 102, n. 17, p. 7555-7564, 2018.
- LIAO, Q. J. et al. Effect of diallyl disulfide on cell cycle arrest of human colon cancer SW480 cells. **Ai Zheng**, Cantão, 28, n. 2, p. 138-141, Cantão, 2009.
- LIN, M. T. et al. Synergistic effect of fisetin combined with sorafenib in human cervical cancer HeLa cells through activation of death receptor-5 mediated caspase-8/caspase-3 and the mitochondria-dependent apoptotic pathway. **Tumour Biol**, Tokyo, 37, n. 5, p. 6987-6996, Tokyo, 2016.
- LING, H. et al. Identification of potential targets for differentiation in human leukemia cells induced by diallyl disulfide. **Int J Oncol**, Atenas, 50, n. 2, p. 697-707, Atenas, 2017.
- LING, H. et al. Diallyl disulfide induces downregulation and inactivation of cofilin 1 differentiation via the Rac1/ROCK1/LIMK1 pathway in leukemia cells. **Int J Oncol**, Athens, 56, n. 3, p. 772-782, Athens, 2020.
- LITTLEPAGE, L. E. et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. **Cancer Res**, Chicago, 70, n. 6, p. 2224-2234, Chicago, 2010.
- LIU, Y. et al. Pharmacological Investigation of the Anti-Inflammation and Anti-Oxidation Activities of Diallyl Disulfide in a Rat Emphysema Model Induced by Cigarette Smoke Extract. **Nutrients**, Basel, 10, n. 1, Basel, 2018.
- LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers**, London, 2, p. 16018, London, 2016.
- LOCATELLI, D. A. et al. Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition. **Food Chem**, Barking, 220, p. 219-224, Barking, 2017.
- MA, Q. et al. Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions. **Angiogenesis**, Londres, 23, n. 2, p. 91-104, Londres, 2020.
- MALUMBRES, M. et al. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, Londres, 9, n. 3, p. 153-166, Londres, 2009.
- MANSOUR, G. H. et al. Bee venom and its active component Melittin synergistically potentiate the anticancer effect of Sorafenib against HepG2 cells. **Bioorg Chem**, Amsterdam, 116, p. 105329, Amsterdam, 2021.

MAO, J. et al. Combined treatment with sorafenib and silibinin synergistically targets both HCC cells and cancer stem cells by enhanced inhibition of the phosphorylation of STAT3/ERK/AKT. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, 832, p. 39-49, Amsterdam, 2018.

MAO, X. Y. et al. Live or let die: Neuroprotective and anti-cancer effects of nutraceutical antioxidants. **Pharmacol Ther**, Oxford, 183, p. 137-151, Oxford, 2018.

MARTINOTTI, S. et al. Scratch Wound Healing Assay. **Methods Mol Biol**, Totowa, 2109, p. 225-229, Totowa, 2020.

MCGLYNN, K. A. et al. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, Oxford, 73 Suppl 1, p. 4-13, Oxford, 2021.

MENDONCA, L. M. et al. Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells. **Neurotoxicology**, Amsterdam, 34, p. 205-211, Amsterdam, 2013.

MILNER, J. A. Preclinical perspectives on garlic and cancer. **J Nutr**, Londres, 136, n. 3 Suppl, p. 827S-831S, Londres, 2006.

MIN, K. J. et al. The coffee diterpene kahweol enhances sensitivity to sorafenib in human renal carcinoma Caki cells through down-regulation of Mcl-1 and c-FLIP expression. **Oncotarget**, Albany, 8, n. 47, p. 83195-83206, Albany, 2017.

MIRODDI, M. et al. Potential beneficial effects of garlic in oncohematology. **Mini Rev Med Chem**, Hilversum, 11, n. 6, p. 461-472, Hilversum, 2011.

MISHRA, M. N. et al. Structure, function and role of CD44 in neoplasia. **J Oral Maxillofac Pathol**, Mumbai, 23, n. 2, p. 267-272, Mumbai, 2019.

MITTAL, S. et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, Wilmington, 14, n. 1, p. 124-131 e121, Wilmington, 2016.

MONDAL, A. et al. Resveratrol enhances the efficacy of sorafenib mediated apoptosis in human breast cancer MCF7 cells through ROS, cell cycle inhibition, caspase 3 and PARP cleavage. **Biomed Pharmacother**, Nova Iorque, 84, p. 1906-1914, Nova Iorque, 2016.

MORALES-GONZALEZ, J. A. et al. Garlic (*Allium sativum* L.): A Brief Review of Its Antigenotoxic Effects. **Foods**, Basel, 8, n. 8, Basel, 2019.

