



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

NAYANE DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DO ZERUMBONE EM
CULTURA 3D E AVALIAÇÃO NA MIGRAÇÃO CELULAR EM
CÉLULAS HT-29**

Londrina
2022

NAYANE DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DO ZERUMBONE EM
CULTURA 3D E AVALIAÇÃO NA MIGRAÇÃO CELULAR EM
CÉLULAS HT-29**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, por meio do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL.

S586d Silva, Nayane de Oliveira.
Efeitos antiproliferativos do zerumbone em cultura 3D e avaliação na migração celular em células HT-29 / Nayane de Oliveira Silva. - Londrina, 2022.
105 f.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Câncer - Tese. 2. Fitoquímicos - Tese. 3. Zerumbone - Tese. 4. Cultura 3D - Tese. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.1

NAYANE DE OLIVEIRA SILVA

**EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DO ZERUMBONE EM CULTURA
3D E AVALIAÇÃO NA MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS HT-29**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de março de 2022.

Dedico todo esforço que depositei neste trabalho ao meus pais, Marli e Narciso, por sempre me incentivarem a estudar, e aos meus amados avós, Maria Luiza e Dionílio, que já se foram, mas continuam sendo minha maior força e inspiração na vida.

AGRADECIMENTOS

Me faltam palavras para agradecer todas as pessoas que colaboram para tornar este sonho possível. Eu fui muito abençoada, nunca me faltaram desafios e empecilhos ao longo do caminho que me trouxe até aqui, mas eu sempre encontrei pessoas excepcionais dispostas a me ajudar a superá-los. São tantas que é impossível agradecer à todas, mas nunca esquecerei de nenhuma delas.

Queria agradecer primeiramente minha família, principalmente meus pais, Marli e Narciso, que sempre fizeram tudo que eles podiam para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos. Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes, mesmo que longe, torcendo por mim e tornando minha jornada mais leve e feliz.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, meu excelente orientador, tenho tanto o que agradecer, pois sem a oportunidade que ele me deu, nada disso seria possível. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório, por ter me dado esse voto de confiança e por todos os ensinamentos, que não foram poucos. Espero ter feito jus ao trabalho que o senhor me confiou. Aproveito para agradecer também a todos os meus professores, é imensurável a importância de vocês e do trabalho que exercem.

Aos meus amigos do laboratório de genética toxicológica, Luan, Liana, Amanda, Matheus e Maria e todos os demais que fazem parte desse laboratório incrível. Não tenho como agradecer tudo que fizeram por mim, eu não acredito na sorte que eu tive em poder fazer parte da mesma equipe e contar com a amizade de vocês. Não poderia deixar de agradecer em especial ao Luan, o que é muito pouco diante de tudo que ele fez por mim, me ensinando e ajudando em tudo que eu precisei, sempre com muita paciência.

Gostaria de agradecer aos professores que gentilmente aceitaram ceder um pouco de seu tempo para fazer parte da minha banca de qualificação e defesa, contribuindo com seus conhecimentos para que eu pudesse concluir minha jornada até aqui e entregar um bom trabalho. Por fim, agradeço à Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e as agências de fomento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES/PROAP e Bolsa de demanda social) - Código de Financiamento FINEP (01.13.0351.00), CNPq (306386/2017-8) e Fundação Araucária (Conv. 001/2017 - Protocolo 47.396).

Acredite em tudo aquilo / que lhe torna diferente
/ em tudo que já passou / e no que vem pela
frente / Acredite e seja forte / não espere pela
sorte / não espere por ninguém / pois de tanto
esperar / você pode estacionar / e deixar de ir
além.

Acredite, e não se explique / pois poucos vão
entender: só se compreende um sonho
/ se o sonhador for você.

Bráulio Bessa

SILVA, Nayane de Oliveira. **Efeitos antiproliferativos do zerumbone em cultura 3D e avaliação na migração celular em células HT-29 tratadas com zerumbone.** 2022. 105 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Zerumbone é um fitoquímico isolado de plantas da família Zingiberaceae, encontrado principalmente nos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. Inúmeros estudos demonstraram que entre suas diversas propriedades farmacológicas está sua potente ação como agente antitumoral. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos antiproliferativos e antimigratórios do zerumbone em cultura de células da linhagem HT-29, avaliando seu modo de ação mediante a análise de morte, ciclo celular e volume, correlacionando os dados obtidos com a análise de expressão gênica (mRNA) no modelo de cultura de esferoides multicelulares tumorais. Os resultados obtidos evidenciaram que o tratamento com zerumbone foi citotóxico nas concentrações de 30, 40, 50, 60 e 80 μ M, com um IC50 calculado de 83,54 μ M que inibiu a migração celular. Zerumbone ocasionou aumento no volume médio dos esferoides no tempo de 72h em relação ao controle, levando a desagregação das células e desconfiguração das zonas características deles. A análise de morte celular demonstrou que em 24h e 72h houve um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas nos esferoides tratados com zerumbone em comparação com o controle, além do aumento da porcentagem relativa de células na fase G1 do ciclo celular em 24h e 72h de tratamento. Por fim, zerumbone alterou a expressão de mRNAs de genes relacionados a vias moleculares de morte celular (*BBC3*), estresse de retículo (*ERN1*), danos no DNA (*GADD45A*), regulação do ciclo celular (*CDKN1A*, *NFKB1*, *MYC* e *TP53*) e autofagia (*BECN1* e *SQSTM1*). Esses resultados tomados em conjunto indicam que zerumbone é um potencial candidato para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer por alterar múltiplas vias de sinalização celular, sendo que estudos como esse que utilizam o sistema de cultura 3D são ferramentas importantes para auxiliar nessa investigação.

Palavras-chave: Antitumoral. Esferoide. Expressão gênica. Fitoquímico. Zerumbone.

SILVA, Nayane de Oliveira. **Antiproliferative effects of zerumbone in 3D culture and evaluation on cell migration in HT-29 cells**. 2022. 105 p. Dissertation (Master's degree in Genetic and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Zerumbone is a phytochemical isolated from plants of the Zingiberaceae family, found mainly in the rhizomes of *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. Several studies have shown that in addition to its diverse pharmacological properties, zerumbone is a potent antitumor agent. The objective of this work was to identify and analyze the antiproliferative and antimigratory effects of zerumbone in HT-29 cell line, evaluating its mode of action on spheroids through the analysis of cell death, cell cycle and size, correlating the data obtained with the analysis of gene expression (mRNA) in the spheroid culture model. The results obtained showed that the treatment with zerumbone was cytotoxic at concentrations of 30, 40, 50, 60 e 80 μ M and that the concentration of 83.54 μ M (IC50) inhibited cell migration. Zerumbone caused an increase in the average size of the spheroids within 72 hours in relation to the control, leading to cell disaggregation and disfigurement of their characteristic zones. Cell death analysis showed that at 24h and 72h there was a significant increase in the percentage of apoptotic cells in the zerumbone-treated spheroids compared to the control, in addition to an increase in the relative percentage of cells in the G1 phase of the cell cycle at 24h and 72h of treatment. Zerumbone also caused alterations in the expression of mRNA from genes related to molecular pathways of cell death (*BBC3*), reticulum stress (*ERN1*), DNA damage (*GADD45A*), cell cycle regulation (*CDKN1A*, *NFKB1*, *MYC* and *TP53*) and autophagy (*BECN1* and *SQSTM1*). These results indicate that zerumbone is a potential candidate for the development of new anticancer drugs by altering multiple cell signaling pathways and studies such as this one, that use the 3D culture system, are important tools to support this investigation.

Keywords: Antitumor. Gene expression. Spheroid. Phytochemical. Zerumbone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Capacidades biológicas adquiridas pelas células cancerosas ao longo do desenvolvimento dos tumores	17
Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil para 2020 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma	22
Figura 3 – Representação da sequência clássica adenoma-carcinoma	23
Figura 4 – Cronograma de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos	29
Figura 5 – Representação do complexo microambiente tumoral	32
Figura 6 – Principais diferenças entre cultura de células bidimensional em monocamada (2D) e em três dimensões (3D)	36
Figura 7 – A estrutura de um esferoide multicelular tumoral mostrando suas zonas características.....	37
Figura 8 – Células da linhagem HT-29 observadas ao microscópio de luz invertido com aumento de 100x	39
Figura 9 – <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith.....	48
Figura 10 – Estrutura química do zerumbone	49

ARTIGO

Figura 1 – Resultado do ensaio de viabilidade celular com o corante resazurina e de migração celular pelo ensaio de cicatrização de feridas em células HT-29 tratadas com diferentes concentrações de zerumbone	76
Figura 2 – Imagem de microscopia de luz de esferoides tumorais multicelulares de células HT-29 após o tratamento com zerumbone	78
Figura 3 – Resultado da avaliação de volume e capacidade de recuperação de esferoides tumorais de células HT-29 tratadas com zerumbone	79
Figura 4 – Resultado da análise de apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo em esferoides de células HT-29	81
Figura 5 – Resultado da análise de expressão gênica relativa de mRNA obtida por RT-qPCR em esferoides de células HT-29 após o tratamento com zerumbone	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Média percentual da viabilidade celular na linhagem tumoral HT-29 obtida após 24 horas de tratamento com o composto zerumbone	97
Tabela 2	– Área da ferida após o tratamento com zerumbone	97
Tabela 3	– Largura da ferida após o tratamento com zerumbone	97
Tabela 4	– Volume médio (mm ³) de esferoides de células HT-29 após o tratamento com zerumbone nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas	98
Tabela 5	– Média do percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 24 horas de tratamento com zerumbone	98
Tabela 6	– Média do percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 72 horas de tratamento com zerumbone	98
Tabela 7	– Média percentual relativa de células HT-29 nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento com zerumbone	98
Tabela 8	– Média percentual relativa de células HT-29 nas diferentes fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com zerumbone	99
Tabela 9	– Resultado obtido para o percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 24 horas de tratamento com zerumbone	100
Tabela 10	– Resultado obtido para o percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 72 horas de tratamento com zerumbone	101
Tabela 11	– Resultado obtido para o percentual relativo de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento com zerumbone	102
Tabela 12	– Resultado obtido para o percentual relativo de células nas diferentes fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com zerumbone	103
Tabela 13	– Sequências iniciadoras utilizadas na RT-qPCR	104
Tabela 14	– Expressão gênica relativa normalizada com os genes de referência <i>ACTB</i> e <i>GAPDH</i> utilizando o software REST	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ACF	Focos De Cripta Aberrante
ANOVA	Análise de Variância
AOM	Azoximetano
CCR	Câncer Colorretal
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DOX	Doxorrubicina
DSS	Sulfato de Dextrano de Sódio
ETBF	<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênico
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Glutathione
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
mRNA	RNA mensageiro
NMEs	Novas Entidades Moleculares
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RB	Proteína Retinoblastoma
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
SBF	Soro Bovino Fetal
SETOC	Teoria Evolucionária Sistêmica do Câncer
SMT	Teoria da Mutação Somática
TOFT	Teoria do Campo de Organização de Tecidos
UEL	Universidade Estadual de Londrina
ZER	Zerumbone

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	16
2.2	CÂNCER COLORRETAL	21
2.3	DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEDICAMENTOS	26
2.4	CULTURA DE CÉLULAS 3D COMO MODELO EXPERIMENTAL	31
2.5	LINHAGEM CELULAR HT-29	39
2.6	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVAS DROGAS	40
2.7	FITOQUÍMICOS	44
2.8	ZERUMBONE	47
3	OBJETIVO	54
3.1	OBJETIVO GERAL	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
	REFERÊNCIAS	55
	ARTIGO	68
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1	LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTURA E AGENTES QUÍMICOS	70
2.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (RESAZURINA)	71
2.3	ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS <i>IN VITRO</i>	71
2.4	CULTIVO CELULAR 3D – ESFEROIDES	72
2.4.1	ENSAIO DE VOLUME DOS ESFEROIDES	72
2.4.2	ENSAIO DE CICLO CELULAR E APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	73
2.4.3	EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA (mRNA) EM TEMPO REAL	73
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	74

3	RESULTADOS	75
3.1	CITOTOXICIDADE E MIGRAÇÃO CELULAR	75
3.2	ENSAIO DE VOLUME DOS ESFEROIDES	77
3.3	ENSAIO DE APOPTOSE E CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	80
3.3	EXPRESSÃO GÊNICA DE mRNA EM ESFEROIDES	82
4	DISCUSSÃO	82
5	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE	97
	Apêndice A – Tabelas dos resultados	97

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos da atualidade devido sua magnitude epidemiológica, social e econômica (INCA, 2019a). Além disso, o câncer representa uma significativa causa de morbimortalidade, estima-se que em 2020 ocorreram no mundo cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer e 10 milhões de mortes pela doença (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, é estimado para cada ano do triênio de 2020/2022 cerca de 625 mil novos casos de câncer, sendo o de pele não melanoma o mais incidente, com a expectativa de 177 mil novos casos por ano, seguido dos cânceres de mama e próstata (cerca 66 mil casos cada) e cólon e reto (41 mil novos casos) (INCA, 2019b). Em comparação com a estimativa para o biênio de 2018/2019, que era de 600 mil novos casos por ano, é possível constatar um aumento na incidência da doença no país (INCA, 2018), o que alerta para a necessidade eminente de se implementar novas estratégias para combatê-la (RANI *et al.*, 2020).

Ao passo que aumenta a incidência de câncer no mundo, as pesquisas relacionadas com a busca de novos tratamentos para essa doença também avançam. Apesar das terapias disponíveis, devido à falta de seletividade, aos efeitos adversos graves que impedem o uso a longo prazo, a toxicidade inespecífica, a resistência e a recorrência do tumor após o tratamento, se faz necessária a busca por novas abordagens terapêuticas (RAMCHANDANI *et al.*, 2020; GIRISA *et al.*, 2019). A falta de medicamentos eficazes e acessíveis é um dos desafios mais difíceis enfrentados globalmente, sendo imprescindível que se desenvolvam novas terapias anticâncer que sejam altamente precisas, que ocasionem menos efeitos adversos e que sejam viáveis economicamente (RANI *et al.*, 2020).

Nesse cenário, os fitoquímicos e seus derivados sintéticos contribuem significativamente como fonte de moléculas para o desenvolvimento de novos medicamentos (BARBIERI *et al.*, 2017). Além de causarem menos efeitos adversos, uma grande vantagem é que esses compostos naturais comumente interagem com vários alvos biológicos, propriedade muito desejável na terapia do câncer, uma vez que a doença geralmente envolve a desregulação de múltiplos genes e vias de sinalização celular (PRASANNAN *et al.*, 2012; BOULOS *et al.*, 2019). Diversas plantas produzem metabólitos que são otimizados para exercerem funções biológicas e que

ainda estão longe de serem completamente identificados e compreendidos, o que evidencia a urgência de mais investigações nessa área (ATANASOV *et al.*, 2015).

Há um número abundante de fitoquímicos que possuem propriedades medicinais, entre os quais está o zerumbone, que é encontrado com maior abundância na planta tropical *Zingiber zerumbet* (L.) Sm, planta pertencente à família Zingiberaceae, sendo popularmente conhecida como gengibre amargo e tradicionalmente encontrada em toda a Ásia (KOGA; BELTRAME; PEREIRA, 2016; GIRISA *et al.*, 2019). Estudos identificaram um conjunto de propriedades farmacológicas apresentadas por esse fitoquímico, incluindo efeitos antioxidantes, antibacterianos, antipiréticos, anti-inflamatórios, antialérgicos, imunomodulatórios, além de possuir uma potente atividade antineoplásica em diversos modelos tumorais (MURAKAMI *et al.*, 2002; SOMCHIT *et al.*, 2005; KEONG *et al.*, 2010; SULAIMAN *et al.*, 2010; PRASANAN *et al.*, 2012; SOMCHIT *et al.*, 2012; HEMN *et al.*, 2015; SHIEH *et al.*, 2015; LEUNG *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

Devido ao potencial do zerumbone como agente anticâncer, se fazem necessários estudos mais aprofundados sobre seu modo de ação, de forma a aprimorar a compreensão de seu desempenho farmacológico e sua toxicidade. Nesse cenário, os estudos *in vitro* com linhagens celulares são muito importantes, pois permitem o desenvolvimento de sistemas modelo para esse tipo de investigação (SEGERITZ; VALLIER, 2017). Entre os diversos modelos de cultura *in vitro*, as tecnologias tridimensionais têm chamado cada vez mais atenção dos pesquisadores, pois tornam possível mimetizar diversos atributos essenciais das células *in vivo*. Sua utilização fornece dados mais precisos sobre interações célula-célula, ação de drogas, perfil metabólico, entre outros aspectos (LANGHANS, 2018; JENSEN; TENG, 2020).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e analisar os efeitos antiproliferativos do fitoquímico zerumbone em culturas de células da linhagem HT-29 isoladas de um adenocarcinoma colorretal, tipo histológico mais frequente de câncer colorretal (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019), avaliando seu mecanismo de ação mediante a análise de respostas celulares envolvidas no processo de morte e migração celular, correlacionando com a expressão gênica (mRNA), principalmente no modelo de cultura em três dimensões.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O câncer é um problema grave que afeta a saúde de todos os povos, estando em segundo lugar entre as doenças que mais causam mortes no mundo anualmente (HASSANPOUR; DEGHANI, 2017). Ele é a primeira ou a segunda causa de mortes prematuras, entre 30 e 69 anos, em 134 de 183 países, e ocupa a terceira ou quarta posição em outros 45 países (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Sua incidência e mortalidade vêm aumentando ao longo do tempo, em parte pelo envelhecimento e crescimento populacional, mas também devido a mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco, sobretudo os associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY *et al.*, 2018). Estima-se que até 2040 o mundo deve ultrapassar 27 milhões de novos casos de câncer por ano (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

A palavra câncer é um termo genérico usado para se referir a um conjunto de mais de 200 doenças que tem entre si uma série de características em comum, mas que, ao mesmo tempo, são muito distintas em se tratando de sua origem genética e histopatológica, sua progressão, agressividade, prognóstico, conduta terapêutica e em sua resposta aos diferentes tratamentos (SAITO *et al.*, 2015).

Segundo Alberts e colaboradores (2017), as células cancerosas possuem duas propriedades hereditárias principais que juntas tornam o câncer particularmente perigoso. A primeira delas consiste na capacidade dessas células de se reproduzirem desobedecendo aos limites normais da divisão celular, e a segunda é a capacidade de invasividade, que permite a célula se desprender do tecido, penetrar na corrente sanguínea e/ou nos vasos linfáticos e formar tumores secundários, denominados metástases, em outros locais do corpo (ALBERTS *et al.*, 2017).

Hanahan e Weinberg (2011) descreveram algumas capacidades biológicas adquiridas pelas células cancerosas ao longo do desenvolvimento dos tumores. Segundo os autores, as células cancerosas possuem a capacidade de manter a sinalização proliferativa, são insensíveis aos supressores de crescimento, resistem à morte celular, adquirem imortalidade replicativa, induzem a angiogênese, ativam invasões e metástases, reprogramam o metabolismo energético e escapam da destruição imune. Além dessas características, há ainda a instabilidade genômica,

que acelera a aquisição de diversidade genética nessas células, a promoção de inflamação e o recrutamento de outros tipos celulares aparentemente normais que criam um “microambiente tumoral” (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 - Capacidades biológicas adquiridas pelas células cancerosas ao longo do desenvolvimento dos tumores.



Fonte: Traduzido de Hanahan e Weinberg (2011).

Dentre as teorias que explicam a ocorrência e o desenvolvimento dos cânceres, a Teoria da Mutação Somática (SMT) é a mais amplamente aceita, segundo ela a força motriz do câncer são as mutações no DNA. Além dela, outras teorias foram propostas, como a Teoria do Campo de Organização de Tecidos (TOFT). De acordo com essa última teoria o principal gerador do câncer é a perda da organização do tecido. Recentemente os pesquisadores propuseram uma nova teoria, a Teoria Evolucionária Sistêmica do Câncer (SETOC), que propõe que o processo de transformação neoplásica resulta da discordância da complexa organização endossimbiótica que caracteriza a célula eucariótica normal, que pode levar a mudanças na organização celular e interações do tecido (MAZZOCCA; FAIS, 2021).

O processo de formação de um câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, no geral, ocorre de forma lenta, muitas vezes demandando vários anos

para que uma célula cancerosa se prolifere até originar um tumor visível (INCA, 2019a). Quando uma célula anormal cresce e se prolifera descontroladamente ela dará origem a uma neoplasia, que pode ser benigna ou maligna. As neoplasias benignas têm o crescimento lento e permanecem localizadas, ou seja, não são invasivas. Uma neoplasia é considerada um câncer verdadeiro se for maligna, neste caso, as células têm a capacidade de crescerem rapidamente e se espalham para outros tecidos e órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ALBERTS *et al.*, 2017).

Tanto as neoplasias benignas quanto as malignas podem ser induzidas por agentes denominados carcinógenos (KLAUNIG, 2014). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) tem sido um recurso global importante para a identificação de carcinógenos. A IARC já avaliou mais de 1000 agentes, que compreendem substâncias químicas, físicas, biológicas, condições de trabalho, constituintes da dieta e outras exposições da vida cotidiana (SAMET *et al.*, 2020). Entre os agentes que foram avaliados pela IARC, 319 foram classificados como possivelmente carcinógenos, 89 como provavelmente carcinógenos e 121 como carcinógenos para humanos (IARC, 2021).

O câncer é uma doença genética ocasionada por uma sequência de alterações no DNA da célula que levam à proliferação descontrolada, boa parte dessas alterações envolvem principalmente modificações na sequência do DNA propriamente dito, ou seja, mutações (KASPER *et al.*, 2017). As mutações podem ser ocasionadas por carcinógenos que estão no ambiente, mas também podem ocorrer espontaneamente, como resultado de falhas no processo de replicação e reparo do DNA (ALBERTS *et al.*, 2011; KASPER *et al.*, 2017). Os cânceres também podem estar relacionados a alterações epigenéticas, nesse caso não há mudança na sequência de nucleotídeos do DNA, mas sim modificações na estrutura da cromatina que são herdáveis e persistentes e que afetam a expressão dos genes (ALBERTS *et al.*, 2017).

Embora a maior parte dos cânceres surja esporadicamente, os cânceres hereditários correspondem a cerca de 5% dos casos de câncer, ocorrendo geralmente em idade precoce e afetando indivíduos de uma mesma família (KASPER *et al.*, 2017). Um exemplo disso são as pessoas que herdaram um defeito genético em um dos diversos mecanismos de reparo ao DNA. Esses indivíduos são mais propensos a desenvolver câncer, pois as suas células irão acumular mutações em uma taxa muito mais elevada (ALBERTS *et al.*, 2017).

Os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais são duas grandes classes principais de genes que estão envolvidos no estabelecimento e na progressão do câncer (LODISH *et al.*, 2014), ambos exercendo seus efeitos devido a habilidade de controlarem o ciclo celular ou a morte celular por meio de mecanismos complexos (KASPER *et al.*, 2017). Danos nestes genes podem resultar em produtos proteicos alterados ou na proteína normal ocorrendo em quantidade anormal, o que acabará desregulando o crescimento e a diferenciação celular (PERERA, 1996; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os proto-oncogenes são genes altamente controlados que codificam proteínas que promovem a regulação positiva do crescimento celular e dos sinais de sobrevivência da célula. Caso sejam alterados, seja por translocação cromossômica, mutação, modulação epigenética, amplificação de genes ou inserção retroviral, eles passam a ser chamados então de oncogenes (BAGHERI; BELL; KHAN, 2012; ALBERTS *et al.*, 2017). Os produtos resultantes da ativação dos oncogenes atuam de forma dominante, pois a mutação de somente um único alelo pode bastar para que a célula adquira vantagens, como o aumento de sua proliferação e a indiferença frente aos sinais inibidores normais de crescimento, o que poderá resultar na formação de uma neoplasia e na aquisição de um fenótipo maligno (WARD, 2002; KING, 2006; ZACHARY, 2017).

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que regulam negativamente o crescimento celular, como por exemplo proteínas envolvidas na parada do ciclo celular e na apoptose, e quando inativados, genética ou epigeneticamente, permitem a proliferação descontrolada das células e o crescimento do tumor. Ao contrário dos proto-oncogenes, que são ativados pela mutação em apenas um dos dois alelos, os genes supressores tumorais geralmente são inativados por mutações pontuais ou por exclusão em ambos os alelos do gene. Uma vez que os genes supressores tumorais são inativados, a célula escapa do rigoroso controle do ciclo celular e se torna predisposta ao crescimento e divisão descontrolada (BAGHERI; BELL; KHAN, 2012; ZACHARY, 2017).

Há ainda uma terceira classe de genes mais especializados relacionados ao câncer chamados genes *caretakers*, que incluem, por exemplo, os genes que codificam enzimas de reparo ao DNA. Eles geralmente estão associados a proteção da integridade do genoma das células. Embora não impeçam diretamente a proliferação celular, as células que perdem a sua habilidade de reparar erros, falhas

ou extremidades quebradas no DNA, acabam acumulando uma alta taxa de mutação que podem afetar genes fundamentais no controle do crescimento e na proliferação celular, como genes supressores tumorais e oncogenes (LODISH *et al.*, 2014).

