

**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  $\mu\text{M}$  e SORA 4  $\mu\text{M}$ . 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  $\mu\text{M}$  e SORA 8  $\mu\text{M}$ . 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  $\mu$ M and SORA 4  $\mu$ M. 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  $\mu$ M and SORA 8  $\mu$ M. 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 <sub>50</sub> para dissulfeto de dialila (μM). ....	28
Tabela 4. Valores calculados de IC <sub>50</sub> 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 $\alpha$	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- $\beta$	Receptor- $\beta$ 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 .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.1 Objetivo geral .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2 Objetivos específicos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.1 Material.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.1.1 Agentes químicos e reagentes.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.1.2 Linhagens celulares e condições de cultivo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2 Métodos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.1 Ensaio de viabilidade celular .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.2 Ensaio de LIVE/DEAD .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.3 Ensaio de sobrevivência clonogênica .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.4 Identificação da morte celular por apoptose .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.5 Modulação do ciclo celular por citometria de fluxo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.6 Identificação de morte celular induzida por autofagia ..	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.7 Migração celular.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.8 Invasão celular .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.9 Estresse oxidativo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.10 Ensaio de genotoxicidade .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.11 Expressão gênica .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.12 Expressão de proteínas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.3 Análise estatística.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4. RESULTADOS.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1 Citotoxicidade .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.1 Citotoxicidade em tratamento isolado .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1.2 Viabilidade celular em tratamentos associados.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2 Dissulfeto de dialila induz citotoxicidade em células HepG2 e HUVEC...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.3 Dissulfeto de dialila diminui a fração de sobrevivência em células HepG2 e HUVEC	<b>Erro! Indicador não definido.</b>



4.4 Dissulfeto de dialila isolado e associado induz apoptose nas células HepG2.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.5 Investigar alteração no ciclo celular por citometria de fluxo	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.6 Morte celular mediada por autofagia .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.7 Dissulfeto de dialila inibe a migração em tratamento isolado e associado nas células HepG2 e HUVEC.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.8 Invasão celular .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.10 Dissulfeto de dialila induz danos ao DNA em células HepG2 .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.11 Análise da expressão relativa de genes .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.12 Análise da expressão de proteínas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5. DISCUSSÃO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6. CONCLUSÕES.....	12
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15

## 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- $\beta$  do fator de crescimento derivado das plaquetas (PGRFR- $\beta$ ) 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 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