MUSTAFA, K. et al. In Vitro Anticancer Potential of *Berberis lycium* Royle Extracts against Human Hepatocarcinoma (HepG2) Cells. **Biomed Res Int**, Nova Iorque, 2020, p. 8256809, Nova Iorque, 2020.

MUZIO, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. **Cell**, Cambridge, 85, n. 6, p. 817-827, Cambridge, 1996.

MYZAK, M. C. et al. Dietary agents as histone deacetylase inhibitors. **Mol Carcinog**, Nova Iorque, 45, n. 6, p. 443-446, Nova Iorque, 2006.

NAGINI, S. Cancer chemoprevention by garlic and its organosulfur compounds-panacea or promise? **Anticancer Agents Med Chem**, Amsterdam, 8, n. 3, p. 313-321, Amsterdam, 2008.

NAULT, J. C. et al. Intratumor molecular and phenotypic diversity in hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res**, Nova Iorque, 21, n. 8, p. 1786-1788, Nova Iorque, 2015.

NEWMAN, D. J. et al. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, Saif Zone, 75, n. 3, p. 311-335, Saif Zone, 2012.

NICASTRO, H. L. et al. Garlic and onions: their cancer prevention properties. **Cancer Prev Res (Phila)**, Filadélfia, 8, n. 3, p. 181-189, Filadélfia, 2015.

NICHOLSON, D. W. et al. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**, Amsterdam, 22, n. 8, p. 299-306, Amsterdam, 1997.

NIRMALA, J. G. et al. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell Biol Toxicol**, Princeton, 36, n. 2, p. 145-164, Princeton, 2020.

OMS, O. M. d. S.-. **Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021**. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>. Acesso em: 20 de julho de 2020.

OUYANG, L. et al. Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. **Cell Prolif**, Oxford, 47, n. 6, p. 506-515, Oxford, 2014.

PAGE, B. et al. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **Int J Oncol**, Atenas, 3, n. 3, p. 473-476, Atenas, 1993.

PAL, H. C. et al. Fisetin, a phytochemical, potentiates sorafenib-induced apoptosis and abrogates tumor growth in athymic nude mice implanted with BRAF-mutated melanoma cells. **Oncotarget**, Albany, 6, n. 29, p. 28296-28311, Albany, 2015.

POZAROWSKI, P. et al. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, Totowa, 281, p. 301-311, Totowa, 2004.

QIU, J. et al. An improved matrix-based endovascular guidewire position simulation using fusiform ternary tree. **Int J Med Robot**, Ilkley, 16, n. 6, p. 1-11, Ilkley, 2020.

REDONDO-BLANCO, S. et al. New Insights toward Colorectal Cancer Chemotherapy Using Natural Bioactive Compounds. **Front Pharmacol**, Lausanne, 8, p. 109, Lausanne, 2017.

REN, G. et al. Antiproliferative Activity of Combined Biochanin A and Ginsenoside Rh(2) on MDA-MB-231 and MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Molecules**, Basel, 23, n. 11, Basel, 2018.

RISS, T. L. et al. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. **Methods Mol Biol**, Totowa, 740, p. 103-114, Totowa, 2011.

RODENAK-KLADNIEW, B. et al. Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways. **Life Sci**, Oxford, 199, p. 48-59, Oxford, 2018.

ROSS, R. K. et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. **Lancet**, Londres, 339, n. 8799, p. 943-946, Londres, 1992.

ROY CHOUDHURY, S. et al. Synergistic efficacy of sorafenib and genistein in growth inhibition by down regulating angiogenic and survival factors and increasing apoptosis through upregulation of p53 and p21 in malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification or

non-amplification. **Invest New Drugs**, Nova Iorque, 28, n. 6, p. 812-824, Nova Iorque, 2010.

RYU, J. H. et al. Physicochemical Properties, Biological Activity, Health Benefits, and General Limitations of Aged Black Garlic: A Review. **Molecules**, Basel, 22, n. 6, Basel, 2017.

SHANG, A. et al. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). **Foods**, Basel, 8, n. 7, Basel, 2019.

SHIN, J. W. et al. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: current and future. **World J Gastroenterol**, Beijing, 19, n. 37, p. 6144-6155, Beijing, 2013.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA Cancer J Clin**, Nova Iorque, 71, n. 1, p. 7-33, Nova Iorque, 2021.

SONG, J. D. et al. Molecular mechanism of diallyl disulfide in cell cycle arrest and apoptosis in HCT-116 colon cancer cells. **J Biochem Mol Toxicol**, Nova Iorque, 23, n. 1, p. 71-79, Nova Iorque, 2009.

SONG, X. et al. Biological Functions of Diallyl Disulfide, a Garlic-Derived Natural Organic Sulfur Compound. **Evid Based Complement Alternat Med**, Oxford, 2021, p. 5103626, Oxford, 2021.