As células que originam a maior parte dos tumores em humanos podem ser categorizadas conforme sua derivação das três camadas embrionárias (ectoderma, mesoderma e endoderma). Essa derivação implica em uma série de características relativamente específicas para cada neoplasia, que são úteis no diagnóstico e na previsão do comportamento de cada tipo de tumor (KING, 2006).

Neoplasias malignas são classificadas como sarcomas se forem derivadas das células mesenquimais (mesoderma), já carcinomas são quase todas as neoplasias malignas derivadas das células epiteliais (ectoderma e endoderma) (KING, 2006; LODISH *et al.*, 2014). Nos seres humanos, o tipo mais predominante de neoplasia maligna são os carcinomas, que chegam a representar cerca de 80% dos casos de câncer (ALBERTS *et al.*, 2017).

Alguns cânceres não se enquadram em nenhuma destas duas grandes categorias mencionadas acima, são eles as diversas leucemias e linfomas, que são derivados de células hematopoiéticas, bem como como os cânceres oriundos de células que fazem parte do sistema nervoso. Além disso, essas categorias apresentam muitas subdivisões, de acordo com os tipos específicos de células, com a localização e a aparência do tumor ao microscópico (ALBERTS *et al.*, 2017).

Atualmente, os principais tratamentos empregados contra o câncer são a quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Outras modalidades terapêuticas incluem terapia genética, imunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinâmica e terapia alvo. Embora a quimioterapia e a radioterapia continuem sendo o tratamento padrão para a maioria dos pacientes com câncer, a resposta ao tratamento varia consideravelmente em diferentes tipos de câncer e até mesmo entre pacientes com o mesmo tipo de câncer (HOSSEINI; GHORBANI, 2015; RIZEQ *et al.*, 2020).

Existem diversos medicamentos quimioterápicos disponíveis no mercado, entretanto, seu uso é acompanhado por vários efeitos indesejados, como queda de cabelo, supressão da medula óssea, aquisição de resistência aos medicamentos, lesões gastrointestinais, disfunção neurológica e toxicidade cardíaca. Ademais, mesmo com as intensas intervenções, muitos dos pacientes não apresentam um bom prognóstico após o tratamento (HOSSEINI; GHORBANI, 2015).

O câncer é uma doença complexa que todos os anos ceifa a vida de milhões de pessoas. A proliferação descontrolada de células ocasiona o mal funcionamento do organismo, levando o indivíduo a apresentar uma longa lista de sintomas que pode, por fim, levar a morte. Dada a importância sanitária e social desta doença, bem como seu impacto econômico nos sistemas de saúde, novas alternativas terapêuticas estão sendo continuamente investigadas (GARCIA-OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A busca por novos agentes anticâncer com melhor eficácia e menores efeitos colaterais é essencial. Nesse cenário, os compostos naturais configuram uma excelente fonte para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento contra o câncer (HOSSEINI; GHORBANI, 2015). Entre os diversos compostos naturais, os fitoquímicos e seus derivados são opções promissoras para melhorar a eficiência do tratamento em pacientes com câncer e diminuir as reações adversas (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

2.2 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR), também chamado de câncer de cólon e reto, abrange os tumores que se iniciam na parte do intestino grosso (chamada cólon), no reto (final do intestino, imediatamente antes do ânus) e ânus (INCA, 2019b). Cerca de 90% desses cânceres são classificados como adenocarcinomas, o que significa que são uma neoplasia maligna que se desenvolve a partir de células epiteliais glandulares do cólon e do reto. Entretanto, há ainda outros tipos menos comuns de cânceres colorretais, como o carcinoma espinocelular, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células fusiformes e carcinoma indiferenciado (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

Estima-se que em 2020 ocorreram no mundo mais de 1,9 milhão de novos casos de câncer colorretal e 935 mil mortes pela doença. No geral, ele ocupa o terceiro lugar em termos de incidência, entretanto, é o segundo em termos de mortalidade (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, estima-se que a cada ano do triênio 2020/2022 sejam diagnosticados 20.520 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 casos em mulheres, sendo que em ambos os sexos ele é o segundo tipo de câncer mais prevalente, excluindo-se os tumores de pele não melanoma (Figura 2). No tocante aos óbitos, em 2017 ocorreram no Brasil 9.207 mortes ocasionadas por câncer de cólon e reto em homens e 9.660 mortes em mulheres (INCA, 2019b).

Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil para 2020 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Inca (2019b).

As maiores taxas de incidência de câncer de cólon são observadas em nações desenvolvidas, e vêm aumentando rapidamente nas nações em desenvolvimento, o que se atribui a adoção de várias características do estilo de vida ocidental. Entre essas características estão as dietas ricas em carnes vermelhas e processadas, amidos refinados, açúcar e ácidos graxos saturados e trans, mas que são pobres em frutas, vegetais, fibras, ácidos graxos ômega-3, cálcio, vitamina D e grãos inteiros. Esse tipo de dieta está intimamente associada a um risco maior de câncer de cólon, juntamente com outras características das populações ocidentais, como excesso de massa corporal e hábitos sedentários (KASDAGLY *et al.*, 2014).

Embora a incidência de câncer colorretal seja geralmente relatada em conjunto, ela pode ser separada entre os casos de câncer de cólon, que representam 72%, e os cânceres de reto, que representam 28% (VALERI *et al.*, 2013), o que sugere que o risco carcinogênico no cólon é maior que no reto (PASCHKE *et al.*, 2018). Entre o câncer de cólon e o câncer retal existem diferenças marcantes na carcinogênese molecular, patologia, topografia, nos procedimentos cirúrgicos e no tratamento, o que os torna distintos (PASCHKE *et al.*, 2018). Atualmente, há um consenso de que a localização anatômica é um fator importante no tratamento do CCR (LEE *et al.*, 2015).

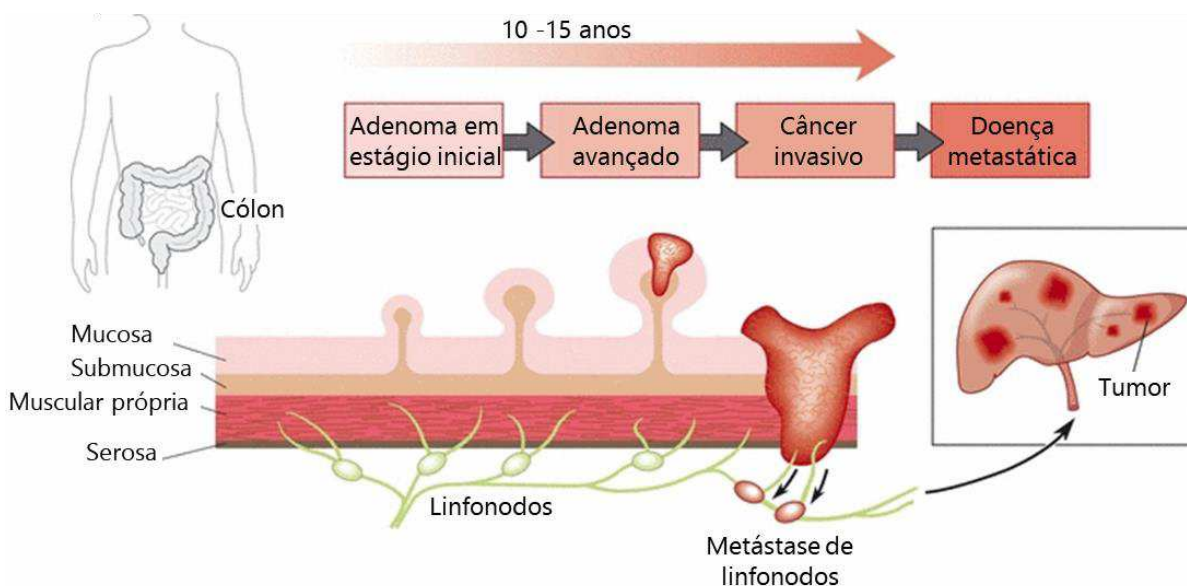
Os cânceres de cólon se localizam principalmente no cólon sigmoide e na junção reto-sigmoide (35%), seguido do ceco (15%) e do cólon transversal (12%). A extensão do tumor começa localmente desde a mucosa até atingir sucessivamente as diferentes camadas do intestino, o peritônio e órgãos vizinhos onde formam metástases. A disseminação do tumor para outros órgãos pode ocorrer através do

sistema sanguíneo e/ou vasos linfáticos. Devido à proximidade com a veia porta, o fígado é o sítio metastático mais frequente (50% dos casos), seguido pelos pulmões e peritônio. Posteriormente, o câncer pode atingir outros locais do corpo como as suprarrenais, ovários, ossos, cérebro, rins e baço (POINTET; TAIEB, 2017).

O processo de desenvolvimento do câncer colorretal é constituído de várias etapas que envolvem diversos eventos moleculares (GINSBURG; WILLARD, 2008). A carcinogênese do cólon é dividida em três estágios discerníveis semelhantes aos que ocorrem em outros cânceres, sendo eles a iniciação, promoção e progressão. Durante esses estágios, o epitélio colônico normal sofre uma transformação patológica em epitélio hiperproliferativo, depois em adenoma, carcinoma *in situ* e, eventualmente, em câncer invasivo e metastático (ZHAO *et al.*, 2018).

No modelo “clássico” de formação do câncer colorretal, conhecido como sequência adenoma-carcinoma, a maioria dos cânceres surge de um pólipó que começa com uma cripta aberrante, que então evolui para um adenoma inicial (<1 cm de tamanho) (Figura 3). Em seguida, o adenoma progride para um adenoma avançado (> 1 cm de tamanho) antes de finalmente se tornar um câncer colorretal. Este processo é impulsionado pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas, podendo levar de 10 a 15 anos para ocorrer, entretanto, em alguns casos esse processo pode progredir mais rapidamente (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; KUIPERS *et al.*, 2015).

Figura 3 - Representação esquemática da sequência clássica adenoma-carcinoma.



Fonte: Traduzida de Bretthauer (2011).

As alterações genômicas progressivas que culminam na sequência adenoma-carcinoma geralmente se iniciam com uma alteração genética do gene *APC*, que propicia a formação de um adenoma, seguida pelas alterações dos genes *KRAS* e *TP53*. A desregulação das vias relacionadas à proliferação celular e apoptose, incluindo as vias WNT, RAS-MAPK, PI3K, TGF- β e TP53, faz com que ocorra a progressão da carcinogênese colorretal (TOKUMARU *et al.*, 2021).

Cerca de 85% dos cânceres colorretais esporádicos exibem instabilidade cromossômica, com mudanças no número e estrutura dos cromossomos. Essas mudanças incluem rearranjos, ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos e de heteroziguidade, o que culmina em variações no número de cópias dos genes. Essas alterações afetam a expressão de oncogenes e/ou genes que regulam a proliferação celular, podendo resultar na ativação de vias essenciais para o início e progressão do câncer. Os casos esporádicos restantes apresentam instabilidade de microssatélites (NGUYEN; DUONG, 2018), definida com a presença de sequências de DNA repetitivas de tamanhos alternativos, que não estão presentes no DNA da linhagem germinativa correspondente, que ocorrem devido a um defeito no sistema de reparo de mal pareamento de DNA (NOJADEH; SHARIF; SAKHINIA, 2018).

Já o câncer colorretal hereditário tem duas formas principais bem descritas. A primeira delas são os pacientes com polipose adenomatosa familiar (FAP), que herdam uma cópia mutada do gene da polipose adenomatosa (*APC*). O gene *APC* é um gene supressor de tumor que produz a proteína APC, uma proteína multifuncional que controla a velocidade de crescimento das células e previne o desenvolvimento de tumores (NOJADEH; SHARIF; SAKHINIA, 2018). A segunda forma são os pacientes com o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPPC ou síndrome de Lynch), que herdam um defeito em um dos genes do sistema de reparo de mal pareamento, o que ocasiona instabilidade de microssatélites. Além dessas, outras formas de CCR hereditário incluem uma síndrome rara chamada síndrome da polipose hamartomatosa e os casos hereditários causados por mutações com menor grau de penetrância (NGUYEN; DUONG, 2018; BOFFETTA; HAINAUT, 2019).

Cerca de 60 a 65% dos casos de câncer de cólon e reto surgem esporadicamente, isto é, ocorrem em indivíduos que não tem histórico familiar pregresso da doença e nem apresentam mutações genéticas herdadas que aumentam o risco de a desenvolverem. Já aproximadamente 35 a 40% dos casos estão associados a fatores hereditários, que incluem histórico familiar da doença,

síndromes de câncer hereditárias, variações genéticas já conhecidas, mas de baixa penetrância, e outras anomalias hereditárias que ainda não foram descritas (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

Além dos fatores hereditários, os principais aspectos que aumentam o risco de câncer de cólon são idade superior a 50 anos, doença inflamatória intestinal, história prévia de radioterapia abdominal, obesidade, diabetes e resistência à insulina, tabagismo, consumo abundante de álcool, acromegalia, imunossupressão prolongada, ureterossigmoidostomia, consumo excessivo de alimentos processados e sedentarismo (VIEIRA, 2016). Os sintomas mais comuns de câncer colorretal são dor abdominal, mudança nos hábitos intestinais, sangue nas fezes, fadiga e anemia. Entretanto, esses sintomas também costumam se manifestar em outras condições gastrointestinais (BALLINGER; ANGGIANSAH, 2007; KUIPERS *et al.*, 2015).

Um diagnóstico de câncer colorretal resulta da avaliação de um paciente com sintomas ou como resultado da triagem populacional, nesse último caso, muitos indivíduos são diagnosticados em um estágio pré-clínico onde as chances de cura completa são maiores (KUIPERS *et al.*, 2015). O estágio do diagnóstico é o preditor mais importante de sobrevivência. A taxa de sobrevida relativa de 5 anos para câncer colorretal varia de 90% para pacientes com diagnóstico de doença localizada a 14% para aqueles diagnosticados em estágio avançado. Devido possivelmente ao aparecimento precoce dos sintomas, o câncer retal é diagnosticado em um estágio localizado um pouco mais frequentemente do que o câncer de cólon. Entre outros fatores que são associados ao diagnóstico do tumor em estágio mais avançado estão o baixo status socioeconômico, raça negra e idade jovem (SIEGEL *et al.*, 2020).

Atualmente, o diagnóstico precoce de câncer colorretal vêm sendo prejudicado devido as restrições decorrentes da pandemia ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2. Em muitos locais o rastreamento do câncer foi suspenso, o trabalho de diagnóstico de rotina adiado, sendo priorizados apenas os casos sintomáticos graves. Essa interrupção dos programas de rastreamento significa que muitos indivíduos não serão rastreados e receberão um diagnóstico tardio. Segundo os pesquisadores, isso resultará em um aumento no número de mortes por câncer CCR a médio e a longo prazo (DEL VECCHIO BLANCO *et al.*, 2020; MARINGE *et al.*, 2020).

Em pacientes que apresentam os sintomas, a colonoscopia acompanhada de uma biópsia é o padrão-ouro para o diagnóstico do câncer colorretal, mas outros métodos estão disponíveis e podem ser utilizados para auxiliar no estadiamento e na

escolha do melhor tratamento (KUIPERS *et al.*, 2015; PASCHKE *et al.*, 2018). A certeza do diagnóstico do câncer colorretal é tida após o resultado do exame de biópsia de um fragmento de tecido retirado durante a colonoscopia (VIEIRA, 2016).

O tratamento ideal para o câncer colorretal consiste na remoção completa do tumor e das metástases, que geralmente é feito por meio de intervenções cirúrgicas. Entretanto, quase um quarto dos cânceres colorretais é diagnosticado em estágio avançado, dificultando o controle cirúrgico curativo. Para os pacientes com lesões em que a cirurgia não é viável, o objetivo do tratamento é diminuir, impedir o crescimento e a disseminação do tumor, sendo a radioterapia e a quimioterapia as principais estratégias para o controle da doença nesses pacientes (XIE; CHEN; FANG, 2020).

Frequentemente há casos em que os tratamentos médicos disponíveis não são suficientes devido à falta de uma terapia que seja mais eficaz, da manifestação de efeitos adversos, quimiorresistência e da reincidência da doença (AFRIN *et al.*, 2020). Isso indica a necessidade de se buscar novas abordagens que possibilitem a cura da doença e/ou uma melhor qualidade de vida para o paciente.

Nas últimas décadas, pesquisas epidemiológicas evidenciaram a associação entre a ingestão de vários alimentos e nutrientes enriquecidos com fitoquímicos e o menor risco de desenvolvimento de câncer colorretal. Observou-se que certos fitoquímicos são eficientes em modular processos carcinogênicos por meio da ação em diferentes alvos moleculares, muitos desses alvos são o foco de programas modernos que visam desenvolver novas drogas. Com isso, fica evidente o potencial dessas substâncias como agentes preventivos e terapêuticos (AFRIN *et al.*, 2020).

2.3 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEDICAMENTOS

Os medicamentos modernos melhoraram sobremaneira a vida de inúmeros pacientes ao longo dos últimos duzentos anos. Doenças que por muito tempo foram vistas como incuráveis ou que eram consideradas fatais, foram superadas pelo desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, sendo inegável o seu impacto na sociedade (BLASS, 2015). Atualmente, a disponibilidade sem precedentes de uma imensa quantidade de informações forneceu uma vasta gama de oportunidades para que a descoberta de novas drogas prosperasse (MANSINHO *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo extremamente complexo, visto que envolve uma série intrincada de questões, que vão desde a

pesquisa básica para encontrar um alvo molecular adequado, até o lançamento do medicamento no mercado (MCLEAN, 2015). Com isso, fica claro que a tarefa de desenvolver e comercializar uma nova entidade terapêutica não é um trabalho para poucas pessoas (BRODNIEWICZ; GRYNKIEWICZ, 2010; BLASS, 2015). Essa tarefa demanda uma grande equipe multidisciplinar, que compreende desde biólogos, químicos, cientistas da computação e médicos, até profissionais de áreas muito distintas, como estatísticos, economistas, advogados e especialistas em regulamentação (NG, 2005; HONEK, 2017).

O processo de produzir um novo medicamento se inicia com a identificação e a validação de alvos, onde os pesquisadores buscam encontrar compostos que afetam uma via biológica relacionada a uma determinada doença. Estes compostos podem ser descobertos na natureza, a partir de triagens de alto desempenho de grandes bibliotecas de compostos naturais ou sintetizados como análogos de outros compostos que são conhecidos por serem eficazes contra uma doença em particular (HORIENA; YUAN, 2017). Usualmente, os alvos desses compostos são receptores, enzimas, elementos dentro de sistemas de expressão gênica ou eventos específicos das cascatas de sinalização intracelular (BRODNIEWICZ; GRYNKIEWICZ, 2010).

Nessa fase inicial, milhares de compostos podem ser candidatos em potencial para o desenvolvimento de um novo tratamento médico, mas após os testes preliminares, apenas uma pequena parte deles se mostra promissor e demanda pesquisas mais aprofundadas (FDA, 2021a). Contudo, antes de se avaliar uma nova molécula ou fármaco em seres humanos, primeiramente devem ter sido realizadas as pesquisas denominadas de pré-clínicas, cujo objetivo principal é obter evidências sobre a segurança e a eficácia de um candidato a medicamento (HONEK, 2017; ZURITA-CRUZ; BARBOSA-CORTÉS; VILLASÍS-KEEVER, 2019).

A fase pré-clínica começa com a preparação do fármaco, que inclui desde os testes de estabilidade e formulação da molécula, até os testes do metabolismo do fármaco, tanto em modelos *in vitro*, por meio de células isoladas e estudos de tecidos, quanto *in vivo*, em modelos animais (BRODNIEWICZ; GRYNKIEWICZ, 2010; ZURITA-CRUZ; BARBOSA-CORTÉS; VILLASÍS-KEEVER, 2019). Entre os aspectos estudados em modelos animais destaca-se a toxicologia, que objetiva avaliar segurança do medicamento em doses equivalentes as que podem ser usados em seres humanos, a farmacodinâmica (mecanismo de ação do fármaco, possível relação com a dose e resposta clínica) e a farmacocinética (absorção, distribuição,

metabolismo, excreção e possíveis interações com outros medicamentos) (ZURITA-CRUZ; BARBOSA-CORTÉS; VILLASÍS-KEEVER, 2019; FDA, 2021a).

As informações obtidas sobre a dosagem do composto e o seu nível de toxicidade são imprescindíveis para determinar se é viável e razoavelmente seguro prosseguir com os estudos. Essas informações fundamentam a posterior pesquisa em humanos e são obtidas por meio dos estudos sobre farmacocinética, farmacodinâmica e toxicologia (HONEK, 2017; FDA, 2021a).

Ainda que a pesquisa pré-clínica seja muito importante por responder as questões básicas sobre a segurança de um medicamento, ela não substitui os estudos sobre como ele irá interagir com o corpo humano, que são feitos durante a pesquisa clínica (FDA, 2021a). Tradicionalmente, a pesquisa clínica é dividida em quatro estágios ou fases: I, II, III e IV. Cada uma dessas fases têm uma finalidade distinta e auxiliam os cientistas a responder diferentes questões (ZURITA-CRUZ; BARBOSA-CORTÉS; VILLASÍS-KEEVER, 2019; FDA, 2021b).

Os ensaios de Fase I tem como objetivo testar pela primeira vez a segurança e a dosagem de uma droga experimental ou tratamento. Ele é feito com um pequeno grupo de cerca de 20 a 100 voluntários que podem ser saudáveis ou acometidos pela doença/condição. Os pesquisadores avaliam a segurança do tratamento, determinam uma faixa de dosagem que não ofereça perigo as pessoas e identificam os efeitos colaterais. Essa fase pode durar vários meses, e ao final aproximadamente 70% dos medicamentos analisados passam para a próxima etapa, que são os ensaios de fase II (HONEK, 2017; FDA, 2021a; FDA, 2021b).

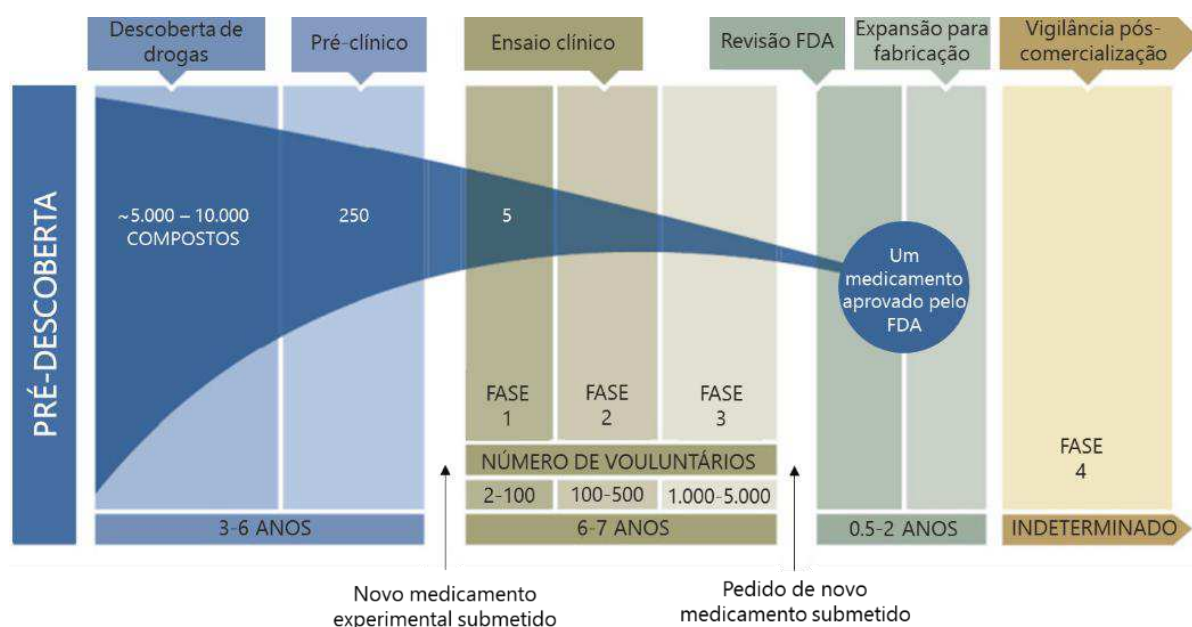
Na fase II a droga ou tratamento experimental é administrado a um grupo com centenas de pessoas acometidas pela doença/condição para verificar se ele é eficaz e para avaliar melhor sua segurança e feitos colaterais. Essa fase pode durar de vários meses até 2 anos, e ao final cerca de 33% dos medicamentos testados passam para a próxima fase. Uma vez que os estudos de fase I e II tenham sido concluídos, tendo sido demonstrada a eficácia e a segurança do medicamento, um estudo de fase III será conduzido em um grupo maior de pacientes, sendo essa a última etapa antes do tratamento ser aprovado para o uso de rotina (ZURITA-CRUZ; BARBOSA-CORTÉS; VILLASÍS-KEEVER, 2019).

Durante a fase III, o medicamento ou tratamento é administrado a grandes grupos de cerca de 300 a 3.000 voluntários. Durante essa fase, que dura de 1 a 4 anos, os pesquisadores confirmam a eficácia do tratamento, monitoram os efeitos

colaterais, e comparam ele ao tratamento padrão já utilizado, acumulando informações que permitam a segurança na hora de sua utilização. Em torno de 25 a 30% dos medicamentos testados nessa etapa do processo avançam para a última fase da pesquisa (HONEK, 2017; FDA, 2021a; FDA, 2021b).