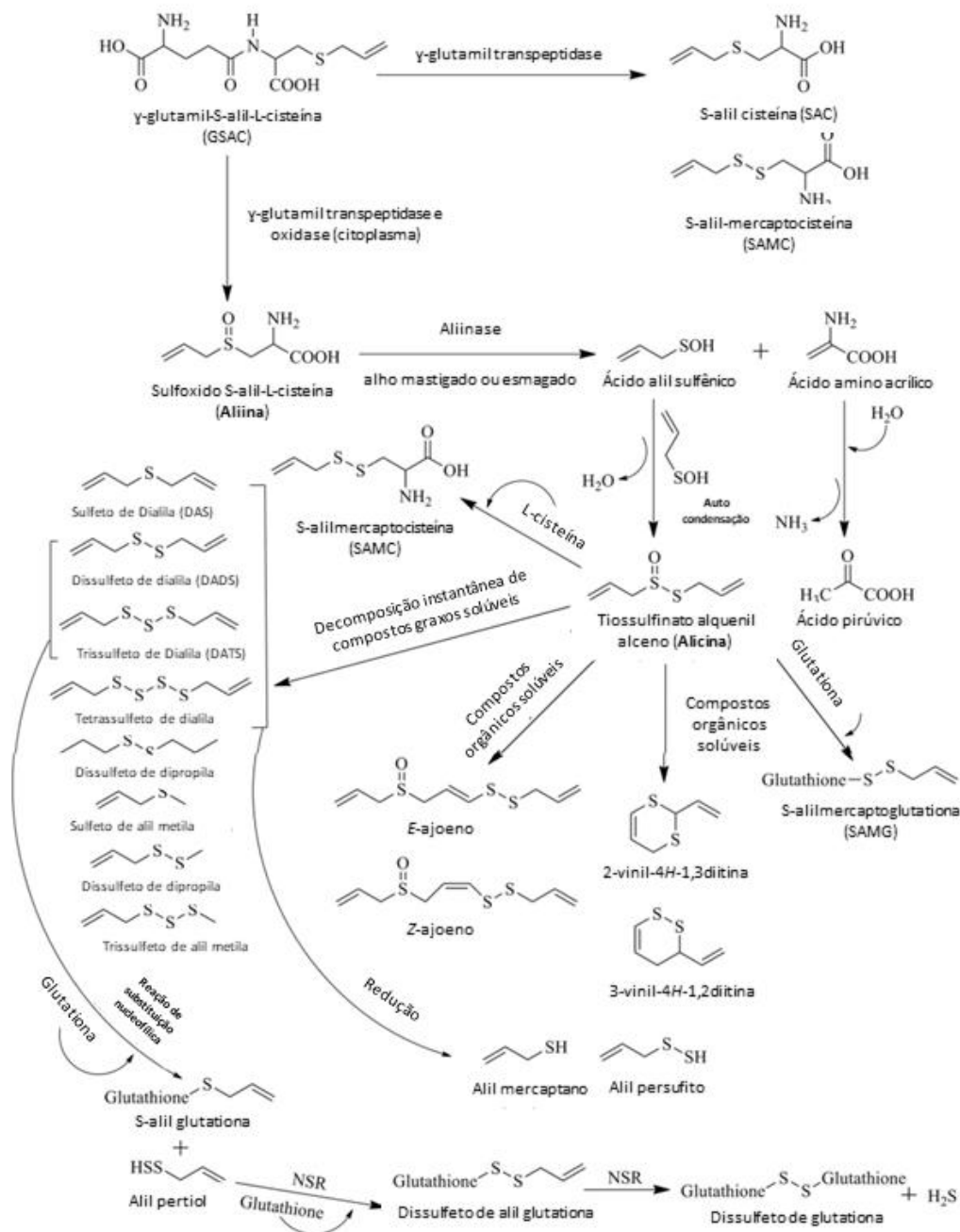
organossulfurados, ~ 2% de proteína, ~ 1,2 % de aminoácidos livres e ~ 1,5% de fibra, bem como ácidos graxos, fenóis e oligoelementos (NAGINI, 2008; BUTT et al., 2009; ZHANG et al., 2020). O alho também contém vários compostos bioativos não-enxofre, como saponinas, sapogeninas, saponinas esteroides, 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 amina 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



(Bax, FAS, caspases, citocromo c, Rb, p21 e p53), diminuem os fatores pró-inflamatórios (NF- $\kappa$ 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 $\alpha$ ), 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. 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  $\mu\text{M}$  e em células HUVEC após 24h. E o sorafenibe a partir de 4  $\mu\text{M}$ .

- Na viabilidade pelo ensaio de LIVE/DEAD, observamos diminuição da viabilidade celular a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  DADS + 8  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  de DADS e em todas as concentrações testadas em células HUVEC. 8  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  de dissulfeto de dialila e 8  $\mu\text{M}$  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 µM 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 genotoxicidade 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.

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](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23228582017&pIdAnexo=10313265). Acesso em: 29 de set. de 2019.

AYAZ, E. et al. [Garlic (*Allium sativum*) and traditional medicine]. **Turkiye Parazitol Derg**, İzmir, 31, n. 2, p. 145-149, İzmir, 2007.

BAEK, S. C. et al. Anti-adipogenic Effect of beta-Carboline Alkaloids from Garlic (*Allium sativum*). **Foods**, Basel, 8, n. 12, Basel, 2019.

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.

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.

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

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.

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.



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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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

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

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.

TORRECILLA, S. et al. Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, Amisterdam, 67, n. 6, p. 1222-1231, Amisterdam, 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.

XIA, L. et al. Diallyl disulfide inhibits colon cancer metastasis by suppressing Rac1-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Oncotargets 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, 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.

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.

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.

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.

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, 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.