STENNICKE, H. R. et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. **J Biol Chem**, Berlim, 273, n. 42, p. 27084-27090, Berlim, 1998.

SUANGTAMAI, T. et al. Diallyl disulfide induces apoptosis and autophagy via mTOR pathway in myeloid leukemic cell line. **Tumour Biol**, Amsterdam, 37, n. 8, p. 10993-10999, Amsterdam, 2016.

SUAREZ-ARNEDO, A. et al. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. **PLoS One**, São Francisco, 15, n. 7, p. e0232565, São Francisco, 2020.

SUBRAMANIAM, S. et al. Bioactive Compounds: Natural Defense Against Cancer? **Biomolecules**, Basel, 9, n. 12, Basel, 2019.

SUMANTRAN, V. N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. **Methods Mol Biol**, Clifton, 731, p. 219-236, Clifton, 2011.

SUN, L. et al. An Ursolic Acid Derived Small Molecule Triggers Cancer Cell Death through Hyperstimulation of Macropinocytosis. **J Med Chem**, Washington, 60, n. 15, p. 6638-6648, Washington, 2017.

TANDIA, M. et al. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. **Cancer Chemother Pharmacol**, Berlim, 79, n. 4, p. 759-766, Berlim, 2017.

TANG, A. et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. **Abdom Radiol (NY)**, Nova Iorque, 43, n. 1, p. 13-25, Nova Iorque, 2018.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, Basel, 35, n. 3, p. 206-221, Basel, 2000.

TORRECILLA, S. et al. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral

heterogeneity in hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, Amsterdam, 67, n. 6, p. 1222-1231, Amsterdam, 2017.

UZUN, L. et al. Antimicrobial Activity of Garlic Derivatives on Common Causative Microorganisms of the External Ear Canal and Chronic Middle Ear Infections. **Turk Arch Otorhinolaryngol**, Şişli-İstanbul, 57, n. 4, p. 161-165, Şişli-İstanbul, 2019.

VAKILI ZAHIR, N. et al. Evaluation of Silibinin Effects on the Viability of HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma) and HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) Cell Lines. **Iran J Pharm Res**, Tehran, 17, n. 1, p. 261-267, Tehran, 2018.

VILLANUEVA, A. Hepatocellular Carcinoma. **N Engl J Med**, Boston, 380, n. 15, p. 1450-1462, Boston, 2019.

VILLANUEVA, A. et al. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, Nova Iorque, 140, n. 5, p. 1501-1512 e1502, Nova Iorque, 2011.

WANG, L. et al. Low-dose microcystin-LR antagonizes aflatoxin B1 induced hepatocarcinogenesis through decreasing cytochrome P450 1A2 expression and aflatoxin B1-DNA adduct generation. **Chemosphere**, Oxford, 248, p. 126036, Oxford, 2020.

WELZEL, T. M. et al. Population-attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. **Am J Gastroenterol**, Nova Iorque, 108, n. 8, p. 1314-1321, Nova Iorque, 2013.

WEN, J. et al. Enhancement of diallyl disulfide-induced apoptosis by inhibitors of MAPKs in human HepG2 hepatoma cells. **Biochem Pharmacol**, Oxford, 68, n. 2, p. 323-331, Oxford, 2004.

WEN, N. et al. The clinical management of hepatocellular carcinoma worldwide: A concise review and comparison of current guidelines: 2022 update. **Biosci Trends**, Tóquio, 16, n. 1, p. 20-30, Tóquio, 2022.

WEST, J. et al. Risk of hepatocellular carcinoma among individuals with different aetiologies of cirrhosis: a population-based cohort study. **Aliment Pharmacol Ther**, Oxford, 45, n. 7, p. 983-990, Oxford, 2017.

WILHELM, S. M. et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. **Mol Cancer Ther**, Filadélfia, 7, n. 10, p. 3129-3140, Filadélfia, 2008.

WINGETT, D. et al. A role of ZnO nanoparticle electrostatic properties in cancer cell cytotoxicity. **Nanotechnol Sci Appl**, Auckland, 9, p. 29-45, Auckland, 2016.

WITTE, I. et al. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicol Sci**, Orlando, 97, n. 1, p. 21-26, Orlando, 2007.

WU, G. et al. Dietary Methionine Restriction Upregulates Endogenous H2 S via miR-328-3p: A Potential Mechanism to Improve Liver Protein Metabolism Efficiency in a Mouse Model of High-fat-diet-induced Obesity. **Mol Nutr Food Res**, Weinheim, 63, n. 5, p. e1800735, Weinheim, 2019.