A última etapa da pesquisa clínica são os ensaios de fase IV, que são conduzidos com um grupo de milhares de voluntários após um tratamento ter sido aprovado pela agência reguladora e estar sendo comercializado. Os principais objetivos dessa fase é investigar a segurança do medicamento, detectar efeitos colaterais de longo prazo, identificar efeitos em uma ou mais patologias em particular ou em pacientes com condições que foram excluídas dos estudos anteriores e coletar dados de morbidade e mortalidade. Além disso, nessa fase também são pesquisadas novas indicações para o produto, interações com outros medicamentos e diferentes formas de dosagem (Figura 4) (ZURITA-CRUZ; BARBOSA-CORTÉS; VILLASÍS-KEEVER, 2019; FDA, 2021b).

Figura 4 - Cronograma de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos.



Fonte: Traduzida de National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2018).

Os novos medicamentos são descobertos e desenvolvidos principalmente por grandes empresas farmacêuticas, universidades e agências de pesquisa

governamentais, embora seja crescente o número de empresas pequenas que estão se aventurando neste campo. Uma grande parte das pesquisas e descoberta de medicamentos em potencial feitas pelas empresas menores, universidades e organizações governamentais são licenciadas para as grandes empresas farmacêuticas multinacionais, que realizam os ensaios clínicos, a fabricação, o marketing e distribuição desses novos medicamentos. Isso se deve ao grande custo envolvido no desenvolvimento e comercialização de medicamentos (NG, 2005).

O desenvolvimento de um novo medicamento é um processo caro e demorado que em alguns casos pode levar em média mais de 10 anos, no entanto, isso varia muito dependendo do medicamento que está sendo testado e da doença-alvo (HONEK, 2017; BERDIGALIYEV; ALJOFAN, 2020). Em um levantamento feito por Prasad e Mailankody (2017) eles constataram que leva em média 7,3 anos para se desenvolver um medicamento a um custo médio estimado de 648 milhões de dólares. Todavia, segundo eles, em um curto período esse investimento é mais do que recuperado, sendo que algumas empresas apresenta uma receita 10 vezes maior do que os gastos (PRASAD; MAILANKODY, 2017).

Em um estudo que incluiu 63 dos 355 novos medicamentos terapêuticos e agentes biológicos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA entre 2009 e 2018, o custo médio estimado do desenvolvimento de um novo produto foi de 1,3 bilhão de dólares. Esse valor médio difere entre as áreas terapêuticas, sendo os custos de desenvolvimento de medicamentos contra o câncer os mais altos, em média 4,4 bilhões de dólares (WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020).

Apesar dos transtornos decorrentes da pandemia causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), o *Center for Drug Evaluation and Research* do FDA aprovou no ano de 2020 o uso de 53 novos medicamentos. Esse total fica atrás apenas do recorde histórico de 2018, que foi de 59 medicamentos. Seguindo com a tendência observada nos últimos anos, em 2020 os produtos contra o câncer representaram grande parte do total de medicamentos aprovados (34%), sendo o maior número de todos os tempos em termos absolutos e relativos (MULLARD, 2021).

Ao longo de seu processo de desenvolvimento, cerca de 90% dos novos medicamentos analisados não chegam ao estágio final dos testes onde recebem aprovação para serem comercializados. Isso se deve principalmente a questões ligadas a segurança do medicamento, eficácia ou falta de verba para concluir os ensaios (FOGEL, 2018; ZURITA-CRUZ; BARBOSA-CORTÉS; VILLASÍS-KEEVER,

2019; RANI *et al.*, 2020). Além disso, mesmo após terem sido aprovados e distribuídos, os novos medicamentos têm uma chance em três de receber novas advertências em sua bula ou até mesmo serem retirados do mercado por questões de segurança (FRANK *et al.*, 2014).

Visto que apenas uma pequena quantidade dos novos medicamentos que passam pelos testes pré-clínicos e clínicos acabam dando origem a um produto que é liberado para venda, e que mesmo um produto já aprovado e comercializado pode apresentar efeitos até então não observados anteriormente, os pesquisadores salientam que se faz necessário otimizar as abordagens pré-clínicas atuais. Segundo eles, para impulsionar as chances de um novo medicamento ser aprovado e chegar ao mercado, beneficiando milhares de pacientes, é fundamental a escolha de modelos de estudo pré-clínicos apropriados e que consigam mimetizar de forma mais fidedigna as doenças humanas (HONEK, 2017; FOGEL, 2018).

2.4 CULTURA DE CÉLULAS 3D COMO MODELO EXPERIMENTAL

A utilização de modelos de estudo pré-clínicos é fundamental para o avanço da pesquisa translacional sobre o câncer, sendo essencial desde a investigação de aspectos biológicos da doença, até o desenvolvimento de novos tratamentos (IBARROLA-VILLAVA; CERVANTES; BARDELLI, 2018). Diversos modelos pré-clínicos têm sido empregados na identificação de novas drogas, estudos de toxicidade e pesquisa de biomarcadores. Todavia, é primordial escolher apropriadamente qual modelo reflete melhor uma determinada entidade tumoral, o alvo que se tem em vista, entre outros aspectos da doença (KLINGHAMMER; WALTHER; HOFFMANN, 2017).

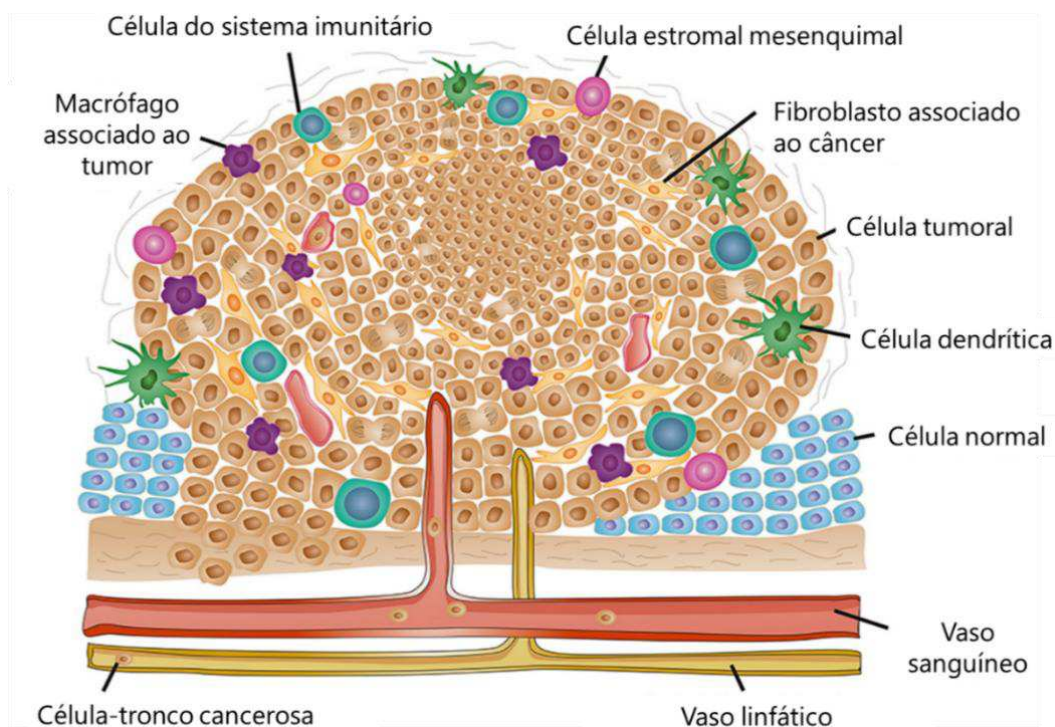
A utilização de sistemas modelo é fundamental na biomedicina, pois esses sistemas formam a espinha dorsal da pesquisa translacional ao servir de ligação entre os conceitos básicos e a descoberta de aplicações destes no manejo das doenças, incluindo o diagnóstico, prognóstico e a terapia. No âmbito da oncologia, eles são úteis na triagem terapêutica, na avaliação pré-clínica e até mesmo no estudo da biologia básica dos cânceres (KHANNA *et al.*, 2020).

Uma das principais dificuldades em se desenvolver medicamentos de maneira econômica e rápida é a falta de modelos pré-clínicos de câncer que se assemelhem à complexidade dos tumores humanos (GUNTI *et al.*, 2021). Vários modelos foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas, e ainda que todos tenham sido muito

importantes por fornecer informações fundamentais sobre a biologia tumoral, cada um deles possui suas limitações (DHANDAPANI; GOLDMAN, 2017).

Os tumores são constituídos de componentes celulares (epitélio tumoral, fibroblastos, células troncos, células endoteliais e células imunes infiltrantes) e não celulares (matriz extracelular, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) que são determinantes no seu desenvolvimento e progressão, logo, não se deve deixar de levar em conta que esses componentes também desempenham um papel crítico no resultado dos testes de novos medicamentos (GUNTI *et al.*, 2021) (Figura 5). Com isso, há uma necessidade cada vez maior de se desenvolver modelos que possam capturar com mais exatidão a complexidade e a diversidade do ecossistema tumoral, de forma a fornecer uma avaliação mais precisa da eficácia e toxicidade dos medicamentos testados (DHANDAPANI; GOLDMAN, 2017; GUNTI *et al.*, 2021).

Figura 5 – Representação do complexo microambiente tumoral.



Fonte: Adaptada de Roma-Rodrigues e colaboradores (2019).

A cultura de linhagens celulares de câncer *in vitro* tem sido um dos modelos mais frequentemente empregados na pesquisa do câncer e possibilitou um grande

avanço na compreensão da biologia da doença (KLINGHAMMER; WALTHER; HOFFMANN, 2017). Sua origem remonta ao século XX, quando foi utilizada principalmente no estudo dos tecidos, da biologia dos vírus, no desenvolvimento de vacinas, na investigação do papel dos genes nas doenças e no desenvolvimento de biofármacos (FRESHNEY, 2010; SEGERITZ; VALLIER, 2017).

A cultura celular consiste na remoção de células de um animal ou planta e seu subsequente crescimento em um ambiente artificial favorável. As células a serem cultivadas podem ser obtidas por meio da remoção direta do tecido e desagregadas por meios enzimáticos ou mecânicos antes do cultivo, ou podem ser derivadas de uma linhagem celular já bem estabelecida (MITCHELL, 2017). Desde seu surgimento, as técnicas e as ferramentas empregadas nesse modelo de pesquisa foram se aperfeiçoando, passando de culturas de células bidimensionais, para um crescimento celular tridimensional mais aprimorado, que recapitula melhor o ambiente fisiológico e os padrões de crescimento de tecidos sólidos e tumores (DHANDAPANI; GOLDMAN, 2017; IBARROLA-VILLAVA; CERVANTES; BARDELLI, 2018).

Diversas células podem ser cultivadas *in vitro* tendo em vista serem empregadas em vários tipos de experimentos (SEGERITZ; VALLIER, 2017). Da pesquisa básica à avançada, a cultura de células serve como sistemas modelo para várias aplicações, como por exemplo (VERMA; SINGH, 2020):

- estudar a biologia celular básica, o ciclo celular, especializações das células, interações célula-célula e célula-matriz;
- testar a toxicidade e o efeito de novos medicamentos;
- desenvolver terapias gênicas para substituir genes não funcionais por células portadoras de genes funcionais;
- caracterizar as células cancerosas, elucidando a influência de produtos químicos, vírus e radiação nas mesmas;
- produzir vacinas, anticorpos monoclonais e medicamentos.

Há inúmeras vantagens no uso da cultura de células como modelo de pesquisa, começando pela possibilidade de manipular genes e vias moleculares. Além disso, o uso de células de uma mesma população clonal ou tipos específicos em sistemas de cultura bem definidos torna possível obter resultados homogêneos, removendo-se variáveis genéticas ou ambientais interferentes. Dessa forma é possível a geração de

informações reproduzíveis e consistentes, coisa que não pode ser garantida ao se estudar sistemas orgânicos inteiros (SEGERITZ; VALLIER, 2017).

Outro ponto importante é o uso de animais experimentais, que tem inquietado um número crescente de pessoas com a questão de ser moralmente justificável a utilização extensiva desses animais. Anualmente milhões de animais experimentais são usados no mundo, muitas vezes sendo expostos a dor, angústia e morte, demandando uma mão de obra qualificada para ocupar-se deles e protocolos demorados, o que gera altos custos. Nesse cenário, o uso de cultura de células *in vitro* configura uma alternativa importante às pesquisas com animais, sendo técnicas em alguns casos mais fáceis de serem seguidas, consumindo menos tempo e recursos financeiros (FRESHNEY, 2010; DOKE; DHAWALE, 2015). Além de reduzir o sofrimento animal, a adoção de metodologias alternativas muitas vezes tem o benefício inesperado de produzir testes mais rigorosos e pertinentes, protegendo não só os animais que usualmente são utilizadas nesses testes, mas também os seres humanos (GOLDBERG; HARTUNG, 2006).

Assim como as vantagens, as limitações das culturas celulares como modelos experimentais também são bem conhecidas, principalmente no teste de novas drogas anticâncer. As células em cultura foram removidas de suas interações com outros tipos celulares, da sua arquitetura original, da influência de citocinas e outras moléculas de sinalização e dos efeitos da distribuição e metabolismo da droga no organismo. Além disso, muitos agentes anticâncer têm toxicidade limitante de dose em órgãos que não estão representados no modelo. Por esse motivo, encontrar indícios de sensibilidade e resistência a um medicamento testado *in vitro* pode não refletir a ação do mesmo *in vivo* (WEINSTEIN, 2012).

Diante dessas desvantagens, diversos pesquisadores têm trabalhado cada vez mais no sentido de aprimorar os modelos de cultura de células *in vitro*, de forma a conseguir obter metodologias e ferramentas que permitam tornar esses modelos mais capazes de mimetizar as condições encontradas *in vivo* (HICKMAN *et al.*, 2014; CHATZINIKOLAIDOU, 2016; KAPAŁCZYŃSKA *et al.*, 2018; BENELLI; ZOCCHI; POGGI, 2021; HAN; KWON; KIM, 2021).

É sabido que as células e tecidos humanos existem em um ambiente tridimensional (3D) complexo. Todavia, por muito tempo foi utilizada a abordagem bidimensional (2D) para estudar o comportamento dessas células. A cultura 2D tem sido extensivamente utilizada para esclarecer os mecanismos e a biologia do câncer,

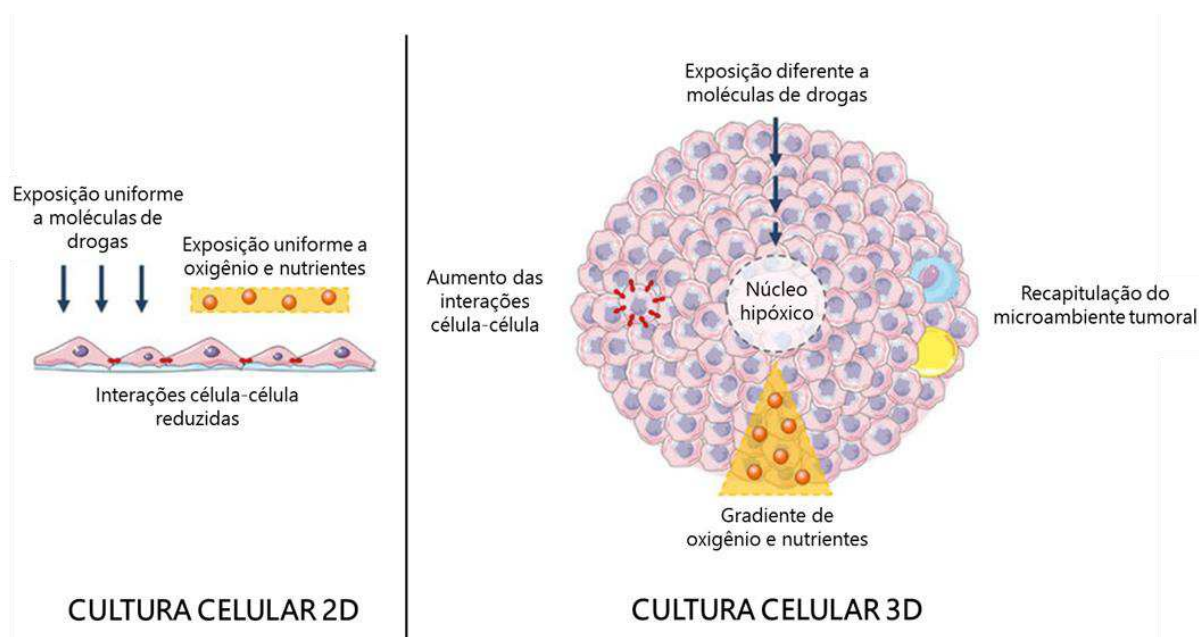
bem como avaliar *in vitro* a eficácia de drogas anticâncer, gerando uma gama muito rica de informações. Seu uso oferece dados replicáveis e facilmente interpretáveis, sendo um modelo mais barato e eficiente para culturas de longo prazo e estudos em grande escala (PADMALAYAM; SUTO, 2012; LV *et al.*, 2017; JENSEN; TENG, 2020).

Todavia, essa abordagem falha em muitos aspectos em mimetizar o ambiente *in vivo*. No modelo 2D as células crescem em uma monocamada na placa, adquirem formato plano e alongando e tem menos junções celulares. Todas as células recebem a mesma quantidade de nutrientes e fatores de crescimento do meio de cultura, se proliferam em um ritmo anormalmente rápido, com pouca diferenciação celular. Os níveis de expressão de genes e proteínas são frequentemente muito diferentes em comparação com modelos *in vivo*. As drogas não são bem metabolizadas, podendo induzir facilmente a apoptose nas células, que geralmente têm pouca resistência aos medicamentos, fazendo com que pareça que foi um tratamento bem-sucedido quando não é o caso (JENSEN; TENG, 2020).

Nesse cenário, a cultura de células em três dimensões surgiu a fim de preencher a lacuna entre a cultura tradicional de células 2D em monocamada e as experiências tumorais *in vivo*, simulando melhor o microambiente fisiológico e se tornando a próxima fronteira da pesquisa em biologia celular (LV *et al.*, 2017). Ao realizar experimentos com cultura de células 3D o ambiente celular pode ser manipulado para imitar o de uma célula *in vivo*, fornecendo dados mais precisos sobre interações célula-célula, características do tumor, ação de drogas, perfil metabólico, entre outros aspectos (JENSEN; TENG, 2020).

A cultura de células 3D consiste no processo de crescimento de células em uma condição mais próxima de seu contexto natural ou seu ambiente *in vivo*. Para isso, é feita a adição de uma terceira dimensão que permite imitar as complexas interações célula-célula, bem como entre as células e a matriz extracelular (PADMALAYAM; SUTO, 2012). Ao contrário das culturas 2D, nas quais na placa de cultura as células são expostas basicamente ao meio de cultura e ao plástico, nas culturas de células 3D as células são expostas a outras células ou a matriz extracelular (PADMALAYAM; SUTO, 2012) (Figura 6). Ao ter em conta as interações cruciais célula-célula e célula-matriz, a cultura 3D possibilita que as células mimetizem vários atributos essenciais encontrados nos tecidos, tais como morfologia, diferenciação, polaridade, taxa de proliferação, expressão gênica, heterogeneidade celular e gradientes de nutrientes e oxigênio visto nos tumores (KOLEDOVA, 2017).

Figura 6 - Principais diferenças entre cultura de células bidimensional em monocamada (2D) e em três dimensões (3D).



Fonte: Adaptado e traduzido de Fontana e colaboradores (2020).

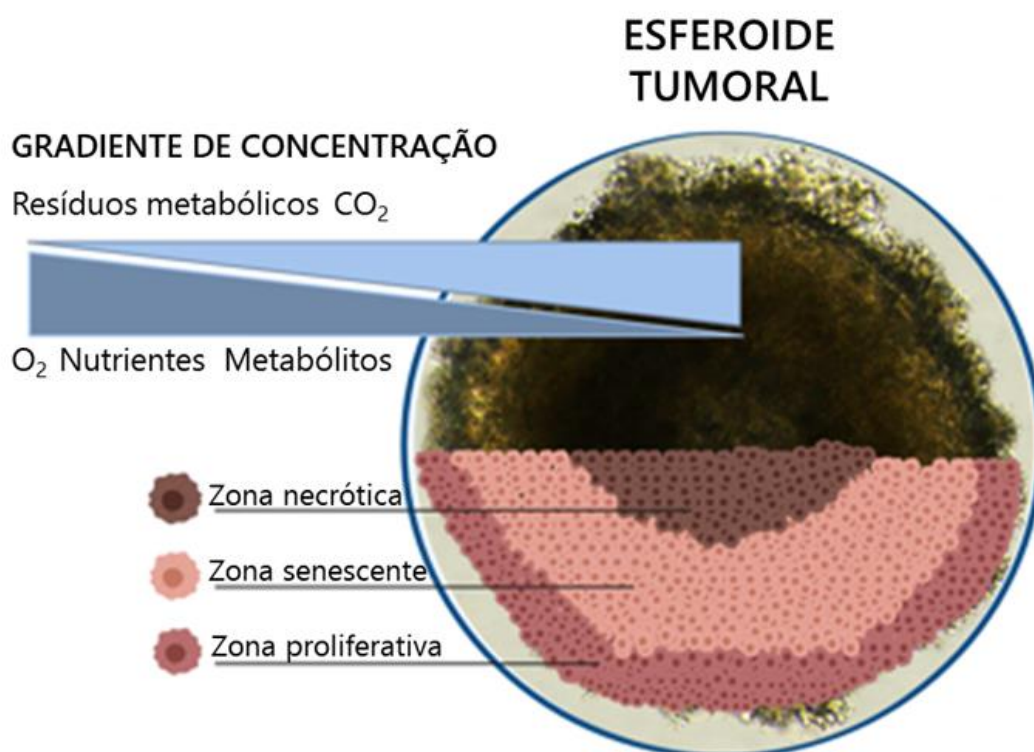
Desde 1971 vem sendo desenvolvido diversos sistemas de cultura que propõem essa abordagem de organização mais fisiológica, complexa e tridimensional das células. As técnicas chamadas de cultura 3D compreendem sistemas onde as células são cultivadas em moldes tridimensionais (cuja composição é variável), modelos em que células ou fragmentos de órgãos são mecanicamente sustentados e os modelos de agregados celulares em suspensão, chamados de esferoides devido sua aparência arredondada. Atualmente novos modelos cada vez mais complexos têm sido desenvolvidos, como por exemplo os sistemas microfabricados de cultura microfluídica (*microfluidics culture*) e os sistemas de órgãos sobre chip (*organ-on-a-chip*) (COSTA, 2018).

Os esferoides tumorais multicelulares consistem em micro agregados celulares que têm sido extensivamente utilizados por muitas décadas para criar *in vitro* modelos de diferentes tipos de câncer (COSTA *et al.*, 2016; SCHERZER *et al.*, 2016), entre os quais estão modelos de cânceres colorretais (LEES; SORDAT; MACDONALD, 1981; SORANZO; INGROSSO, 1988; JEPPESEN *et al.*, 2017; SCHROLL *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2020). Os esferoides tumorais podem ser ajustados em termos de tamanho e

composição celular. É possível se obter esferoides homotípicos que são compostos por um único tipo de célula ou heterotípicos, onde células cancerosas podem ser cultivadas com outras células do estroma, como células do sistema imune, fibroblastos e células endoteliais (SCHERZER *et al.*, 2016; ZANONI *et al.*, 2019).

Após a sua formação, os esferoides são capazes de simular diversas características de tumores sólidos *in vivo*, tais como heterogeneidade celular, sinalização célula-célula, estrutura interna composta de diferentes camadas celulares, deposição de matriz extracelular, interações físicas célula-célula e célula-matriz, cinética de crescimento, expressão gênica e resistência a drogas (Figura 7). Por esse motivo, considera-se que os esferoides sejam o modelo *in vitro* mais adequado para testes de drogas em oncologia (COSTA *et al.*, 2016).

Figura 7 - A estrutura de um esferoide multicelular tumoral mostrando suas zonas características.



Fonte: Adaptado e traduzido de Fontana e colaboradores (2020).

O crescimento dos esferoides de células tumorais imita o crescimento de tumores *in vivo*. Nesse modelo as células crescem em agregados para formar uma

estrutura compacta e de alta densidade celular. Essa estrutura densamente compactada limita a difusão de glicose e oxigênio, mimetizando melhor um tumor sólido. Além disso, os esferoides também são heterogêneos em sua composição, com uma camada externa de células altamente proliferativas que estão constantemente expostas ao oxigênio e nutrientes. Uma vez que a difusão de nutrientes e oxigênio passa a se tornar um fator limitante, a taxa de crescimento começa a diminuir formando uma região intermediária de células senescentes. Por fim a depleção completa de oxigênio e glicose gera hipóxia, o que acaba levando à formação de um núcleo necrótico (Figura 7) (KHANNA *et al.*, 2020).

Assim como nos tumores sólidos, também se forma um gradiente de pH nos esferoides. O núcleo necrótico do esferoide é a zona de menor pH devido à conversão do piruvato em lactato pelas células no ambiente hipóxico (KHANNA *et al.*, 2020). Assim como para nutrientes e oxigênio, também são estabelecidos gradientes de difusão de drogas anticâncer no sentido da camada periférica para o núcleo dos esferoides. Com isso frequentemente se observa nesse modelo um aumento da resistência a quimioterapia e radioterapia em comparação com culturas em monocamada (SCHERZER *et al.*, 2016).

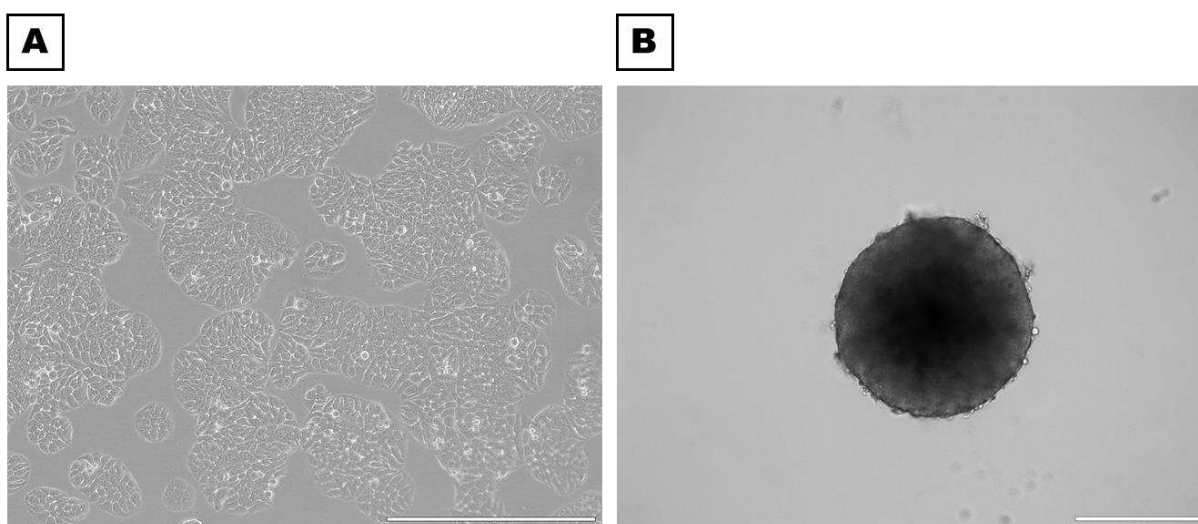
Atualmente o campo das culturas 3D tem crescido muito, gerando a possibilidade de uma vasta gama de aplicações em testes de toxicidade e na criação de novas drogas que se aplicam a um grupo muito diversificado de doenças como câncer, fibrose, distúrbios cardíacos e neurológicos. As tecnologias tridimensionais de cultura de células, que tornam possível mimetizar *in vitro* o ambiente ao qual as células estão expostas *in vivo*, têm tido uma demanda cada vez maior, pois espera-se que a sua utilização forneça uma melhor precisão e maior eficiência no processo de desenvolvimento de novas drogas (LANGHANS, 2018).

O modelo de cultura de esferoides tumorais multicelulares tem o potencial de aumentar a previsibilidade da eficácia clínica de novas drogas. Ao mesmo tempo, torna possível diminuir o número de animais utilizados nas pesquisas. Em associação com as novas ferramentas biotecnológicas emergentes, espera-se que esse modelo *in vitro* reduza consideravelmente tanto o tempo, quanto os custos da descoberta de novos medicamentos anticâncer, preenchendo a lacuna entre a descoberta e aplicação clínica e tornando as terapias cada vez mais acessíveis para toda a população (KHANNA *et al.*, 2020).

2.5 LINHAGEM CELULAR HT-29

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (Figura 8) foi isolada de um tumor primário de uma mulher caucasiana de 44 anos em 1964 por Jørgen Fogh e Germain Trempe (FOGH; TREMPE, 1975). Ela apresenta morfologia epitelial e propriedades de crescimento aderente. Suas características ultraestruturais que podem ser observadas através de microscopia eletrônica incluem microvilosidades, microfilamentos, grandes mitocôndrias vacuoladas com grânulos escuros, retículo endoplasmático liso e rugoso com ribossomos livres, gotículas lipídicas, poucos lisossomas primários e muitos secundários (ATCC, 2021).

Figura 8 - Células da linhagem HT-29 observadas ao microscópio de luz invertido com aumento de 100x. A) Monocamada; B) Esferoide tumoral 3D.



Fonte: Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Estadual de Londrina.

Quanto as suas características genéticas, a linhagem HT-29 é positiva para a expressão dos oncogenes *c-myc*, *K-ras*, *H-ras*, *N-ras*, *Myb*, *sis* e *fos*. Além disso, o gene da proteína p53 é superexpresso, com a presença de uma mutação G-> A no códon 273, resultando em uma substituição Arg-> His. O número modal do cariótipo dessa célula é 71, com um intervalo de 68 a 72, sendo uma linhagem hipertriplóide. Dezessete cromossomos marcadores são encontrados na maioria das metáfases, geralmente em uma única cópia por cromossomo. O cromossomo 13 é nulissômico e os cromossomos 8 e 14 são geralmente monossômicos (ATCC, 2021).

As linhagens celulares derivadas de tumores colorretais, como a HT-29, são recursos valiosos para o estudo de diversos aspectos da diferenciação e função celular, sendo ferramentas importantes para muitas áreas da nutrição, farmacologia e toxicologia, com destaque para a pesquisa do câncer (CIZKOVA *et al.*, 2019).

Muitos artigos já foram publicados utilizando as células HT-29 como modelo experimental *in vitro*, tanto em monocamada quanto em 3D, com as células sendo cultivadas sozinhas ou em co-cultura com outras linhagens celulares (HORNUNG *et al.*, 2016; COURAU *et al.*, 2019; BUSCH; KÄMPFER; SCHINS, 2021; ELDEHNA *et al.*, 2021; FERRARETTO *et al.*, 2021). Além disso, elas também são empregadas em modelos *in vivo*, onde as células são injetadas em camundongos para que ocorra o desenvolvimento de tumores (ESTÉVEZ-BRAUN *et al.*, 2015; FANG *et al.*, 2017; HITE *et al.*, 2018; BUSCH; KÄMPFER; SCHINS, 2021).

Diversas substâncias, muitas delas oriundas da natureza, têm sido testadas na linhagem HT-29 quanto as suas propriedades antiproliferativas, antioxidantes, antitumorais e antimetastáticas (ELDEHNA *et al.*, 2021; MESAS *et al.*, 2021; FERNÁNDEZ *et al.*, 2021; SERALA *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021). Resultados muito promissores têm sido obtidos nesses estudos, colaborando para o desenvolvimento de novas drogas e abordagens terapêuticas não só para o tratamento do câncer, mas também de outras doenças.

2.6 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVAS DROGAS

A natureza é uma fonte abundante de novos compostos com possível aplicação como agentes terapêuticos, nela são encontradas milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos que produzem uma diversidade de substâncias químicas (BHANOT; SHARMA; NOOLVI, 2011). Os produtos naturais têm sido amplamente utilizados pelos seres humanos ao longo de sua história para aplacar e tratar diversas doenças (YUAN *et al.*, 2016). A investigação de plantas medicinais, culturas bioativas e a maior compreensão dos micronutrientes da cadeia alimentar abriram caminho para o desenvolvimento de compostos químicos purificados, sendo um valioso ponto de partida para a química medicinal e o desenvolvimento de novos medicamentos (RISHTON, 2008; RODRIGUES, *et al.*, 2016).

Produtos naturais são compostos ou substâncias químicas produzidos naturalmente por organismos vivos (OUYANG *et al.*, 2014). Atualmente, a definição

do que configura um produto natural varia entre as comunidades científicas e médicas. No que tange aos produtos naturais terapêuticos, Patridge e colaboradores (2016) definem um produto natural como sendo qualquer material ou composto natural não modificado aprovado pelo FDA, derivados semissintéticos ou estruturas sintéticas que foram derivadas conceitualmente de um produto natural.

Historicamente, os produtos naturais são reconhecidos como fonte incomensurável de inspiração para os ramos da medicina, química e biologia. As moléculas produzidas por plantas, microrganismos e animais possuem variadas estruturas químicas que foram selecionadas pela natureza ao longo do tempo e podem desempenhar papéis importantes como compostos bioativos (LI; LOU, 2018). Muitos produtos naturais apresentam excelentes atividades biológicas contra inflamações, vírus, bactérias, tumores, entre outros, sendo que sua aplicação contribuiu sobremaneira para a melhoria da saúde humana (HUANG *et al.*, 2019).

Em 1805 o farmacêutico alemão Friedrich Sertürner isolou da planta do ópio o primeiro composto farmacologicamente ativo, a morfina. Isso abriu as portas da era das drogas “modernas” e desse momento em diante, inúmeros compostos ativos foram isolados dos produtos naturais, tendo as mais diversas aplicações na saúde humana (YUAN *et al.*, 2016). Em 1990, aproximadamente 80% dos medicamentos eram produtos naturais ou análogos inspirados por eles. Antibióticos, antiparasitários, antimaláricos, agentes de controle de lipídios, imunossupressores para transplantes de órgãos e drogas anticâncer, oriundos de produtos naturais, revolucionaram a medicina, aumentando substancialmente a expectativa de vida da população em grande parte do mundo (LI; VEDERAS, 2009; AKACHUKWU *et al.*, 2015).

Entretanto, a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais defronta-se com alguns desafios, como disponibilidade, identificação de compostos bioativos, dificuldade na coleta de espécimes selvagens e incompatibilidade de produtos naturais com triagens de alto rendimento. Devido a essas dificuldades e a expansão da química medicinal sintética, nas últimas décadas a indústria farmacêutica mudou seu foco e se concentrou principalmente em bibliotecas de compostos sintéticos como fonte de descoberta de medicamentos. Esses compostos sintéticos são mais fáceis de produzir e reabastecer e demonstram boa compatibilidade com plataformas de triagem de alto rendimento bem estabelecidas (RISHTON, 2008; LI; VEDERAS, 2009; ATANASOV *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2016; DUTTA *et al.*, 2019).

Todavia, o desenvolvimento de novos medicamentos baseados exclusivamente em compostos sintéticos e triagens de alto rendimento parece estar chegando a um limite e não resultou na produtividade que era esperada. Em vez de introduzir mais medicamentos no mercado, as taxas de aprovação de novos medicamentos diminuíram. Em 1990, 45 novos medicamentos foram aprovados pelo FDA, já em 2010 este número caiu para 21. Embora as razões para essa tendência de declínio sejam complexas, um aspecto importante é que as bibliotecas de compostos sintéticos geralmente cobrem apenas uma pequena faixa da diversidade química. Diante disso, o interesse na descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais foi reavivado e uma crescente importância tem sido dada aos produtos naturais em combinação com novas tecnologias na busca por novas drogas (ATANASOV *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2016; DUTTA *et al.*, 2019).

Uma vez que os produtos naturais são produzidos por organismos vivos, eles possuem uma série de propriedades que são evolutivamente otimizadas para servir a diferentes funções biológicas, como por exemplo se ligar a proteínas-alvo específicas ou outras biomoléculas. Análises detalhadas mostraram uma série de diferenças estruturais entre produtos naturais e as moléculas sintéticas. Essas diferenças estruturais resultam em atividade mais fraca e menos específica dos compostos sintéticos em comparação com os produtos naturais, que muitas vezes têm ações biológicas seletivas devido a afinidades de ligação por proteínas específicas relevantes para suas funções biológicas, possuindo uma maior complexidade e diversidade química (ATANASOV *et al.*, 2015).

Apesar do advento da química combinatória e das campanhas de triagem de alto rendimento, o impacto dos produtos naturais na descoberta de medicamentos ainda é muito grande (ATANASOV *et al.*, 2015). Mais da metade de todos os medicamentos de pequenas moléculas aprovados entre 1981 e 2014 originaram-se de produtos naturais, incluindo compostos naturais inalterados, derivados que foram quimicamente modificados e sintéticos que mimetizam um produto natural. Um levantamento mostrou que os produtos naturais e seus derivados representam mais de um terço de todas as novas entidades moleculares (NMEs) aprovadas pelo FDA, com ênfase para moléculas antibióticas e anticâncer, que são significativamente enriquecidas pelos produtos naturais (LI; LOU, 2018).

Os produtos naturais representam uma fonte abundante de novos medicamentos anticâncer. Entre os medicamentos anticâncer aprovados de 1940 a

2002, cerca de 54% foram derivados de produtos naturais ou inspirados neles. Aproximadamente 50% dos medicamentos anticâncer usados atualmente foram diretas ou indiretamente derivados de produtos naturais, que incluem alcaloides, polissacarídeos, polifenóis, diterpenoides e ácidos graxos insaturados de estruturas variadas (YUAN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2019). Alguns exemplos de medicamentos de ocorrência natural que são utilizados contra o câncer incluem os alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina, vindesina, vinorelbina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), podofilotoxina e seus derivados (etoposídeo, teniposídeo), camptotecina e seus derivados (topotecano, irinotecano), antraciclinas (doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina, idarrubicina), entre outros (BHANOT; SHARMA; NOOLVI, 2011).

Resultados melhores no tratamento e na qualidade dos pacientes com câncer podem ser obtidos por meio do uso de produtos naturais, por estes serem mais bem tolerados. Muitos agentes quimioterápicos foram identificados por meio da investigação de compostos potenciais oriundos de plantas, animais e microrganismos, incluindo organismos marinhos, exercendo seus efeitos contra uma variedade de tumores e tendo amplas perspectivas de aplicação, inclusive para o tratamento de cânceres colorretais (HUANG *et al.*, 2019).

Atualmente, as condutas terapêuticas que utilizam compostos naturais não incluem unicamente as abordagens citotóxicas, mas também o manejo molecular do microambiente tumoral. O estudo de diferentes produtos naturais ajuda a compreender o papel destes na prevenção do câncer. Esses produtos podem atuar em diversas etapas e vias moleculares do processo de carcinogênese, além de afetar diversos alvos oncogênicos, incluindo fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, receptores de fator de crescimento e enzimas inflamatórias. O desenvolvimento de novos medicamentos que interfiram nessas moléculas e vias de sinalização se tornou um projeto que tem chamado bastante a atenção da indústria biotecnológica e farmacêutica (SHANMUGAM *et al.*, 2016; DUTTA *et al.*, 2019).

As aplicações clínicas dos compostos naturais muitas vezes são restritas devido alguns problemas, como baixa solubilidade aquosa, rápido catabolismo, biodisponibilidade reduzida e má absorção intestinal desses compostos. Entretanto, têm sido desenvolvidas diversas iniciativas de sucesso no sentido de superar essas limitações do uso de produtos naturais e seus derivados, por meio do emprego de nanopartículas, micelas, lipídios, lipossomas e complexos metálicos. Com isso, as pesquisas sobre produtos naturais, suas aplicações e limitações podem resultar na

descoberta de novos agentes terapêuticos anticâncer potentes e com distribuição direcionada (DUTTA *et al.*, 2019).

Os produtos naturais oferecem uma grande oportunidade de avaliar não só novas classes químicas de agentes anticâncer, mas também mecanismos de ação novos e potencialmente relevantes (BHANOT; SHARMA; NOOLVI, 2011). Diversos estudos ressaltam a atividade anticâncer e quimiopreventiva de uma infinidade de agentes de ocorrência natural, incluindo fitoquímicos. Uma abordagem que tem se mostrado bastante promissora em ensaios clínicos é a associação desses compostos naturais com agentes quimioterápicos clássicos, o que aumenta a suscetibilidade das células cancerosas à terapia convencional. Com isso, fica clara a importância do desenvolvimento acelerado de drogas quimiopreventivas e quimioterápicas a partir de fontes naturais (BISHAYEE; SETHI, 2016; HUANG *et al.*, 2019)

A descoberta e o desenvolvimento de medicamentos baseados em produtos naturais não é uma tarefa fácil, é um empreendimento muito complexo que demanda uma abordagem interdisciplinar altamente integrada. Todavia, os recentes desenvolvimentos científicos, avanços tecnológicos e tendências de pesquisa nessa área têm demonstrado claramente que os produtos naturais estão entre as fontes mais importantes de novos medicamentos não só no passado, mas também no futuro (ATANASOV *et al.*, 2015).

2.7 FITOQUÍMICOS

Fitoquímicos são um grande grupo de compostos produzidos naturalmente pelas plantas, conferindo a elas uma série de características tais como as cores, o sabor, o aroma e a textura. Eles são amplamente distribuídos em frutas, vegetais, legumes, grãos integrais, nozes, sementes, ervas, especiarias, entre outros, e se desenvolveram ao longo de milhares de anos de evolução no intuito de defender os organismos dos efeitos das espécies reativas, vírus, bactérias e fungos (DAVIDSON; ZHU; FANG, 2016; BARBIERI *et al.*, 2017). Entre os grupos mais importantes de fitoquímicos estão os compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, organossulfetos e glucosinolatos (MOOSAVI *et al.*, 2018).

Na medicina, os fitoquímicos têm sido empregados diretamente ou modificados quimicamente com o intuito de servir de fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos. Diferentes exemplos de fitoquímicos com propriedades medicinais

contra várias doenças podem ser encontrados na literatura (GARCIA-OLIVEIRA *et al.*, 2021). Esses compostos são de fácil acesso, geralmente com menos efeitos adversos que as moléculas sintéticas, possuindo uma ampla gama de efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antimicrobiana, antioxidante ou pró-oxidante, antimutagênica e antitumoral (MOOSAVI *et al.*, 2018).

Estima-se que cerca de 25% a 48% das terapias atualmente aprovadas pelo FDA são derivadas de plantas (TUORKEY, 2015). Particularmente na terapia anticâncer, os fitoquímicos têm sido uma importante fonte de novas moléculas. Cerca de 50% dos medicamentos anticâncer aprovados entre 1940 e 2014 são originários ou diretamente derivados de produtos naturais (CHOUDHARI *et al.*, 2020). Mais de 10.000 fitoquímicos já foram identificados na natureza, uma parte expressiva deles demonstrou ter grande potencial como agente anticâncer (RUSSO *et al.*, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de drogas anticâncer baseadas em compostos fitoquímicos segue alguns passos. De forma resumida, o processo se inicia com a extração das plantas e o teste dos extratos para avaliar seu potencial anticâncer. Os compostos bioativos do extrato são identificados, purificados e então testados em estudos pré-clínicos (tanto em culturas de células *in vitro* quanto em modelos animais *in vivo*) e posteriormente em ensaios clínicos em humanos. Nestes estudos, são avaliados e caracterizados alguns fatores como eficácia, atividade anticâncer, possíveis efeitos adversos e toxicidade (CHOUDHARI *et al.*, 2020; GARCIA-OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Os fitoquímicos geralmente atuam por meio de vias moleculares reguladoras que estão relacionadas ao crescimento e progressão do câncer. Os mecanismos específicos incluem aumento da capacidade antioxidante, inativação de agentes cancerígenos, inibição da proliferação e da progressão do ciclo celular, indução da apoptose e da autofagia. Eles agem na regulação do sistema imunológico, diminuição da inflamação que estimula o crescimento do câncer, supressão da invasividade e da angiogênese dos tumores e podem atuar também na regulação hormonal do organismo (THULASIDAS *et al.*, 2019; CHOUDHARI *et al.*, 2020). Esses compostos exercem seus efeitos em uma variada e complexa gama de alvos moleculares e vias de transdução de sinal, incluindo receptores de membrana, cinases, proteínas ativadoras ou supressoras de tumores, fatores de transcrição, microRNAs, ciclinas e caspases (CHOUDHARI *et al.*, 2020; KOH; HO; PAN, 2020).

Pesquisas têm demonstrado que os fitoquímicos podem atuar como agentes sinérgicos contra as células cancerosas, pois eles têm a capacidade de aumentar o efeito terapêutico, bloqueando um ou mais alvos da via de transdução de sinal, aumentando assim a biodisponibilidade de outros medicamentos ou estabilizando eles no organismo (DAVIDSON; ZHU; FANG, 2016). Um exemplo disso acontece com os quimioterápicos a base de cisplatina, onde constatou-se que combinados com a curcumina, um conhecido fitoquímico, eles têm sua eficácia aumentada ao mesmo tempo que seus efeitos adversos são diminuídos (SUN *et al.*, 2019).

Vários compostos identificados em plantas desempenham um papel muito importante no tratamento do câncer, sendo ainda uma parte essencial do arsenal terapêutico contra a doença. Alguns dos medicamentos muito utilizados, como taxol, camptotecina, combrestatina, epipodofilotoxina e os alcaloides da vinca, são derivados de fontes vegetais (OUYANG *et al.*, 2014). Além deles, diversos fitoquímicos demonstraram exercer atividade anticâncer significativa em estudos pré-clínicos, incluindo derivados da colchicina, sulforafano e compostos fenólicos da dieta, como resveratrol, curcumina, quercetina, gingerol e kaempferol. No entanto, esses compostos ainda carecem de ensaios clínicos antes de sua aplicação na terapia contra o câncer (GARCIA-OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Os ensaios clínicos utilizando fitoquímicos contra o câncer ainda estão no início. No geral, esses ensaios têm como foco três aspectos principais da pesquisa do câncer: o primeiro é melhorar a resposta das células cancerosas à quimioterapia e a radioterapia padrão, o segundo é reduzir os efeitos adversos graves da terapia padrão do câncer e o terceiro é procurar interações indesejadas com a terapia padrão. Entre os fitoquímicos que atualmente têm sido avaliados em ensaios clínicos contra vários tipos de câncer estão a berberina, epigalocatequina, licopeno, resveratrol, sulforafano e a curcumina (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

No tocante ao câncer colorretal, observações epidemiológicas feitas nas últimas décadas destacaram a associação entre a ingestão de vários alimentos e nutrientes enriquecidos com fitoquímicos e o menor risco de desenvolvimento deste tipo de câncer, pois certos fitoquímicos da dieta exercem efeitos quimiopreventivos. A quimioprevenção do câncer é definida como o uso de compostos dietéticos naturais ou substâncias sintéticas para inibir, bloquear, suprimir, reverter ou impedir o processo de carcinogênese (ZHAO *et al.*, 2018; AFRIN, *et al.*, 2020).

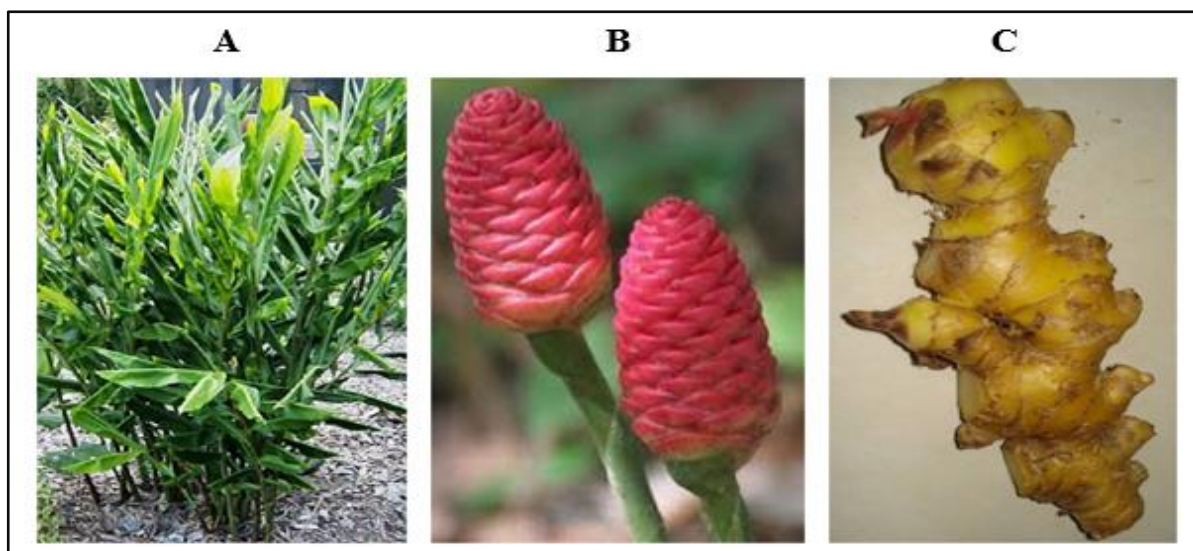
Alguns ensaios clínicos, em andamento ou já concluídos, que testaram diferentes fitoquímicos da dieta, incluindo a curcumina, resveratrol, quercetina, antocina, genisteína, epigallocatequina-galato e o ácido elágico, demonstraram a possibilidade desses compostos serem usados na quimioprevenção ou no tratamento do câncer colorretal (ZHAO *et al.*, 2018; AFRIN, *et al.*, 2020). Além dos fitoquímicos citados acima, um composto natural que recentemente tem atraído grande atenção é o zerumbone. Estudos constataram que ele apresenta uma potente atividade anticâncer em vários modelos tumorais, entre os quais estão os modelos de câncer colorretal (MURAKAMI *et al.*, 2002; PRASANAN *et al.*, 2012; DEORUKHKAR *et al.*, 2015; DERMANI *et al.*, 2018; HWANG *et al.*, 2020; DEGHAN *et al.*, 2021).