WU, X. J. et al. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide

(DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. **Mutat Res**, Amsterdam, 579, n. 1-2, p. 115-124, Amsterdam, 2005.

XIA, L. et al. Diallyl disulfide inhibits colon cancer metastasis by suppressing Rac1-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Onco Targets Ther**, Auckland, 12, p. 5713-5728, Auckland, 2019.

XIANG, L. et al. A pentacyclic triterpene natural product, ursolic acid and its prodrug US597 inhibit targets within cell adhesion pathway and prevent cancer metastasis. **Oncotarget**, Albany, 6, n. 11, p. 9295-9312, Albany, 2015.

XIAO, D. et al. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. **Oncogene**, Basingstoke, 23, n. 33, p. 5594-5606, Basingstoke, 2004.

XIAO, Y. et al. The combination of Biochanin A and SB590885 potentiates the inhibition of tumour progression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Cell Int**, Londres, 20, p. 371, Londres, 2020.

XIONG, T. et al. Tristetraprolin: A novel target of diallyl disulfide that inhibits the progression of breast cancer. **Oncol Lett**, Atenas, 15, n. 5, p. 7817-7827, Atenas, 2018.

XU, X. et al. Identification of a pro-elongation effect of diallyl disulfide, a major organosulfur compound in garlic oil, on microglial process. **J Nutr Biochem**, Nova Iorque, 78, p. 108323, Nova Iorque, 2020.

XU, X. et al. Biosynthesis of sorafenib coated graphene nanosheets for the treatment of gastric cancer in patients in nursing care. **J Photochem Photobiol B**, Amsterdam, 191, p. 1-5, Amsterdam, 2019.

YANG, J. et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. **Biomed Pharmacother**, Nova Iorque, 103, p. 699-707, Nova Iorque, 2018.

YANG, J. D. et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, Londres, 16, n. 10, p. 589-604, Londres, 2019.

YANG, J. D. et al. Diabetes Mellitus Heightens the Risk of Hepatocellular Carcinoma Except in Patients With Hepatitis C Cirrhosis. **Am J Gastroenterol**, Nova Iorque, 111, n. 11, p. 1573-1580, Nova Iorque, 2016.

YANG, J. D. et al. Hepatocellular carcinoma: A global view. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, Londres, 7, n. 8, p. 448-458, Londres, 2010.

YI, L. et al. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. **Food Chem Toxicol**, Oxford, 57, p. 362-370, Oxford, 2013.

YIN, X. et al. Diallyl disulfide inhibits the metastasis of type esophagealgastric junction adenocarcinoma cells via NF-kappaB and PI3K/AKT signaling pathways in vitro. **Oncol Rep**, Atenas, 39, n. 2, p. 784-794, Atenas, 2018.

YOUM, I. et al. siRNA-loaded biodegradable nanocarriers for therapeutic MAPK1 silencing against cisplatin-induced ototoxicity. **Int J Pharm**, Amsterdam, 528, n. 1-2, p. 611-623, Amsterdam, 2017.

YOUNOSSI, Z. M. et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. **Hepatology**, Londres, 64, n. 5, p. 1577-1586, Londres, 2016a.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, Londres, 64, n. 1, p. 73-84, Londres, 2016b.

YUE, Z. et al. Diallyl Disulfide Induces Apoptosis and Autophagy in Human Osteosarcoma MG-63 Cells through the PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Molecules**, Basel, 24, n. 14, Basel, 2019.

YURDACAN, B. et al. The role of usnic acid-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma. **Hum Exp Toxicol**, Houndmills, 38, n. 2, p. 201-215, Houndmills, 2019.

ZHANG, C. et al. Sorafenib targets the mitochondrial electron transport chain complexes and ATP synthase to activate the PINK1-Parkin pathway and modulate cellular drug response. **J Biol Chem**, Berlim, 292, n. 36, p. 15105-15120, Berlim, 2017.

ZHANG, Y. et al. Phytochemicals of garlic: Promising candidates for cancer therapy. **Biomed Pharmacother**, Nova Iorque, 123, p. 109730, Nova Iorque, 2020.

ZHENG, R. et al. Liver cancer incidence and mortality in China: Temporal trends and projections to 2030. **Chin J Cancer Res**, Hong Kong, 30, n. 6, p. 571-579, Hong Kong, 2018.

ZHOU, Y. et al. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. **Nutrients**, Basel, 8, n. 3, p. 156, Basel, 2016.

ZHOU, Y. et al. DADS downregulates the Rac1-ROCK1/PAK1-LIMK1-ADF/cofilin signaling pathway, inhibiting cell migration and invasion. **Oncol Rep**, Atenas, 29, n. 2, p. 605-612, Atenas, 2013.