2.8 ZERUMBONE

Zerumbone (ZER) é um fitoquímico isolado de plantas da família Zingiberaceae, sendo encontrado principalmente nos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Sm., que têm sido amplamente utilizado tanto na medicina tradicional, quanto como aromatizante de alimentos e aperitivos (PARK; PARK; KIM, 2015; HAQUE *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2019). O rizoma e as folhas da planta são geralmente usados para temperos, chá, bebidas e para fins medicinais, enquanto a substância mucilaginosa presente nas inflorescências é utilizada como xampu e condicionador de cabelo em alguns países (RAHMAN *et al.*, 2014).

Z. zerumbet (Figura 9) é uma planta perene de raiz tuberosa, ela pode ser encontrada crescendo naturalmente em terras baixas ou colinas, nas partes úmidas e sombreadas das encostas. Acredita-se que ela seja nativa da Índia e da Península da Malásia, mas por ter sido cultivada por tanto tempo em lugares distintos do sudeste da Ásia, no Pacífico e na Oceania, o seu local de origem tornou-se incerto (YOB *et al.*, 2011). No Brasil essa espécie é normalmente conhecida pelo nome popular de gengibre amargo e é encontrada com facilidade e em grande quantidade no estado do Amazonas, onde as condições climáticas do local possibilitaram que ela se adaptasse muito bem (SILVA *et al.*, 2018).

Figura 9 - *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. A) Folhas; B) Inflorescências; C) Rizoma



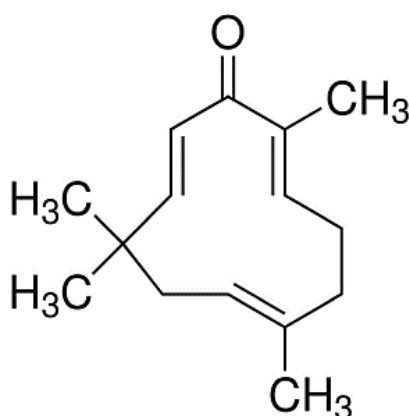
Fonte: Adaptado de Rahman e colaboradores (2014).

A estrutura química do zerumbone (2,6,9,9-tetramethyl-[2E,6E,10E]-cycloundeca-2,6,10-trien-1-one) consiste em um sesquiterpeno monocíclico com três ligações duplas (duas conjugadas e uma isolada) e um grupo carbonila conjugado, formando uma estrutura de anel de 11 membros (Figura 10) (KALANTARI *et al.*, 2017; GIRISA *et al.*, 2019). O Zerumbone foi obtido pela primeira vez no ano de 1956 a partir do óleo volátil essencial extraído dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. Em 1960 ele teve a sua estrutura investigada e caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e raios X. Desde então, várias técnicas têm sido utilizadas na sua extração, sendo os métodos mais eficazes a técnica de extração com solvente, de hidrodestilação, extração com fluido supercrítico, Soxhlet e extração com líquido pressurizado (KALANTARI *et al.*, 2017).

Os sesquiterpenos são constituídos por três moléculas de isopreno e pertencem ao maior grupo de metabólitos secundários de plantas, sendo amplamente distribuídos em várias angiospermas, algumas gimnospermas e briófitas. Os sesquiterpenos e seus derivados estão associados aos mecanismos de defesa das plantas por apresentarem atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral. Nas últimas duas décadas, esses compostos têm demonstrado grande potencial de aplicação na promoção da saúde contra uma gama de síndromes metabólicas, como hiperglicemia,

hiperlipidemia, complicações cardiovasculares, distúrbios neurais, diabetes e câncer (ABU-IZNEID *et al.*, 2020).

Figura 10 - Estrutura Química do Zerumbone.



Fonte: Li e colaboradores (2020).

Os efeitos farmacológicos do zerumbone na prevenção e tratamento de várias doenças crônicas foram extensivamente estudados. Ele foi bem estabelecido como um agente multidirecionado com potencial para tratar doenças crônicas, como osteoartrite, obesidade, diabetes, nefropatia diabética, retinopatia diabética, gastrite crônica, dor neuropática, aterosclerose, inflamação e câncer. Sua atuação se dá por meio da modulação de várias cascatas de sinalização celular e vias de apresentação de antígenos (SINGH *et al.*, 2019).

Entre as diversas propriedades farmacológicas apresentadas pelo zerumbone, destaca-se sua ação como um potente agente anti-inflamatório e analgésico (SULAIMAN *et al.*, 2010; SOMCHIT *et al.*, 2012). Devido a essa característica, estudos recentes demonstraram que ele tem um grande potencial como agente terapêutico para doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas humanas, como a doença de Alzheimer (LI *et al.*, 2020). Outra propriedade importante é a sua ação antioxidante, atuando por meio de duas vias principais: a atenuação do oxigênio reativo e geração de espécies de N_2 (KALANTARI *et al.*, 2017).

O zerumbone apresenta também atividade como bactericida (SIDAHMED *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018; KIM; RHEE; EOM, 2019), antipirético (SOMCHIT *et al.*, 2005), antialérgico (SHIEH *et al.*, 2015) e antiulcerativo (AL-AMIN; SULTANA;

HOSSAIN, 2012; SIDAHMED *et al.*, 2015). Além disso, seu efeito como antinociceptivo (SULAIMAN *et al.*, 2009) indica que ele pode ser um candidato em potencial como medicamento para o tratamento da osteoartrite (CHIEN *et al.*, 2016), e seus efeitos imunomodulatórios (KEONG *et al.*, 2010), a luz de evidências científica atuais, sugerem que ele pode ser um possível alvo molecular para o tratamento de doenças imunológicas (HAQUE *et al.*, 2017).

De particular interesse entre as diversas propriedades farmacológicas do zerumbone está a sua potente atividade anticâncer (PRASANNAN *et al.*, 2012; KALANTARI *et al.*, 2017). Pesquisas com diversos modelos tumorais demonstraram que ele pode modular uma série de alvos moleculares importantes, tanto para a prevenção quanto para o tratamento do câncer, possuindo propriedades antiproliferativas contra vários tipos de câncer, como câncer de cérebro, mama, colo do útero, fígado, pulmão, pâncreas, pele e câncer de cólon (MURAKAMI *et al.*, 2002; DEORUKHKAR *et al.*, 2015; PARK; PARK; KIM, 2015; KANG *et al.*, 2016; LV; ZHANG; HAN, 2018; GIRISA *et al.*, 2019; JALILI-NIK *et al.*, 2020; DEGHAN *et al.*, 2021).

Acredita-se que o efeito citotóxico do zerumbone nas células cancerosas deve-se ao seu versátil grupo carbonila α , β -insaturado, que desempenha um papel importante em sua interação com as proteínas celulares. Esse grupo carbonila remove de forma eficiente a glutathiona intracelular (GSH) por meio da formação de adutos de Michael, causando a elevação do potencial redox intracelular. Provavelmente devido a diferença no potencial redox intracelular médio entre células normais e cancerosas, o efeito desse composto na proliferação de células normais é acentuadamente reduzido (PARK; PARK; KIM, 2015; WANI *et al.*, 2018).

O Zerumbone diminui de forma significativa a geração de radicais livres, a produção de proteínas pró-inflamatórias e reduz a proliferação das células cancerosas por meio da apoptose (MURAKAMI *et al.*, 2002). Ele pode ainda suprimir a proliferação, migração e formação de tubos de células endoteliais (*in vitro*) e a angiogênese (*in vivo*), por meio do bloqueio de vias de sinalização angiogênicas (SHAMOTO *et al.*, 2014; PARK; PARK; KIM, 2015). Ele se mostrou capaz de interromper o ciclo celular (ABDELWAHAB *et al.*, 2012), diminuir a invasão celular (KANG *et al.*, 2016) e o potencial de crescimento e metástase (LV; ZHANG; HAN, 2018). Além disso, ele pode atuar no metabolismo das células cancerígenas, onde pode, por exemplo, reprogramar o metabolismo da glicose de forma a suprimir a hepatocarcinogênese (WANI *et al.*, 2018).

Diversos estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* têm relatado os efeitos do zerumbone sobre alvos moleculares distintos, utilizando para isso experimentos com diferentes modelos de câncer, inclusive modelos de cânceres colorretais (PRASANNAN *et al.*, 2012; KALANTARI *et al.*, 2017; GIRISA *et al.*, 2019). Entretanto, uma busca na plataforma ClinicalTrials.gov (um banco de dados de estudos clínicos privados e públicos conduzidos em todo o mundo) mostrou que até o presente não há nenhum registro de estudos clínicos que testassem o zerumbone no tratamento de alguma doença, incluindo câncer.

Em um estudo pré-clínico realizado com ratos F344 machos com focos de cripta aberrante (ACF) induzidas por azoximetano (AOM), a administração dietética de zerumbone reduziu 14% na frequência de ACF a uma dose de 0,01% e redução de 46% na dose de 0,05%, além de reduzir significativamente a expressão de COX-2 e prostaglandinas na mucosa do cólon, sugerindo um efeito benéfico na progressão pré-neoplásica do cólon e possível ação como agente quimiopreventivo (TANAKA *et al.*, 2001). Em camundongos ICR machos com neoplasia do cólon induzida por AOM e sulfato de dextrano de sódio (DSS) e alimentados com a dieta contendo zerumbone durante 17 semanas, a administração oral de ZER a 100, 250 e 500 ppm inibiu significativamente a multiplicidade de adenocarcinomas do cólon e suprimiu a inflamação do cólon, por meio de múltiplos mecanismos moduladores de crescimento, apoptose, inflamação e expressão do fator nuclear κ B (NF- κ B) e heme oxigenase-1 (HO-1) (KIM *et al.*, 2009).

A investigação dos efeitos quimiopreventivos da administração oral de zerumbone em camundongos colonizados por *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico (ETBF), uma bactéria pró-carcinogênica, com tumorigênese induzida por AOM e DSS, mostrou que o zerumbone reduziu significativamente as pontuações do índice de gravidade da atividade da doença, a inflamação do cólon e do ceco, bem como a hiperplasia. O tratamento com zerumbone também inibiu significativamente o número de pólipos colônicos e preveniu a progressão do macroadenoma, indicando que ele poderia ser empregado como um agente protetor promissor contra o câncer colorretal mediado por ETBF (HWANG *et al.*, 2020). Outro estudo similar indicou que o zerumbone pode aliviar significativamente o desequilíbrio microbiano intestinal contra ETBF e aumentar a diversidade microbiana intestinal, sugerindo que ele é um agente preventivo natural promissor junto com os agentes antimicrobianos convencionais

contra o câncer colorretal associado ao ETBF, com potencial para manter a saúde humana por meio de suplementação dietética (CHO; RHEE; EOM, 2020).

Em estudos *in vitro*, o zerumbone inibiu a proliferação de linhagens celulares de adenocarcinoma colônico humano LS174T, LS180, COLO205 e COLO320DM, afetando menos as células normais (2FO-C25 e CCD-18Co) (MURAKAMI *et al.*, 2002). Aumentou a apoptose induzida por TRAIL em células humanas de câncer de cólon HCT116 (YODKEEREE *et al.*, 2009). Induziu a apoptose, interrupção do ciclo celular e causou efeitos antimigratórios em células cancerosas colorretais SW480 (SITHARA *et al.*, 2018). Reduziu a proliferação de células cancerosas do cólon HCT116 pela inibição do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) (SINGH *et al.*, 2018). Inibiu a transição epitelial-mesenquimal, diminuiu a viabilidade celular, migração, invasão e potencial de formação de esferas em linhagens celulares de câncer colorretal HCT-116 e SW-48 (DERMANI *et al.*, 2018).

Pesquisadores observaram também que o zerumbone foi eficaz em suprimir a invasão e metástase em células HCT-116 e SW48 por meio da inibição da via de sinalização FAK / PI3k / NF- κ B-uPA, possivelmente representando uma nova classe de inibidores de FAK (HOSSEINI *et al.*, 2019). Ele foi capaz de induzir citotoxicidade e inibir a migração de células de carcinoma de cólon humano (HCT116), podendo ser um agente promissor para reduzir a capacidade de invasão das células cancerosas do cólon (JIEN *et al.*, 2020). Um estudo recente sugere ainda que a expressão de citocinas inflamatórias, com importante ação regulatória na progressão das células do câncer colorretal, pode ser suprimida por miR-34a e/ou zerumbone, e que embora na maioria dos casos a combinação de miR-34a e ZER não induza uma expressão de efeito sinérgico significativo de citocinas, em comparação com o uso de miR-34a e ZER sozinho, esses alvos terapêuticos podem modular o efeito um do outro quando um não está apresentando seu efeito inibitório (DEHGHAN *et al.*, 2021a).

A radiorresistência inerente às células do câncer colorretal é um sério problema que compromete o tratamento com radioterapia, fazendo com que os pacientes não atinjam uma resposta patológica completa. Um estudo realizado com linhagens de células HCT116, HT29 e SW620 mostrou que o zerumbone aumenta a radiosensibilidade do câncer colorretal. O zerumbone aumenta a parada do ciclo celular induzida por radiação (G2/M) e aumenta tanto a apoptose, quanto o dano ao DNA induzido por radiação (DEORUKHKAR *et al.*, 2015). Além disso, outro estudo sugere ainda que o ZER pode ser um composto promissor para ser usado em regimes

de tratamento combinado para induzir quimiossensibilização à terapia com 5-fluorouracil em linhagens de células de CCR por meio da regulação negativa dos marcadores relacionados a transição epitélio-mesenquimal, apoptose e via Wnt / β -catenina (DEHGHAN *et al.*, 2021b).

Diante do exposto, é possível constatar que o zerumbone apresenta propriedades anticancerígenas significativas em relação a diferentes linhagens celulares de câncer e baixo efeitos nas células normais, possuindo diferentes atividades biológicas benéficas (PRASANNAN *et al.*, 2012; KALANTARI *et al.*, 2017).

Todavia, ainda são necessários estudos clínicos e mais estudos pré-clínicos e investigações a nível celular e molecular para elucidar completamente seu modo de ação, sua toxicidade e preencher as lacunas de conhecimento que ainda restam acerca desse composto, a fim de que se tenha uma base substancial para fomentar seu uso como um potencial agente quimiopreventivo ou terapêutico, isolado ou em conjunto com terapias direcionadas para o tratamento do câncer (GIRISA *et al.*, 2019).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Observar os efeitos antiproliferativos do fitoquímico zerumbone (2,6,9,9-tetramethyl-[2E,6E,10E]-cycloundeca-2,6,10-trien-1-one) em cultura de células de adenocarcinoma de cólon (HT-29), avaliando seu modo de ação mediante a análise de respostas celulares envolvidas principalmente nos processos de morte e migração celular, correlacionando tais atividades com a expressão gênica (mRNA) no modelo de cultura em três dimensões (3D).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações citotóxicas de zerumbone para células HT-29 no modelo de cultura 2D através do ensaio de resazurina e calcular o IC₅₀;
- Avaliar o efeito do zerumbone no processo de migração celular por meio do ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* no modelo de cultura 2D;
- Investigar os efeitos antiproliferativos do zerumbone nos esferoides através da análise do volume após 24, 48 e 72 horas de tratamento;
- Analisar as alterações induzidas pelo tratamento com zerumbone nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) e morte, por meio da técnica de citometria de fluxo em esferoides;
- Investigar em esferoides os efeitos do zerumbone na expressão de mRNA de genes de controle de ciclo celular, apoptose, danos no DNA, estresse de retículo endoplasmático e estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S. I. *et al.* Zerumbone inhibits interleukin-6 and induces apoptosis and cell cycle arrest in ovarian and cervical cancer cells. **International immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 594-602, 2012.
- ABU-IZNEID, T. *et al.* Sesquiterpenes and their derivatives-natural anticancer compounds: An update. **Pharmacological Research**, v. 161, 2020.
- AFRIN, S. *et al.* Dietary phytochemicals in colorectal cancer prevention and treatment: A focus on the molecular mechanisms involved. **Biotechnology Advances**, v. 38, 2020.
- AKACHUKWU, I. *et al.* Drug-like properties of potential anti-cancer compounds from Cameroonian flora: A virtual studies. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 06, p. 133-137, 2015.
- AL-AMIN, M.; SULTANA, G.N.; HOSSAIN, C.F. Antiulcer principle from Zingiber montanum. **J Ethnopharmacol**, v. 141, n. 1, p. 57-60, 2012.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, 2015.
- ATCC- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. HT-29. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/htb-38#product-references>>. Acesso em: 6 out. 2021.
- BAGHERI, S.; BELL, R.B.; KHAN, H.A. **Current Therapy in Oral and Maxillofacial Surgery**. 1. ed. Saint Louis: Elsevier, 2012.
- BALLINGER, A. B.; ANGGIANSAH, C. Colorectal cancer. **BMJ**, v. 335, n. 7622, 715-718, 2007.
- BARBIERI, R. *et al.* Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological research**, v. 196, p. 44-68, 2017.
- BENELLI, R.; ZOCCHI, M. R.; POGGI, A. Three-Dimensional (3D) Culture Models in Cancer Investigation, Drug Testing and Immune Response Evaluation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 1, 2021.
- BERDIGALIYEV, N.; ALJOFAN; M. An overview of drug discovery and development. **Future medicinal chemistry**, v. 12, n. 10, p. 939-947, 2020.
- BHANOT, A.; SHARMA, R.; NOOLVI, M. N. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International journal of phytomedicine**, v. 3, n. 1, 2011.

- BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. **Seminars in cancer biology**, v. 40-41, p.1-3, 2016.
- BLASS, B. E. **Basic principles of drug discovery and development**. Academic Press: 2015.
- BOFFETTA, P.; HAINAUT, P. **Encyclopedia of Cancer**. 3. ed. Academic Press, 2019.
- BOULOS, J. C. *et al.* Shikonin derivatives for cancer prevention and therapy. **Cancer letters**, v. 459, p. 248-267, 2019.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRETTTHAUER, M. Colorectal cancer screening. **Journal of internal medicine**, v. 270, n. 2, p. 87-98, 2011.
- BRODNIEWICZ, T.; GRYNKIEWICZ, G. Preclinical drug development. **Acta Pol Pharm**, v. 67, n. 6, p. 578-585, 2010.
- BUSCH, M.; KÄMPFER, A. A. M.; SCHINS, R. P. F. An inverted in vitro triple culture model of the healthy and inflamed intestine: Adverse effects of polyethylene particles. **Chemosphere**, v. 284, p. 131345, 2021.
- CHATZINIKOLAIDOU, M. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. **Drug discovery today**, v. 21, n. 9, 2016.
- CHIEN, T.-Y. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Zerumbone against Mono-Iodoacetate-Induced Arthritis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 249, 2016.
- CHO, H-W.; RHEE, K-J.; EOM, Y.-B. Zerumbone Restores Gut Microbiota Composition in ETBF Colonized AOM/DSS Mice. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 1640-1650, 2020.
- CHOUDHARI, A. S. *et al.* Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, n. 1614, 2020.
- CIZKOVA, K. *et al.* HT-29 and Caco2 cell lines are suitable models for studying the role of arachidonic acid-metabolizing enzymes in intestinal cell differentiation. **Cells Tissues Organs**, v. 208, n. 1-2, p. 37-47, 2019.
- COSTA, E. C. *et al.* 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology advances**, v. 34, n. 8, p. 1427-1441, 2016.
- COSTA, M. C. *et al.* Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 6, n. 1, p. 72-83, 2018.

COURAU, T. *et al.* Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2019.

DAVIDSON, K.T.; ZHU, Z.; FANG, Y. Phytochemicals in the Fight Against Cancer. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 22, p. 655–660, 2016.

DEHGHAN, R. *et al.* A promising effect of zerumbone with improved anti-tumor-promoting inflammation activity of miR-34a in colorectal cancer cell lines. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 203-218, 2021a.

DEHGHAN, R. *et al.* The Combination of Zerumbone and 5-FU: A Significant Therapeutic Strategy in Sensitizing Colorectal Cancer Cells to Treatment. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021b.

DEL VECCHIO BLANCO, G. *et al.* The impact of COVID-19 pandemic in the colorectal cancer prevention. **International journal of colorectal disease**, v. 35, p. 1951-1954, 2020.

DEORUKHKAR, A. *et al.* Zerumbone increases oxidative stress in a thiol-dependent ROS-independent manner to increase DNA damage and sensitize colorectal cancer cells to radiation. **Cancer medicine**, v. 4, n. 2, p. 278-292, 2015.

DERMANI, F. K. *et al.* Zerumbone inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells properties by inhibiting the β -catenin pathway through miR-200c. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n.12, p. 9538-9547, 2018.

DHANDAPANI, M.; GOLDMAN, A. Preclinical cancer models and biomarkers for drug development: new technologies and emerging tools. **Journal of molecular biomarkers & diagnosis**, v. 8, n. 5, 2017.

DOKE, S.K. DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharm J.**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

DUTTA, S. *et al.* Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 240-255, 2019.

ELDEHNA, W. M. *et al.* Development of 2-oxindolin-3-ylidene-indole-3-carbohydrazide derivatives as novel apoptotic and anti-proliferative agents towards colorectal cancer cells. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 36, n. 1, p. 320-329, 2021.

ESTÉVEZ-BRAUN, A. *et al.* A new family of choline kinase inhibitors with antiproliferative and antitumor activity derived from natural products. **Clinical and Translational Oncology**, v. 17, n. 1, p. 74-84, 2015.

FANG, Y. A. O. *et al.* Antitumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of fermented barley extract in the transplantation tumor model of human HT-29 cells in nude mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 30, n. 1, p. 10-21, 2017.

FDA. **The Drug Development Process**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>>. Acesso em: 20 de mar. 2021a.

FDA. **What Are the Different Types of Clinical Research?** Disponível em: <https://www.fda.gov/patients/clinical-trials-what-patients-need-know/what-are-different-types-clinical-research>>. Acesso em: 20 de mar. 2021b.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FERNÁNDEZ, J. *et al.* Antiproliferative and palliative activity of flavonoids in colorectal cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112241, 2021.

FERRARETTO, A. *et al.* Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium. **Bioscience reports**, v. 38, n. 2, 2018.

FOGEL, D. B. Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review. **Contemporary clinical trials communications**, v. 11, p. 156-164, 2018.

FOGH, J.; TREMPE, G. New Human Tumor Cell Lines. *In*: FOGH, Jørgen (ed.). **Human Tumor Cells in Vitro**. Boston, MA: Springer, 1975.

FONTANA, F. *et al.* Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, 2020.

FRANK, C. *et al.* Era of faster FDA drug approval has also seen increased black-box warnings and market withdrawals. **Health affairs**, v. 33, n. 8, p. 1453-1459, 2014.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

GARCIA-OLIVEIRA, P. *et al.* Status and challenges of plant-anticancer compounds in cancer treatment. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 2, p. 157, 2021.

GINSBURG, G. S.; WILLARD, H. F. **Genomic and personalized medicine**. Academic Press, 2008.

GIRISA, S. *et al.* Potential of Zerumbone as an Anti-Cancer Agent. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 1-20, 2019.

GOLDBERG, A. M.; HARTUNG, T. Protecting more than animals. **Scientific American**, v. 294, n. 1, p. 84-91, 2006.

GREEN, S. K. *et al.* Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 149-159, 2004.

GUNTI, S. *et al.* Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. **Cancers**, v. 13, n. 4, 2021.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer cell international**, v. 21, n. 1, 2021.

HANAHAHAN, D; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAQUE, M. A. *et al.* Exploring the immunomodulatory and anticancer properties of zerumbone. **Food & function**, v. 8, n. 10, p. 3410–3431, 2017.

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

HEMN, H. O. *et al.* Antihypercholesterolemic and antioxidant efficacies of zerumbone on the formation, development, and establishment of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4173-4208, 2015.

HICKMAN, J. A. *et al.* Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. **Biotechnology journal**, v. 9, 2014.

HITE, N. *et al.* An optimal orthotopic mouse model for human colorectal cancer primary tumor growth and spontaneous metastasis. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 61, n. 6, p. 698-705, 2018.

HONEK, J. Preclinical research in drug development. **Medical Writing**, v. 26, n. 4, p. 5-8, 2017.

HORIEN, C.; YUAN, P. Focus: drug development: drug development. **The Yale Journal of Biology and medicine**, v. 90, n. 1, p. 1, 2017.

HORNUNG, A. *et al.* Toxicity of mitoxantrone-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles in a HT-29 tumour spheroid model. **Anticancer research**, v. 36, n. 6, p. 3093-3101, 2016.

HOSSEINI, A.; GHORBANI, A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 84, 2015.

HOSSEINI, N. *et al.* Zerumbone Suppresses Human Colorectal Cancer Invasion and Metastasis via Modulation of FAK/PI3k/NFκB-uPA Pathway. **Nutrition and cancer**, v. 71, n. 1, p. 159-171, 2019.

HUANG, X.-M. *et al.* Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, 2019.

HUANG, Y. *et al.* **Chemical changes of bioactive phytochemicals during thermal processing**. *In*: Reference Module in Food Science. Elsevier, 2016.

HWANG, S. *et al.* Protective effects of zerumbone on colonic tumorigenesis in Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis (ETBF)-colonized AOM/DSS BALB/c Mice. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 857, 2020.

IARC. **Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–129**. Disponível em: <<https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>>. Acesso em: 12 de jun. 2021.

IBARROLA-VILLAVA, M.; CERVANTES, A.; BARDELLI, A. Preclinical models for precision oncology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1870, n. 2, p. 239-246, 2018.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Mario Jorge Sobreira da Silva (org.). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 5. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2019a.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019b.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 33, 2020.

JEPPESEN, M. *et al.* Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. **PloS one**, v. 12, n.9, 2017.

JIEN, T. M. *et al.* Zerumbone Induces Cytotoxicity and Inhibits Cell Migration of Human Colon Cancer Cells. **Sains Malaysiana**, v. 49, n. 6, p. 1359-1370, 2020.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALANTARI, K. *et al.* A review of the biomedical applications of zerumbone and the techniques for its extraction from ginger rhizomes. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1645, 2017.

KANG, C. G. *et al.* Zerumbone Suppresses Osteopontin-Induced Cell Invasion Through Inhibiting the FAK/AKT/ROCK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. **Journal of natural products**, v. 79, n. 1, p. 156-60, 2016.

KAPALCZYŃSKA, M. *et al.* 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of medical science: AMS**, v. 14, n. 4, p. 910, 2018.

KASDAGLY, M. *et al.* Colon carcinogenesis: Influence of Western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. **Nutrition**, v. 30, n. 11-12, p. 1242-1256, 2014.

KASPER, D. L. *et al.* **Medicina interna de Harrison**. 19. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

- KEONG, Y. S. *et al.* Immunomodulatory effects of zerumbone isolated from roots of Zingiber zerumbet. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 23, n. 1, p. 75-82, 2010.
- KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v.16, p. 713–732, 2019.
- KHANNA, S. *et al.* Multicellular Tumor Spheroids as *In Vitro* Models for Studying Tumor Responses to Anticancer Therapies. In: VERMA, A.S.; SINGH, A. (ed.). **Animal Biotechnology**. 2. ed. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2020. p. 251–268.
- KIM, H.-R.; RHEE, K.-J.; EOM, Y.-B. Anti-biofilm and antimicrobial effects of zerumbone against *Bacteroides fragilis*. **Anaerobe**, v. 57, p. 99-106, 2019.
- KIM, M. *et al.* Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. **International journal of cancer**, v. 124, n. 2, p. 264-271, 2009.
- KING, T. **Elsevier's Integrated Pathology**. 1. ed. Elsevier Health Sciences, 2006.
- KLAUNIG, James E. Chemical carcinogenesis. *In*: ROBERTS, Stephen M. Roberts; JAMES, Robert C.; WILLIAMS, Phillip L. (ed.). **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**. 3. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2015. cap. 15, p. 259-281.
- KLINGHAMMER, K.; WALTHER, W.; HOFFMANN, J. Choosing wisely—Preclinical test models in the era of precision medicine. **Cancer treatment reviews**, v. 55, p. 36-45, 2017.
- KOGA, A. Y.; BELTRAME, F. L.; PEREIRA, A. V. Several aspects of Zingiber zerumbet: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 385-391, 2016.
- KOH, Y.-C.; HO, C.-T.; PAN, M.-H.. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. **Journal of food and drug analysis**, v. 28, n.1, p. 14-37, 2020.
- KOLEDOVA, Z. (ed). **3D Cell Culture: Methods and Protocols**. Humana Press, 2017. v. 1612.
- KUIPERS, E. J. *et al.* Colorectal cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, n. 15065, 2015.
- LANGHANS, S.A. Three-Dimensional *in Vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. **Front Pharmacol**, v. 9, n. 6, 2018.
- LEE, G. H. *et al.* Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer?—a systematic review. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 41, n. 3, p. 300-308, 2015.

LEE, J. *et al.* Evaluating Cell Death Using Cell-Free Supernatant of Probiotics in Three-Dimensional Spheroid Cultures of Colorectal Cancer Cells. **J. Vis. Exp.**, n. 160, p. 1-17, 2020.

LEES, R. K.; SORDAT, B.; MACDONALD, R. Multicellular tumor spheroids of human colon carcinoma origin. **Exp Cell Biol.**, v. 49, n. 4, p. 207-219, 1981.

LI, G.; LOU, H.-X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal research reviews**, v. 38, n. 4, p. 1255-1294, 2018.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LI, L. *et al.* Zerumbone ameliorates behavioral impairments and neuropathology in transgenic APP/PS1 mice by suppressing MAPK signaling. **Journal of neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 61, 2020.

LODISH, H. *et al.* **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LV, D. *et al.* Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. **Oncology letters**, v. 14, n. 6, p. 6999-7010, 2017.

LV, T.; ZHANG, W.; HAN, X. Zerumbone suppresses the potential of growth and metastasis in hepatoma HepG2 cells via the MAPK signaling pathway. **Oncol Lett.**, v. 15, n. 5, p. 7603-7610, 2018.

MANSINHO, A. *et al.* New designs in early clinical drug development. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 9, p. 1460-1465, 2019.

MARINGE, C. *et al.* The impact of the COVID-19 pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: a national, population-based, modelling study. **The lancet oncology**, v. 21, n. 8, p. 1023-1034, 2020.

MAZZOCCA, A.; FAIS, S. New hypotheses for cancer generation and progression. **Medical Hypotheses**, v. 152, 2021.

MCLEAN, L. Drug development. *In*: HOCHBERG, M. C. *et al.*, (ed.). **Rheumatology**. 6. ed. Philadelphia: Mosby, 2015.

MESAS, C. *et al.* Antioxidant and antiproliferative potential of ethanolic extracts from *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* and *Annona cherimola* in colorectal cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112248, 2021.

MITCHELL, M. G. **Bioprinting: Techniques and Risks for Regenerative Medicine**. Academic Press, 2017.

MOOSAVI, M. A. *et al.* Phytochemicals as potent modulators of autophagy for cancer therapy. **Cancer letters**, v. 424, p. 46-69, 2018.

MULLARD, A. 2020 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 85-90, 2021.

MURAKAMI, A. *et al.* Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the α , β -unsaturated carbonyl group is a prerequisite. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 795-802, 2002.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. **The drug development paradigm in oncology: proceedings of a workshop**. Washington, DC: The National Academies Press, 2018.

NG, R. **Drugs**: from discovery to approval Hoboken. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

NGUYEN, H. T.; DUONG, H.-Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. **Oncology letters**, v. 16, n. 1, p. 9-18, 2018.

NOJADEH, J. N.; SHARIF, S. B.; SAKHINIA, E. Microsatellite instability in colorectal cancer. **EXCLI journal**, v. 17, p. 159, 2018.

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

PADMALAYAM, I.; SUTO, M. J. 3D Cell Cultures: Mimicking In Vivo Tissues for Improved Predictability in Drug Discovery. *In*: DESAI, M. C. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, 1. ed. v. 47. Elsevier, 2012, p. 367-378.

PARK, J.H.; PARK, G.M.; KIM, J.K. Zerumbone, Sesquiterpene Photochemical from Ginger, Inhibits Angiogenesis. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 19, n. 4, p. 335-340, 2015.

PASCHKE, S. *et al.* Are Colon and Rectal Cancer Two Different Tumor Entities? A Proposal to Abandon the Term Colorectal Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2577, 2018.

PATRIDGE, E. *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug discovery today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.

PERERA, F. P. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 8, p. 496-509, 1996.

POINTET, A.-L.; TAIEB, J. Cáncer de colon. **EMC-Tratado de Medicina**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2017. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1636541016817924>>.
Acesso em: 01 de jun. 2021.

PRASAD, V.; MAILANKODY, S. Research and development spending to bring a single cancer drug to market and revenues after approval. **JAMA internal medicine**, v. 177, n. 11, p. 1569-1575, 2017.

PRASANAN, R. *et al.* Key cell signaling pathways modulated by zerumbone: role in the prevention and treatment of cancer. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1268-1276, 2012.

RAHMAN, H. S. *et al.* Biomedical properties of a natural dietary plant metabolite, zerumbone, in cancer therapy and chemoprevention trials. **BioMed research international**, v. 2014, n. 920742, 2014.

RAMCHANDANI, S. *et al.* An Overview of the Potential Antineoplastic Effects of Casticin. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1287, 2020.

RANI, K. G. *et al.* Drug development post COVID-19 pandemic: toward a better system to meet current and future global health challenges. **Expert opinion on drug discovery**, v. 16, n. 4, p. 365-371, 2020.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American journal of cardiology**, v. 101, n. 10, p. 43-49, 2008.

RIZEQ, B. *et al.* The power of phytochemicals combination in cancer chemoprevention. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4521, 2020.

RODRIGUES, T. *et al.* Counting on natural products for drug design. **Nature chemistry**, v. 8, n. 6, 2016.

ROMA-RODRIGUES, C. *et al.* Nanotheranostics targeting the tumor microenvironment. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, 2019.

RUSSO, M. *et al.* Phytochemicals in cancer prevention and therapy: truth or dare?. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 517-551, 2010.

SAITO, R. F. *et al.* **Fundamentos da oncologia molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

SAMET, J. M. *et al.* The IARC Monographs: Updated procedures for modern and transparent evidence synthesis in cancer hazard identification. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 112, n. 1, p. 30-37, 2020.

SCHERZER, M. *et al.* Preclinical Cancer Models with the Potential to Predict Clinical Response. *In*: EGGER, G.; ARIMONDO, P. (ed.). **Drug Discovery in Cancer Epigenetics**. Academic Press, 2016.

SCHROLL, M. M. *et al.* Combined Short-Term Glucose Starvation and Chemotherapy in 3D Colorectal Cancer Cell Culture Decreases 14-3-3 Family Protein Expression and Phenotypic Response to Therapy. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 10, p. 2012-2022, 2018.

SEGERITZ, C.P.; VALLIER, L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**. p. 151-172, 2017.

SERALA, K. *et al.* In vitro antimetastatic activity of *Momordica balsamina* crude acetone extract in HT-29 human colon cancer cells. **Environmental Toxicology**, 2021.

SHAMOTO, T. *et al.* Zerumbone inhibits angiogenesis by blocking NF- κ B activity in pancreatic cancer. **Pancreas**, v. 43, n. 3, p. 396-404, 2014.

SHANMUGAM, M. K. *et al.* Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. **Seminars in cancer biology**, v. 40-41, 2016.

SHIEH, Y.-H. *et al.* Zerumbone enhances the Th1 response and ameliorates ovalbumin-induced Th2 responses and airway inflammation in mice. **International immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 383-391, 2015.

SIDAHMED, H. M. A. *et al.* Antisecretory, gastroprotective, antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activity of zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **PloS one**, v. 10, n. 3, 2015.

SIEGEL, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 3, p. 145-164, 2020.

SILVA, T. M. *et al.* Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) smith: a potential prophylactic and therapeutic agent against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 301, 2018.

SINGH, S. P. *et al.* Zerumbone reduces proliferation of HCT116 colon cancer cells by inhibition of TNF- α . **Scientific reports**, v. 8, n. 4090, 2018.

SINGH, Y. P. *et al.* Potential application of zerumbone in the prevention and therapy of chronic human diseases. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 248-258, 2019.

SITHARA, T. *et al.* Zerumbone, a Cyclic Sesquiterpene from *Zingiber zerumbet* Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Antimigratory Effects in SW480 Colorectal Cancer Cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 3, p. 602-612, 2018.

SOMCHIT, M. N. *et al.* Zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet* inhibits inflammation and pain in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 2, p. 177-180, 2012.

SOMCHIT, M.N. *et al.* Anti-pyretic and Analgesic Activity of *Zingiber zerumbet*. **International Journal of Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 277-280, 2005.

SORANZO, C.; INGROSSO, A. A comparative study of the effects of anthracycline derivatives on a human adenocarcinoma cell line (LoVo) grown as a monolayer and as spheroids. **Anticancer Res.** v. 8, n. 3, p. 369-373, 1988.

SRIVASTAVA, S. K. *et al.* Modulation of microRNAs by phytochemicals in cancer: underlying mechanisms and translational significance. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

- SULAIMAN, M. R. *et al.* Anti-inflammatory effect of zerumbone on acute and chronic inflammation models in mice. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 855-8, 2010.
- SULAIMAN, M. R. *et al.* Preliminary analysis of the antinociceptive activity of zerumbone. **Fitoterapia**, v. 80, n. 4, p. 230-232, 2009.
- SUN, C.Y. *et al.* Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 110, p. 518-527, 2019.
- SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, p. 1-41, 2021.
- TANAKA, T. *et al.* Chemoprevention of azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci by dietary zerumbone isolated from Zingiber zerumbet. **Life Sciences**, v. 69, n. 16, p. 1935-1945, 2001.
- THULASIDAS, J. *et al.* Cancer-Fighting Phytochemicals: Another Look. **J Nanomedicine Biotherapeutic Discov**, v. 9, n. 162, 2019.
- TOKUMARU, Y. *et al.* Organoids Are Limited in Modeling the Colon Adenoma–Carcinoma Sequence. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 488, 2021.
- TUORKEY, M. J. Cancer Therapy with Phytochemicals: Present and Future Perspectives. **Biomedical and environmental sciences**, v. 28, n. 11, p. 808-19, 2015.
- VALERI, A. *et al.* **What's new in surgical oncology**: a guide for surgeons in training and medical/radiation oncologists. Milão, Itália: Springer, 2013.
- VERMA, A. S.; SINGH, A. (Ed.). **Animal biotechnology**: models in discovery and translation. 2. ed. Academic Press, 2020.
- VIEIRA, C. S. **Oncologia para profissionais de saúde**. Tersina: EDUFPI, 2016.
- WANI, N. A. *et al.* Reprograming of Glucose Metabolism by Zerumbone Suppresses Hepatocarcinogenesis. **Molecular cancer research: MCR**, v. 16, n. 2, p. 256-268, 2018.
- WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.
- WEINSTEIN, J. N. Cell lines battle cancer. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 544-545, 2012.
- WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.). **World cancer report**: cancer research for cancer prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020.
- WOUTERS, O.J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA**. v. 323, n. 9, p-844-853, 2020.

XIE, Y.; CHEN, Y.; FANG, J. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Sig Transduct Target Ther** p., v. 5, n. 22, 2020.

XU, Zhimin; HOWARD, Luke R. (ed.). **Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals**. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2012. 391 p.

YOB, N. J. *et al.* Zingiber zerumbet (L.) Smith: A Review of Its Ethnomedicinal, Chemical, and Pharmacological Uses. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2011, 2011.

YODKEEREE, S. *et al.* Zerumbone enhances TRAIL-induced apoptosis through the induction of death receptors in human colon cancer cells: Evidence for an essential role of reactive oxygen species. **Cancer research**, v. 69, n. 16, p. 6581-9, 2009.

YUAN, H. *et al.* The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

ZACHARY, J. **Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult**. 6. ed. Saint Louis: Elsevier, 2017.

ZANONI, M. *et al.* Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 3, p. 289–301, 2019.

ZHAO, Y. *et al.* Chemopreventive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: a review. **Food & function**, v. 9, n. 9, p. 4548-4568, 2018.

ZHAO, Y. *et al.* Discovery of bilirubin as novel P2X7R antagonist with anti-tumor activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 128361, 2021.

ZURITA-CRUZ, J. N.; BARBOSA-CORTÉS, L.; VILLASÍS-KEEVER, M. Á. De la investigación a la práctica: fases clínicas para el desarrollo de fármacos. **Revista Alergia México**, v. 66, n. 2, p. 246-253, 2019.

ARTIGO

Efeitos do Zerumbone na migração celular (2D) na indução de apoptose, alterações de ciclo celular e expressão de mRNA em esferoides (3D) tumorais de células HT-29

Autores¹

¹ Department of General Biology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil

Resumo

Zerumbone é um fitoquímico com diversas propriedades farmacológicas, entre as quais está sua atividade anticâncer, demonstrada por estudos *in vivo* e *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi identificar e analisar os efeitos antiproliferativos e antimigratórios do zerumbone em cultura de células da linhagem HT-29, avaliando seu modo de ação em esferoides 3D mediante a análise de morte, ciclo celular e volume, correlacionando esses dados com a análise de expressão gênica (mRNA). Os resultados obtidos através do modelo de cultivo em 2D evidenciaram que o tratamento com zerumbone foi citotóxico nas concentrações de 30-80 μ M e que a concentração de 83,54 μ M (IC50) inibiu a migração celular. No modelo 3D, zerumbone ocasionou aumento no volume médio dos esferoides no tempo de 72h em relação ao controle, levando a desagregação e desconfiguração de suas zonas características. A análise de morte celular demonstrou que em 24h e 72h houve um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas nos esferoides tratados em comparação com os controles, além do aumento da porcentagem relativa de células na fase G1 do ciclo celular. Por fim, zerumbone modulou a expressão dos genes *BBC3*, *ERN1*, *GADD45A*, *CDKN1A*, *NFKB1*, *TP53*, *SQSTM1*, *BECN1* e *MYC*. Esses resultados indicam que zerumbone é um potencial candidato para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer por alterar vias de sinalização celular relacionadas aos processos de morte celular, reparo do DNA, ciclo celular e autofagia, e estudos como esse que utilizam a cultura 3D são ferramentas importantes para auxiliar nessa investigação.

Palavras-chave: Anticâncer. Cultura 3D. Expressão gênica. Fitoquímico. Zerumbone.

1 INTRODUÇÃO

Zerumbone, um fitoquímico isolado de plantas da família Zingiberaceae e encontrado principalmente nos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Sm., (PARK; PARK; KIM, 2015; HAQUE *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2019), é um composto natural que têm atraído bastante atenção devido a sua gama de propriedades farmacológicas, entre as quais estão sua atividade antimicrobiana, antiúlcera, antipirética, antinociceptiva, imunomoduladora, antioxidante, anti-inflamatória e principalmente sua ação antitumoral exercendo sua atividade contra vários tipos de câncer, entre os

eles o câncer colorretal (MURAKAMI *et al.*, 2002; SOMCHIT *et al.*, 2005; KEONG *et al.*, 2010; SULAIMAN *et al.*, 2010; PRASANNAN *et al.*, 2012; SOMCHIT *et al.*, 2012; HEMN *et al.*, 2015; SHIEH *et al.*, 2015; LEUNG *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

O câncer colorretal (CCR) é um grave problema de saúde pública que vem ganhando destaque devido à sua alta taxa de incidência e mortalidade (MÁRMOL *et al.*, 2017). Atualmente as abordagens disponíveis para o tratamento do CCR consistem principalmente na remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Todavia, estes tratamentos apresentam uma série de limitações. No caso da quimioterapia, por exemplo, o paciente pode apresentar recorrência do tumor, adquirir resistência aos medicamentos, que podem ainda causar efeitos tóxicos em tecidos não direcionados (CHOUDHARI *et al.*, 2020; PASHIRZAD; JOHNSTON; SAHEBKAR, 2021).

Para superar estas limitações dos tratamentos convencionais, cientistas do mundo todo têm se empenhado na busca de novos agentes anticâncer com melhor eficácia e menos efeitos adversos (CHOUDHARI *et al.*, 2020). A partir desses esforços, diversos compostos naturais com propriedades antitumorais, como o zerumbone, foram identificados (REJHOVÁ *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2019; BRACCI *et al.*, 2021; PASHIRZAD; JOHNSTON; SAHEBKAR, 2021). Esses compostos naturais geralmente atuam em múltiplas vias, afetando diversos alvos moleculares, incluindo fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, receptores de fator de crescimento, enzimas inflamatórias, entre outros (HAQUE; BRAZEAU; AMIN, 2021).

Devido ao potencial do zerumbone como agente anticâncer, estudos utilizando diferentes modelos experimentais contribuem para compreender melhor seu modo de ação, seu desempenho farmacológico e sua toxicidade. Esses estudos são uma etapa muito importante, visto que a tradução dos resultados alcançados na bancada para a prática clínica é um dos desafios mais complexos no desenvolvimento e aprimoramento de novos agentes terapêuticos (SEIDLITZ; STANGE, 2021).

Até o presente, os estudos que testaram o potencial anticâncer do zerumbone foram realizados *in vivo* em modelos murinos e *in vitro* utilizando cultura de células bidimensionais (2D) (PRASANNAN *et al.*, 2012; RAHMAN *et al.*, 2014; HAQUE *et al.*, 2017; GIRISA *et al.*, 2019). Entretanto, esses modelos de câncer muitas vezes recapitulam mal o comportamento dos tumores dos pacientes, o que pode ser a principal razão para a alta taxa de medicamentos que falham em testes clínicos, mas têm um bom desempenho em modelos 2D de câncer. Os modelos de linhagens

celulares de câncer 2D forneceram informações importantes acerca das respostas aos medicamentos e das alterações genéticas que ocorrem nas células cancerosas, além disso, apresentam baixo custo de manuseio e facilidade de uso. Todavia, elas não recapitulam inteiramente a heterogeneidade e o comportamento dos tumores dos quais são derivadas (JENSEN; TENG, 2020; SEIDLITZ; STANGE, 2021).

Nesse cenário, a cultura de células em três dimensões (3D) surgiu a fim de preencher a lacuna entre a cultura tradicional de células 2D e as experiências tumorais *in vivo* (LV *et al.*, 2017). Ao realizar experimentos com cultura de células 3D o ambiente celular pode ser manipulado para imitar certas características de uma célula *in vivo*, fornecendo dados mais precisos sobre interações célula-célula, características do tumor, ação de drogas, perfil metabólico, entre outros aspectos (LANGHANS, 2018; JENSEN; TENG, 2020). Com esse modelo de cultura é possível analisar a eficácia pré-clínica de novas drogas, ao passo que ele também torna possível diminuir o número de animais utilizados nas pesquisas (KHANNA *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi observar os efeitos antiproliferativos do fitoquímico zerumbone em culturas de células de adenocarcinoma de cólon da linhagem HT-29, avaliando seu modo de ação mediante a análise de respostas celulares envolvidas no processo de morte e migração celular, correlacionando com a expressão gênica de mRNA, utilizando principalmente o modelo de cultura de esferoides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTURA E AGENTES QUÍMICOS

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon HT-29, que apresenta morfologia epitelial e propriedades de crescimento aderente, foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, livre de micoplasma. As células foram cultivadas em meio de cultura McCoy's 5A modificado com L-glutamina (Sigma-Aldrich, Cat. N°: M4892), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, Cat. N°: 12657-029) e 1% de antibiótico e antimicótico (Gibco, Cat. N°:15240-062), em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A viabilidade celular foi monitorada (azul de tripano 0,4%, Invitrogen, Cat. N°: T10282) em contador de células automatizado Countess II FL (Life Technologies), sendo utilizada apenas as culturas com viabilidade acima de 90%.

O composto zerumbone (C₁₅H₂₂O) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Cat.

Nº: Z3902), dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Cat. Nº: 472301) e diluído em meio de cultura nas concentrações testadas. Para controle positivo foram utilizadas a camptotecina nos ensaios de morte e ciclo celular por citometria de fluxo (Sigma-Aldrich®, cat. Nº C9911) e doxorubicina (Doxolem, Zodiac) nos demais experimentos. Para os experimentos, o tratamento controle foi o de veículo, no qual foi utilizada o DMSO (0,41%), que corresponde a porcentagem de DMSO presente na maior concentração de zerumbone testada.

2.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (RESAZURINA)

O efeito citotóxico do zerumbone nas células HT-29 foi avaliado por meio do corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) em placas de 48 poços, onde foram semeadas 5×10^4 células/poço 24 horas antes do tratamento. As células foram tratadas com zerumbone nas concentrações de 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M e 80 μ M, escolhidas com base em experimentos piloto, além do controle de veículo e controle positivo (20 μ M de Doxorubicina). Após 24 horas de tratamento, as células foram incubadas com resazurina (60 μ M) por mais 4 horas. Em seguida a fluorescência foi mensurada em espectrofotômetro Glomax® (520 nm de excitação e 580-640 nm de emissão). A viabilidade celular foi estimada utilizando a fórmula: porcentagem de viabilidade = $[(A_{tratamento} - A_{branco}) / (A_{controle} - A_{branco}) \times 100]$, onde A representa o valor da fluorescência. O IC₅₀, a concentração citotóxica necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%, e o coeficiente de correlação foram calculados no software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Para cada tratamento foi feita a leitura de 6 poços, com duas repetições.

2.3 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS *IN VITRO*

O ensaio de fechamento de feridas foi realizado seguindo o protocolo descrito por Justus e colaboradores (2014). Resumidamente, em uma placa de cultura de 12 poços foram semeadas 5×10^5 células/poço que foram cultivadas até atingirem 100% de confluência. Em um ambiente estéril foi feito um risco na monocamada de células utilizando uma ponteira de 10 μ L, o meio de cultura e os restos celulares foram aspirados cuidadosamente, o poço foi lavado duas vezes com Tampão Fosfato Salino (PBS) e por fim foi adicionado em cada poço 2000 μ L de meio de cultura contendo o

tratamento com Zerumbone 83.54 μ M ou o controle de veículo DMSO 0,41%. Em seguida a placa de cultura foi acondicionada em estufa com temperatura e atmosfera controlada, e nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72 horas a placa foi removida da estufa e foram capturadas imagens por meio do microscópio EVOS® FL Auto Imaging System usando uma objetiva de 10x para verificar o fechamento da ferida. A área e a largura da ferida foram obtidas a partir das imagens de microscopia utilizando o software ImageJ® e o plugin Wound Healing Size Tool (SUAREZ-ARNEDO *et al.*, 2020).

2.4 CULTIVO CELULAR 3D – ESFEROIDES

Para a obtenção dos esferoides foi seguido o protocolo proposto por Friedrich e colaboradores (2009). Em placas de cultura de 96 poços foi adicionado 50 μ L/poço de uma solução antiaderente estéril contendo agarose Low Melting (1,5%) diluída em meio de cultura sem SBF. Após a solidificação da agarose, foram semeadas 5x10³ células/poço em meio de cultura com SBF para um volume final de 150 μ L por poço. Em seguida, a placa foi centrifugada a 1000 rpm por 8 min e acondicionada em estufa até o fim do período de esferoidização (6 dias). Os ensaios foram desenvolvidos após esse período.

2.4.1 Ensaio de volume dos esferoides

Aos poços com os esferoides foram adicionados 50 μ L de meio de cultura suplementado com SBF contendo os diferentes tratamentos: Controle de veículo; Zerumbone (IC50: 83,54 μ M), Controle positivo (Doxorrubicina 20 μ M). Os esferoides foram fotografados no tempo 0h, 24h, 48h e 72 horas após o tratamento por meio do microscópio EVOS® FL Auto Imaging System usando uma objetiva de 10x. Os volumes dos esferoides e a renderização dos gráficos 3D foram obtidos por meio dos softwares AnaSP e ReViSP (PICCININI, 2015; PICCININI *et al.*, 2015) e expressos em milímetros cúbicos (mm³). Após 72 horas de tratamento, os esferoides foram transferidos para uma placa de 48 poços e foi adicionado 300 μ L/poço de meio de cultivo suplementado com SBF sem tratamento, para observar a recuperação da proliferação celular por 24 horas na superfície aderente. Além disso, os esferoides foram marcados com corantes fluorescentes Rodamina123 e Hoechst33342 para monitorar a atividade mitocondrial e a condensação do conteúdo de DNA das células, respectivamente. Foram analisados nove esferoides por tratamento e três repetições

experimentais.

2.4.2 Ensaio de ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo

Para o ensaio de ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo, os esferoides foram tratados com zerumbone (IC_{50}). Para cada tratamento foram coletados cinco esferoides lavados com PBS e as células foram dissociadas em tripsina 0,025%, inativadas em meio de cultura com SBF e, após a centrifugação, ressuspensas em PBS. Para investigar a indução de morte celular, foi utilizado o kit PE Annexin Apoptosis Detection (BD Pharmingen, Cat. N°: 559763), seguindo as recomendações do fabricante. Para analisar o perfil da população celular nas fases do ciclo celular (G_1 , S e G_2/M) as células foram permeabilizadas com 100 μ L de solução citrato/triton (0,1% de citrato de sódio/ 0,1% de Triton X-100)/100 μ L de suspensão celular e o DNA corado com 5 μ L de iodeto de propídio (50 μ g/mL) por 15 minutos. Para ambos os ensaios a intensidade de fluorescência de cada ensaio foi quantificada por meio de citômetro de fluxo Guava EasyCyte™, analisando-se 5.000 eventos/amostra para ciclo celular e 2.000 eventos/amostra para apoptose. Para cada experimento foram realizadas três repetições experimentais.

2.4.3 Expressão gênica relativa (mRNA) em tempo real

O ensaio de expressão gênica em tempo real (RT-qPCR) foi utilizado para observar as alterações relativas da expressão de mRNA de genes relacionados com vias moleculares de morte celular (*BBC3*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*), estresse de retículo (*ERN1*), danos no DNA (*GADD45A* e *H2AX*), regulação do ciclo celular (*CDKN1A*, *NFKB1*, *MYC* e *TP53*) e autofagia (*BECN1* e *SQSTM1*) em esferoides de células HT-29 tratadas com 83,54 μ M (IC_{50}) de zerumbone. *GAPDH* e *ACTB* foram utilizados como genes de referência.

Após 24 horas, foram coletados 10 esferoides por tratamento em três repetições experimentais, que foram lavados com PBS e tripsinizados para que a houvesse a dissociação das células. Em seguida, o RNA total foi extraído com o MiniKit RNeasy® (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A pureza e a quantificação do RNA total foram observadas em espectrofotômetro BioDrop μ Lite, baseada na razão das absorvâncias (A_{260}/A_{280}) e validadas apenas as amostras com razão entre 1,9 e 2. A verificação da integridade do material foi realizada em gel

de agarose 1,0%. A síntese de cDNA foi realizada em termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD), sendo duas reações/tratamento/replicata, cada uma contendo 500ng de RNA total diluído em 12,4µL de água DEPC, 1µL de oligo dT (20 pm/mL, Invitrogen, Cat. Nº: 18418012) e 2µL de dNTPs (10mM, Invitrogen, Cat. Nº: 10297018), sendo mantidas a 60°C por 15 minutos. Em seguida, 0,1µL de RNase OUT (Invitrogen, Cat. Nº: 10777019), 4µL de tampão M-MLV-RT 5x (Invitrogen, Cat. Nº: Y02321) e 0,5 µL de M-MLV-RT (Invitrogen, Cat. Nº: 28025-013) foram adicionadas nos tubos de reação e as amostras mantidas a 37°C por 2 minutos, 50°C por 45 minutos e 70°C por 15 minutos.

Para a realização da PCR em tempo real foi utilizado o termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD) em uma programação de 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Cada reação de RT-qPCR teve 11µL de volume final, contendo 5µL de cDNA (1:10), 0,5µL de cada primer iniciador (forward e reverse) e 5µL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix 2x (BIO-RAD). A curva de melting foi analisada ao final da reação de 50 °C a 90 °C, a cada 0,5 °C/20". Os valores de Cts foram utilizados para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados numéricos foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade. Dados paramétricos dos ensaios de citotoxicidade foram submetidos à Análise de Variância (one-way ANOVA de múltiplas comparações) e teste post-hoc Dunnett. Os dados paramétricos dos ensaios de migração, apoptose e ciclo celular foram submetidos ao teste t não pareado. Para o ensaio de volume, os dados foram submetidos à Análise de Variância (two-way ANOVA de medida repetidas) e teste post-hoc Tukey de múltiplas comparações. Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com) e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, com nível de significância de 5%. Para a análise de expressão gênica relativa, foi utilizado o método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* inserido no programa *Rest* 2009 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002) e consideradas como significativas os valores com nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$) em relação ao controle e fold-change ≥ 2 e ≤ -2 .

3 RESULTADOS

3.1 CITOTOXICIDADE E MIGRAÇÃO CELULAR NO MODELO 2D

Após 24 horas de tratamento foi possível observar que todas as concentrações de zerumbone testadas (30, 40, 50, 60 e 80 μ M) foram citotóxicas para a linhagem celular HT-29 (Figura 1A), diminuindo significativamente ($p \leq 0,05$) a porcentagem de células viáveis em relação ao controle de veículo de maneira dose-dependente (Figura 1B). A partir das concentrações testadas, o IC_{50} calculado para o zerumbone foi de 83,54 μ M, que foi a concentração utilizada nos experimentos subsequentes.

No ensaio de cicatrização de feridas foi observado (Figura 1C1) que a concentração de zerumbone testada (IC_{50} : 83,54 μ M) inibiu a migração celular diminuindo significativamente ($p \leq 0,05$) a área (μm^2) da ferida nos tempos de 24 (Controle: 756238 \pm 81115; Tratado: 967287 \pm 94340), 48 (Controle: 641747 \pm 106981; Tratado: 972463 \pm 86503) e 72 horas (Controle: 517542 \pm 54540; Tratado: 984699 \pm 101933).

Os dados de largura da ferida (μm) seguiram o mesmo padrão observado na área da ferida, mostrando que zerumbone é capaz de inibir a migração de células. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas a largura da ferida diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) no controle em comparação com o tratado com zerumbone (Figura 1C2), o que também pôde ser visualizado nas imagens de microscopia (Figura 1C3).

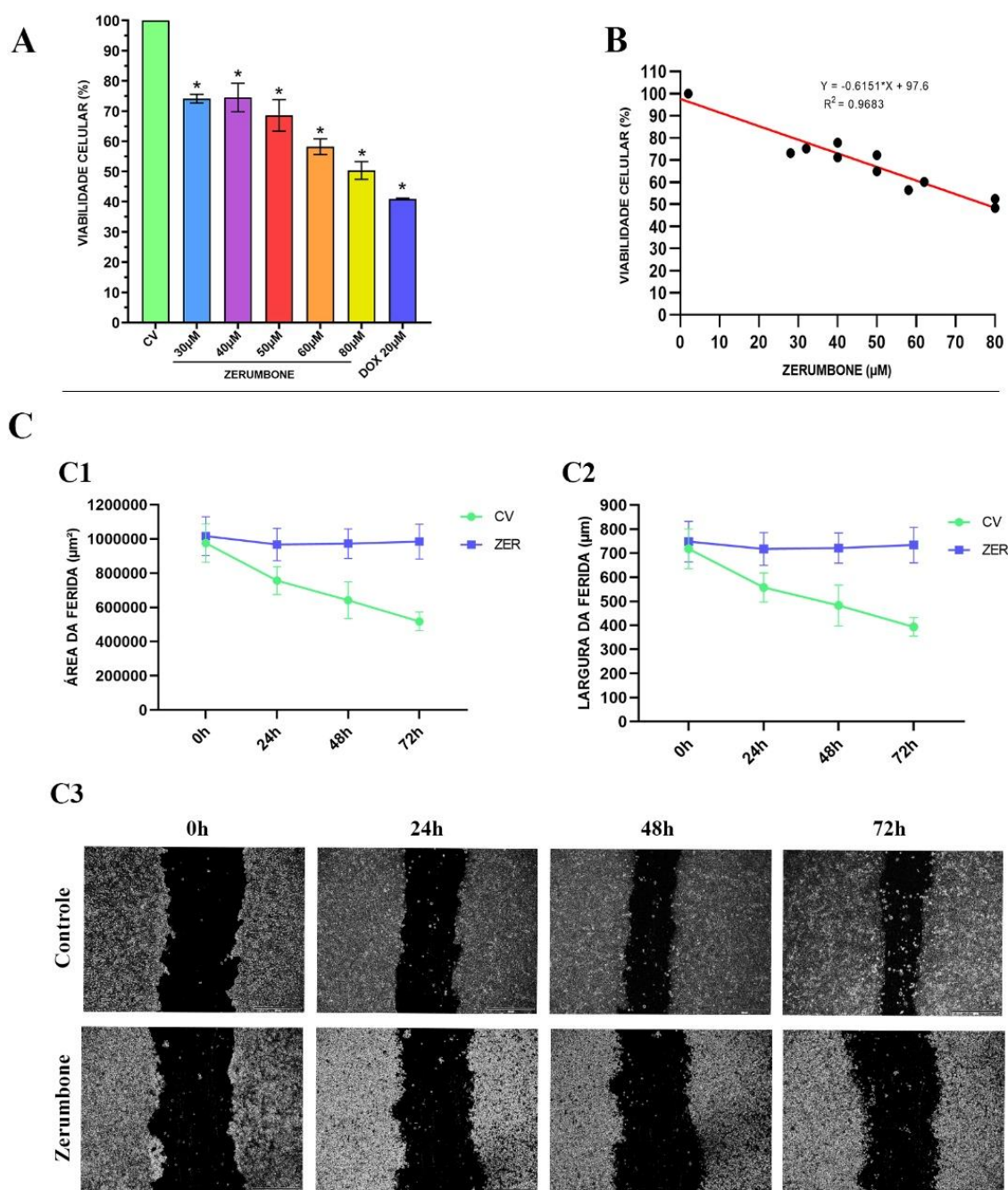


Figura 1 - Resultado do ensaio de viabilidade celular com o corante resazurina e de migração celular pelo ensaio de cicatrização de feridas em células HT-29 tratadas com zerumbone. **(A)** Média percentual da viabilidade celular na linhagem tumoral HT-29 obtidas após 24 horas de tratamentos com o composto zerumbone (30, 40, 50, 60 e 80 µM), controle de veículo DMSO 0,41% (CV) e o controle positivo doxorrubicina 20 µM (DOX). **(B)** Relação linear entre a viabilidade celular e a concentração de zerumbone ($Y = -0.6151 \cdot X + 97.6$ e $R^2 = 0.9683$). **(C1)** Área da ferida expressa em µm² após o tratamento com zerumbone (83,54 µM) e controle de veículo DMSO 0,41% (CV) por 24, 48 e 72 horas. **(C2)** Largura da ferida expressa em µm após o tratamento com zerumbone (83,54 µM) e controle de veículo DMSO 0,41% (CV) por 24, 48 e 72 horas. **(C3)** Células fotografadas em microscópio de luz imediatamente após a realização da ferida (0h) e após 24, 48 e 72 horas de incubação com zerumbone 83,54 µM e Controle (DMSO 0,41%), aumento de 100x. (*) representa os valores com nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$). Valores expressos em média ± desvio padrão.

3.2 ENSAIO DE VOLUME DOS ESFEROIDES

A partir de 24 horas observou-se que o tratamento com zerumbone ocasionou qualitativamente o aumento da zona necrótica em esferoides homotípicos de células HT-29 (Figura 2A). Em contraste com os esferoides tratados com zerumbone, os esferoides do grupo controle apresentavam a borda e formado bem definidos, seguindo o padrão de zonas dos esferoides. Somado a isso, a marcação com os corantes fluorescentes (Figura 2B) evidenciou núcleos não picnóticos (Hoechst33342) e intensa marcação de atividade mitocondrial (Rhodamine123) nos esferoides do controle, ao contrário do observado nos esferoides tratados com zerumbone.

Nos dados quantitativos (Figura 3) foi observado no controle um aumento significativo do volume (mm^3) de 25,04% ($0,1292 \pm 0,0068$), 47,64% ($0,1526 \pm 0,0080$) e 59,09% ($0,1644 \pm 0,0048$), nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, em relação ao volume antes do tratamento ($0,1033 \pm 0,0040$) (Figura 3A1). Nos esferoides tratados com zerumbone também houve um aumento significativo no volume de 21,25% ($0,1294 \pm 0,0018$), 45,52% ($0,1553 \pm 0,0114$) e 112,28% ($0,2265 \pm 0,0110$) nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, em relação ao volume antes do tratamento ($0,1067 \pm 0,0042$).

Quando comparamos os volumes médios (mm^3) dos esferoides entre os tratamentos (Figura 3A2), no tempo de 24h o volume médio dos esferoides controle de veículo e do tratado com zerumbone foram iguais entre si e maiores que o volume dos esferoides tratados com doxorrubicina. Entre 48h e 72h não houve aumento significativo nos esferoides controles, sendo que ambos os volumes foram estatisticamente iguais ao volume de 48 horas dos esferoides tratados com zerumbone. Entretanto, no tempo de 72h os esferoides tratados com zerumbone tinham um volume significativamente maior que os esferoides controles dos tempos de 72h e de 48h (ambos tinham volumes estatisticamente iguais).

Na Figura 3B é possível ver um esferoide do grupo tratado (Figura 3B1) e do grupo controle (Figura 3B2) ao final das 72h e após 24h da transferência para uma placa aderente. É possível visualizar que os esferoides controles continuam íntegros quando são transferidos para uma nova placa, enquanto os esferoides tratados com zerumbone se desintegraram, inviabilizando a mensuração da sua capacidade de recuperação.

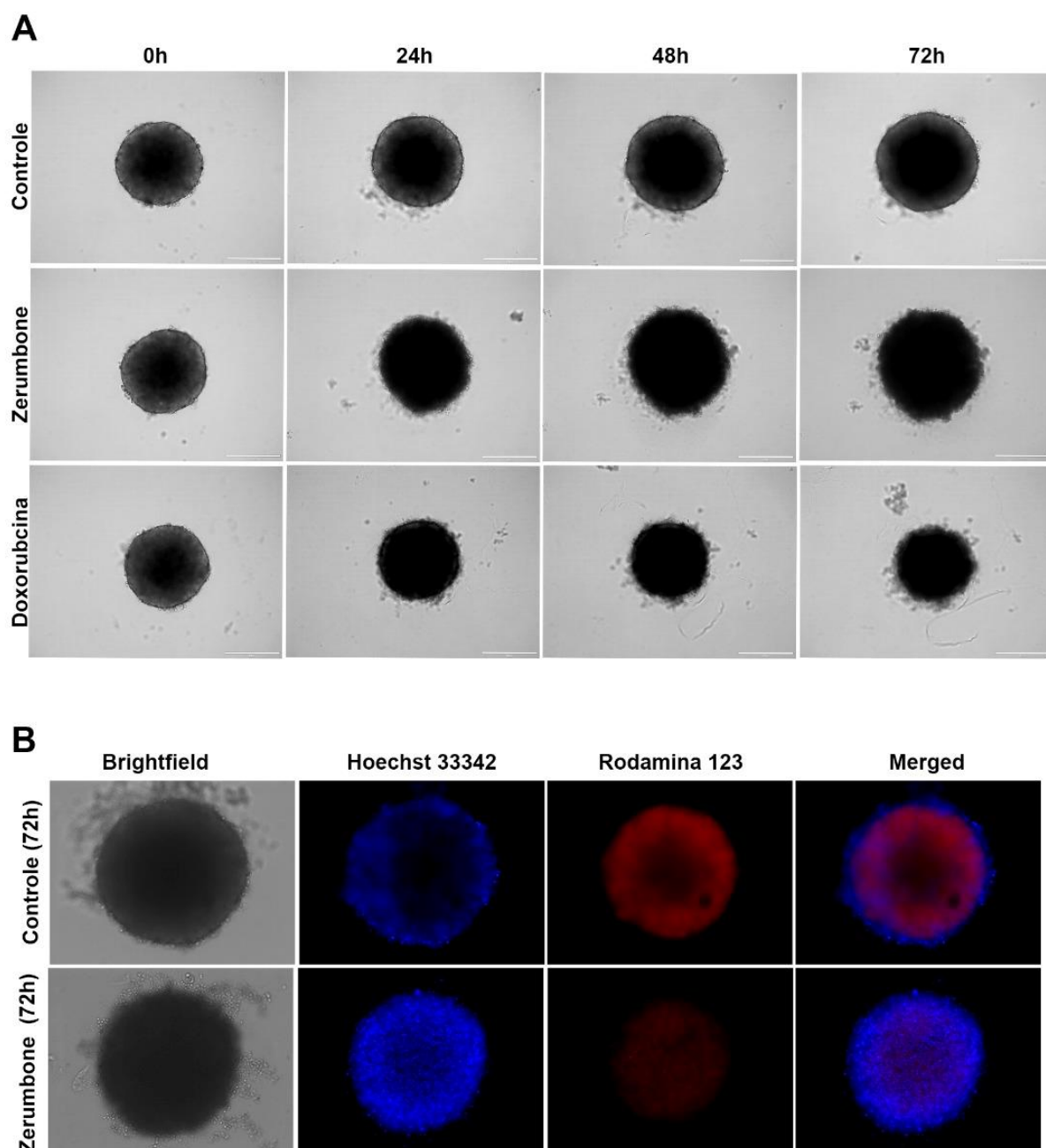


Figura 11 – Imagem obtida por microscópio de luz invertido de esferoides tumorais de células HT-29 após o tratamento com zerumbone. **(A)** Esferoides controle (DMSO 0,41%), doxorubicina (Controle positivo 20 μ M) e zerumbone (83,54 μ M) após 24, 48 e 72 horas de tratamento, aumento de 100x. **(B)** Esferoides controle (DMSO 0,41%) e tratados com Zerumbone (83,54 μ M) após 72 horas de tratamento evidenciando a marcação com corantes fluorescentes Rodamina123 (vermelho) e Hoechst33342 (azul), aumento de 100x.

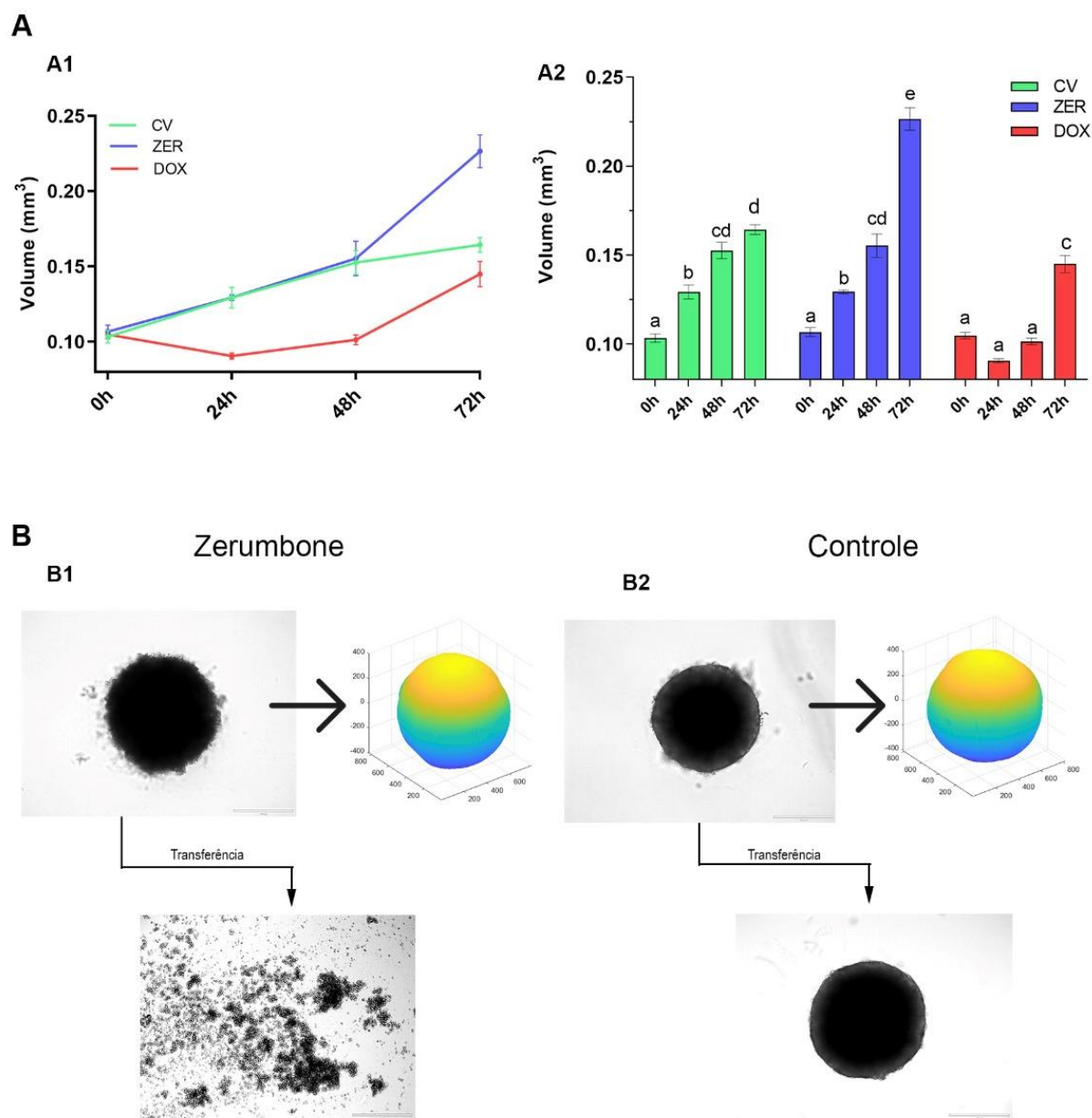


Figura 12 – Resultado da avaliação de volume e capacidade de recuperação de esferoides tumorais de células HT-29 tratadas com zerumbone **(A1)** Curva do aumento do volume médio esferoidal nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos com 83,54 μ M zerumbone (ZER), controle DMSO 0,41% (CV), controle positivo 20 μ M de doxorubicina (DOX). **(A2)** Resultado da análise de Variância (two-way ANOVA de medida repetidas) e teste post-hoc Tukey de múltiplas comparações dos volumes médios dos esferoides após o tratamento, sendo que as médias seguidas de uma letra comum não diferem significativamente considerando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) **(B)** Imagem de microscopia de luz dos esferoides após 72 horas de tratamento com zerumbone 83,54 μ M (B1) e controle DMSO 0,41% (B2) acompanhada da renderização gráfica do volume dos esferoides (à direita) e da imagem de microscopia dos esferoides após a transferência para uma nova placa de superfície aderente depois de 72 horas de tratamento (abaixo), aumento de 100x.

3.3 ENSAIO DE APOPTOSE E CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise de morte celular por citometria de fluxo (Figura 4A1) demonstrou que em 24h houve uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) na porcentagem de células vivas nos esferoides tratados com zerumbone ($57,73 \pm 1,069$) em comparação com o controle ($73,97 \pm 2,919$). Foi possível observar também que o tratamento com zerumbone aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas ($39,17 \pm 1,704$) em comparação com o controle ($22,43 \pm 2,369$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de células mortas (necróticas) entre os dois grupos, zerumbone ($3,13 \pm 1,518$) e controle ($0,70 \pm 0,100$).

No tempo de 72h (Figura 4A2) foi possível observar que o tratamento com zerumbone aumentou significativamente a porcentagem de células apoptóticas ($51,27 \pm 2,532$) em comparação com o controle ($27,90 \pm 0,793$). Além disso, em 72h houve um aumento significativo na porcentagem de células mortas (necróticas) nos tratados com zerumbone ($5,20 \pm 0,200$) em relação aos esferoides controle ($2,70 \pm 0,264$).

Em relação ao ciclo celular (Figura 4B), a análise de conteúdo de DNA mostrou que tanto em 24h (Figura 4B1), quanto em 72h (Figura 4B2) de tratamento, zerumbone aumentou significativamente a porcentagem de células na fase G1 ($77,37 \pm 0,472$ e $83,17 \pm 1,258$), respectivamente, em relação ao controle ($69,30 \pm 1,908$ e $74,77 \pm 1,002$). Já na fase S, de síntese de DNA, após 24h e 72h o tratamento com zerumbone diminuiu significativamente a porcentagem de células nessa fase ($5,100 \pm 0,755$ e $5,100 \pm 0,655$) quando comparado ao controle ($7,133 \pm 0,251$ e $7,600 \pm 0,624$), respectivamente. Além disso, uma redução significativa também foi observada nas fases G2/M nos tratados por 24h e 72h ($17,17 \pm 0,404$ e $10,97 \pm 1,617$) em relação ao controle ($23,30 \pm 1,735$ e $16,97 \pm 1,305$), respectivamente.

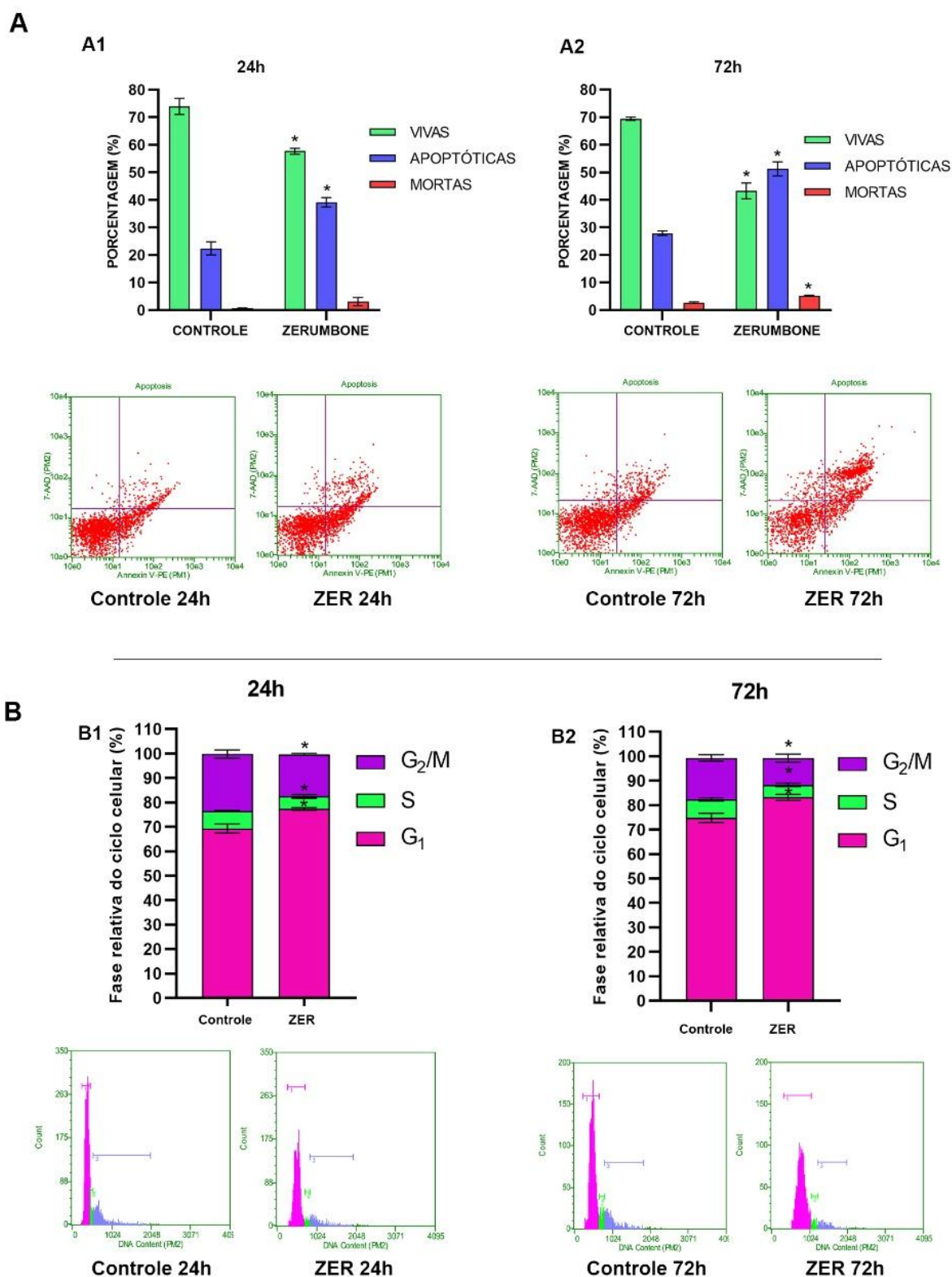


Figura 13 – Resultado da análise de apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo em esferoides de células HT-29. **(A)** Percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 24 (A1) e 72 (A2) horas de tratamento com 83,54 μ M de zerumbone (ZER) e controle (DMSO 0,41%). As células foram marcadas com o kit PE Annexin Apoptosis Detection e analisadas em citometria de fluxo. **(B)** Média percentual relativa de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24 (B1) e 72 (B2) horas de tratamento com 83,54 μ M de zerumbone (ZER) e controle (DMSO 0,41%). Conteúdo de DNA foi analisado por meio de marcação com iodeto de propídio em citometria de fluxo. (*) representa os valores com nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$), em relação ao controle.

3.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE MRNA EM ESFEROIDES

Na análise de expressão gênica relativa por RT-qPCR, foi observado uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) de mRNA dos genes *BBC3* (3,2x), *TP53* (4,2x), *ERN1* (2,1x), *GADD45A* (2,2x), *CDKN1A* (35,7x), *BECN1* (2,2x), *NFKB1* (2,4x) e *SQSTM1* (5,9x) e aumento significativo ($p \leq 0,05$) no gene *MYC* (2,2x) após 24h de tratamento com 83,54 μ M de zerumbone (Figura 5). Os genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* e *H2AX* não tiveram expressão de mRNA alterada.

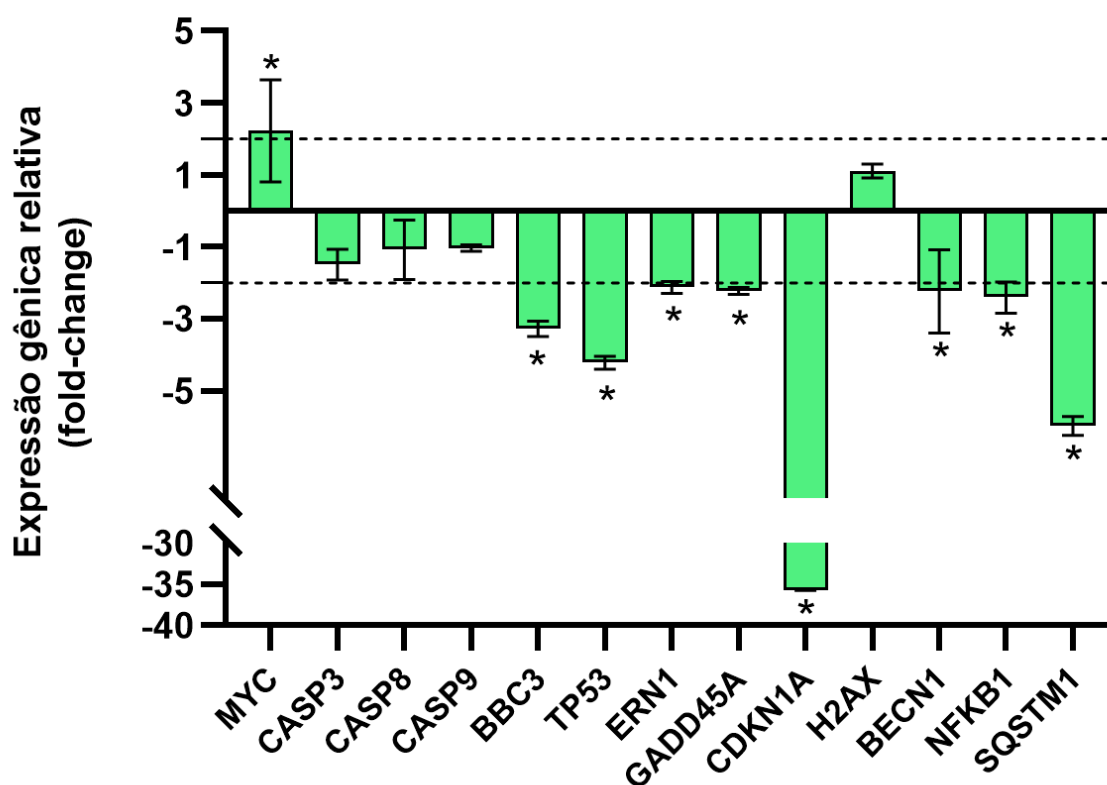


Figura 14 – Resultado da análise de expressão gênica relativa de mRNA obtida por RT-qPCR em esferoides de células HT-29 após o tratamento com zerumbone. (*) representa os valores com nível de significância menor que 5% (p -valor $\leq 0,05$) em relação ao controle pelo *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* e fold-change ≥ 2 e ≤ -2 .

4 DISCUSSÃO

A utilização de fitoquímicos é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos contra o câncer colorretal (MUPPALA, 2020). Zerumbone, uma molécula isolada de plantas da família Zingiberaceae (HAQUE *et al.*, 2017; PARK; PARK; KIM, 2015; SINGH *et al.*, 2019), é um fitoquímico que têm atraído

bastante atenção devido a sua gama de propriedades farmacológicas, entre elas sua atividade anticâncer (GIRISA *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2019). Estudos tem relatado que esse composto pode atuar em diversas vias moleculares, diminuindo a geração de radicais livres, a produção de proteínas pró-inflamatórias e suprimindo a proliferação, migração e a angiogênese (MURAKAMI *et al.*, 2002; PARK; PARK; KIM, 2015; SHAMOTO *et al.*, 2014). Ele se mostrou capaz de interromper o ciclo celular (ABDELWAHAB *et al.*, 2012), diminuir a invasão celular e metástase (KANG *et al.*, 2016; LV; ZHANG; HAN, 2018; DEGHAN *et al.*, 2021), além de atuar na reprogramação do metabolismo das células cancerosas (WANI *et al.*, 2018).

No presente trabalho, foi possível identificar que o tratamento com zerumbone por 24 horas foi citotóxico para células HT-29 de adenocarcinoma de cólon em cultura 2D, de maneira dose dependente, sendo que O IC₅₀ calculado foi de 83,54µM. Deorukhkar e colaboradores (2015) também verificaram que o fitoquímico zerumbone inibiu a proliferação das linhagens de células de câncer colorretal HCT116, HT29 e SW620 de uma maneira dose dependente após 7 horas de tratamento. Os autores observaram que as células HT-29 foram as mais resistentes ao tratamento com zerumbone, apresentando um IC₅₀ > 46µM.

Outro trabalho que verificou os efeitos inibitórios do zerumbone na proliferação de quatro linhagens celulares derivadas de adenocarcinomas de cólon humano (LS174T, LS180, COLO205 e COLO320DM) constatou que as concentrações de 13µM e 50µM inibiram a proliferação das células cancerosas após 72 horas de tratamento, sendo que a concentração de 13µM não teve qualquer efeito no crescimento de duas linhagens de fibroblastos normais (2F0-C25 e CCD-18) (MURAKAMI, *et al.*, 2002).

Segundo Murakami e colaboradores (2002), o efeito citotóxico do zerumbone em células de câncer de cólon, sem afetar a proliferação de células normais, se deve ao grupo carbonil α,β -insaturado presente na molécula. Esse achado corrobora com o modelo redox de proliferação celular proposto Hoffman, Spetner e Burke (2001). Segundo esses autores, a elevação do potencial redox acima de um limiar impede a fosforilação da proteína retinoblastoma (RB), que por sua vez impede a liberação de fatores de transcrição necessários para a progressão do ciclo celular. A menos que RB se torne fosforilada, uma célula em proliferação irá parar em meados da fase G1 do ciclo celular e então sofrer apoptose.

Após administração de zerumbone, o grupo carbonil α,β -insaturado presente na molécula parcialmente esgota a glutathiona intracelular (GSH) da célula cancerosa, aumentando assim o potencial redox, que por sua vez atenua a proliferação dessas células, mas não afeta as células normais, pois estas apresentam naturalmente um menor potencial redox (HOFFMAN; SPETNER; BURKE, 2002). Estudos recentes atestaram esse papel essencial do grupo carbonila α,β -insaturado presente no zerumbone para sua ação citotóxica (DEORUKHKAR *et al.*, 2015).

A metástase é a principal causa de morbidade e mortalidade por câncer, sendo responsável por cerca de 90% das mortes pela doença. Durante a metástase, as células metastáticas passam pelos processos de descolamento, migração, invasão e adesão. Portanto, estudar a migração celular e os fatores envolvidos fornece informações valiosas sobre o diagnóstico, prognóstico, tratamento e desenvolvimento de drogas anticâncer (GUAN, 2015; DEGHAN *et al.*, 2021).

No presente trabalho, através do ensaio de cicatrização de feridas em 2D verificou-se que a concentração de 83,54 μ M de zerumbone foi capaz de inibir de forma eficaz a migração de células cancerosas *in vitro*. A ferida que não foi tratada com zerumbone (controle de veículo) diminuiu significativamente sua área e largura em comparação com o grupo tratado com zerumbone, indicando que a droga inibiu a capacidade de fechamento da ferida. Dehghan e colaboradores (2021) também verificaram que em células de câncer de cólon o tratamento com 14 μ M para HCT-116 e 19 μ M de zerumbone para SW48 inibiu marcadamente a migração dessas células. A eficiência efetiva de diferentes concentrações em diferentes tipos celulares demonstra que há diferenças na sensibilidade dessas linhagens ao fitoquímico zerumbone.

Em nosso estudo a análise das imagens dos esferoides tridimensionais ao microscópio mostrou que a partir de 24 horas houve um aumento acentuado da zona necrótica, perda da borda bem definida e o desprendimento de células mortas que formaram um halo ao redor dos esferoides que foram tratados com zerumbone. Já no grupo controle, os esferoides continuaram com borda e formato bem definidos, mantendo suas zonas características. A marcação desses esferoides com corantes fluorescentes que indicava atividade mitocondrial mostrou-se menos intensa no grupo tratado com zerumbone, sendo que a marcação de DNA indicou a presença de maior quantidade de células com conteúdo de DNA mais condensado (pontos azuis

picnóticos) nesses esferoides em comparação com o controle. Isso demonstra que o tratamento com zerumbone está induzindo morte celular.

Em relação ao volume, não houve diferença estatisticamente significativa no dos esferoides controle em relação aos tratados com zerumbone nos tempos de 24 e 48 horas. Já em 72 horas, os esferoides tratados apresentaram volume maior que os controle. Entretanto, quando esses esferoides eram transferidos para uma nova placa, os esferoides controle permaneciam íntegros, enquanto os esferoides tratados se desintegravam, perdendo completamente o formato. Esses achados, juntamente com as imagens de fluorescência indicam que o tratamento com zerumbone afetou a coesão das células do esferoide.

Até o momento não foi encontrado um artigo que investigasse os efeitos do zerumbone em cultura 3D. Entretanto, tratamentos com outras drogas podem assim como o zerumbone afetar a coesão das células do esferoide, gerando uma camada progressiva de células difusas, o que pode induzir uma superestimação do volume do esferoide (VIRGONE-CARLOTTA *et al.*, 2017; DE SIMONE *et al.*, 2018; BRÜNINGK *et al.*, 2020). Portanto, o aumento do volume médio dos esferoides observado no tratamento com zerumbone em relação ao controle de veículo pode ser um efeito da desagregação causada pela droga, que faz com que haja a perda da coesão entre as células dos esferoides e sua desintegração. Na literatura já foi relatado que a coesão tecidual influencia a resistência ao tratamento medicamentoso em esferoides de células HT-29 (GREEN *et al.*, 2004) e que a reoxigenação e a proliferação ativa de populações de células previamente quiescentes pode as sensibilizar a outros tratamentos combinados (BRÜNINGK *et al.*, 2020). Portanto este achado é muito relevante e carece de investigações mais aprofundadas.

Já a análise de morte celular por citometria de fluxo utilizando o modelo de esferoides 3D mostrou que tanto em 24 horas, quanto em 72 horas, houve um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas e diminuição na porcentagem de células vivas nos esferoides de células HT-29 tratados com zerumbone. Sithara e colaboradores (2018) observaram que o tratamento com zerumbone suprimiu o crescimento celular e aumentou a apoptose em células SW480 de câncer colorretal cultivadas em monocamada (SITHARA *et al.*, 2018). Outro estudo realizado com linhagens de células HCT116, HT29 e SW620 em monocamada mostrou que o zerumbone leva a parada do ciclo celular induzida por radiação na fase G2/M e aumenta tanto o dano ao DNA induzido por radiação, quanto a apoptose.

Entretanto, a análise de lisados celulares em diferentes tempos (0, 6, 12, 24 e 48 horas) não revelou alteração da expressão de proteínas apoptóticas (caspase 3, caspase 9 e PARP) (DEORUKHKAR *et al.*, 2015).

O ciclo celular desempenha um papel importante para a manutenção das células, para o controle da sua proliferação e desempenho de suas funções (LAY; KARSANI; MALEK, 2014). Em nosso estudo, a análise do ciclo celular por marcação de DNA em citômetro de fluxo nos esferoides tumorais de células HT-29, revelou que tanto em 24 horas, quanto em 72 horas de tratamento com zerumbone, houve parada do ciclo celular na fase G1 e diminuição da porcentagem relativa de células nas fases S e G2/M. A parada do ciclo celular em G1 em células HT-29 cultivadas em monocamada tratadas com zerumbone foi observada anteriormente por Kirana e colaboradores (2003). Contudo, outros estudos verificaram que o tratamento com zerumbone resultou na parada do ciclo celular na fase G2/M, porém todos esses trabalhos utilizaram cultura de células em monocamada, e não o modelo de cultura 3D de esferoides (SITHARA *et al.*, 2018; DEORUKHKAR *et al.*, 2015).

No tocante a análise de expressão gênica relativa, foram identificadas alterações na expressão de RNAs mensageiros de nove genes nos esferoides de células HT-29 tratadas com zerumbone. Os genes *BBC3*, *ERN1*, *GADD45A*, *CDKN1A*, *NFKB1*, *TP53*, *SQSTM1* e *BECN1* apresentaram diminuição da expressão, enquanto *MYC* foi o único a apresentar aumento. Os genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* e *H2AX* não tiveram expressão de mRNA alterada.

O gene *CDKN1A* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) codifica a proteína p21, caracterizada por sua atuação como reguladora de múltiplas vias relacionadas a diversas funções celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, crescimento celular, resposta ao dano no DNA, diferenciação e renovação celular (XIAO *et al.*, 2020). A localização subcelular da p21 influencia sua ampla gama de atividades, no núcleo a p21 é responsável por ativar as vias supressoras de tumor, ao passo que no citoplasma induz sinais oncogênicos (ROMANOV; RUDOLPH, 2016). Além disso, foram encontradas evidências de que a superexpressão nuclear de p21 pode ter efeitos oncogênicos em células mutadas para p53, como é o caso das células HT-29 (GALANOS *et al.*, 2016), portanto essa inibição da expressão de mRNA que codifica a proteína p21 após o tratamento com zerumbone é um achado importante, visto que regular sua atividade se mostra uma estratégia promissora (ABBAS; DUTTA, 2009).

TP53 (*tumor protein p53*) é um gene supressor de tumor que codifica a proteína p53, que participa da regulação dos pontos de verificação do ciclo celular, do reparo do DNA e apoptose (TOKINO; NAKAMURA, 2000; HUSZNO; GRZYBOWSKA, 2018). A deficiência ou mutação no gene supressor de tumor *TP53* é frequentemente encontrada em cânceres humanos e pode contribuir para a progressão da doença e a resistência à quimioterapia (SUI, *et al.*, 2014), sendo que a linhagem de células HT-29 é um modelo de células mutadas que superexpressam *TP53* (RAJEDADRAM *et al.*, 2021). No trabalho de Bossi e colaboradores (2006), eles descobriram que a depleção do p53 mutante reduz a proliferação celular, a tumorigenicidade *in vitro* e *in vivo* e a resistência a drogas anticâncer. Portanto, essa diminuição encontrada na expressão do mRNA de p53 após o tratamento com zerumbone é um dado muito relevante.

O gene do sequestrador 1 (*SQSTM1*) codifica p62, uma proteína que atua como um receptor para a degradação de proteínas ubiquitinadas por vias autofágicas ou proteassomais (PHILIPPE, 2020). A autofagia é uma via de degradação celular de eliminação de materiais citoplasmáticos, organelas danificadas e proteínas agregadas nos lisossomas. Em células tumorais com defeitos na apoptose, foi notado que a autofagia contribui para uma sobrevivência prolongada. Além disso, defeitos nos processos de autofagia foram relacionadas como tendo um papel crítico na tumorigênese, sendo que novas estratégias de tratamento do câncer colorretal devem se beneficiar da interferência em p62 e da inibição da autofagia (REN *et al.*, 2014). Ren e colaboradores (2014) demonstraram que a expressão de p62 é regulada positivamente em tecidos de câncer colorretal, e que o *knock down* da expressão de p62 mostrou efeitos inibitórios significativos não apenas na ativação autofágica, mas também no crescimento de tumor *in vitro* e no modelo de tumor de xenoinxerto.

Além de *SQSTM1*, *BECN1* (*Beclin-1*) foi outro gene relacionado ao processo de autofagia que teve sua expressão diminuída após o tratamento com zerumbone. Muitas células cancerosas exibem altas taxas basais de autofagia, o que lhes proporciona resistência ao estresse metabólico, tornando a autofagia um alvo de intervenção anticâncer (BHAT *et al.*, 2018). Park e colaboradores (2013) demonstraram que a expressão das proteínas reguladoras da autofagia, Beclin-1 e p62, estavam aumentadas no citoplasma das células tumorais em relação às células epiteliais normais do cólon, e que a superexpressão de Beclin-1 estava associada à redução da sobrevivência em pacientes com câncer de cólon.

O fator nuclear κ B (NF- κ B) desempenha um papel importante na carcinogênese, bem como na regulação das respostas imune e inflamatória, pois induz a expressão de diversos genes-alvo que promovem a proliferação celular, regulam a apoptose, facilitam a angiogênese e estimulam a invasão e metástase (LEE *et al.*, 2007; HASSANZADEH, 2011). No trabalho de Hwang e colaboradores (2019), eles verificaram que camundongos infectados com *Bacteroides fragilis* enterotoxigênico tratados com essa droga mostraram diminuição da sinalização de NF- κ B no cólon. Além deles, Takada, Murakami e Aggarwal (2005) observaram que zerumbone inibe a expressão de NF- κ B induzida por carcinógenos e que essa inibição pode servir de ferramenta para a prevenção e tratamento do câncer.

O componente 3 de ligação a Bcl-2 (*BBC3*), também conhecido como *PUMA*, é um mediador crítico da apoptose em resposta ao supressor de tumor p53 e outros estímulos apoptóticos, como expressão desregulada de oncogenes, toxinas e deficiência de fatores de crescimento (HIKISZ; KILIAŃSKA, 2012). Já o gene *GADD45A* (*Growth arrest and DNA damage-induced 45 A*) pertence à uma família de genes envolvidos no reparo do DNA, estabilidade genômica e interrupção do ciclo celular como em resposta à estresses fisiológicos ou ambientais (SALVADOR; BROWN-CLAY; FORNACE, 2013). No presente trabalho, o tratamento com zerumbone em esferoides 3D diminuiu a expressão de mRNA desses dois genes.

Tapeh e colaboradores (2021) verificaram que o tratamento com zerumbone causou estabilização de p53 e indução de *PUMA* em células de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231, no entanto os autores utilizaram o modelo de cultivo em monocamada, além disso, segundo eles essas proteínas foram dispensáveis para parada do ciclo celular e apoptose induzida pela droga. No tocante ao *GADD45A*, um estudo mostrou que sua supressão sensibilizou células de melanoma e aumentou o dano no DNA induzido por cisplatina (LIU *et al.*, 2018), enquanto seu *knockdown* aumentou a parada do crescimento celular e a morte celular induzida por temozolomida, mesmo em células de glioblastoma resistentes a esse quimioterápico (WANG *et al.*, 2017).

O gene *MYC* (*MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*) foi um dos primeiros oncogenes descobertos, ele codifica um fator de transcrição pleiotrópico que participa de muitos processos celulares, incluindo proliferação celular, apoptose, diferenciação, metabolismo e estabilidade do genoma (MEYER; PENN, 2008; PROCHOWNIK; WANG, 2022). No presente trabalho, o oncogene *MYC* foi o único

gene testado que teve sua expressão aumentada após o tratamento com zerumbone. MYC é um potente impulsionador de muitos cânceres humanos e pode regular inúmeras atividades biológicas que contribuem para a tumorigênese (LOURENCO *et al.*, 2021), todavia, estudos sugerem que as células que superexpressam MYC, são vulneráveis a perturbações metabólicas que fornecem novos caminhos potenciais para a terapia do câncer (GOGA *et al.*, 2007; FERRAO *et al.*, 2012; QING *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2014; STINE *et al.*, 2015; HSIEH; DANG, 2016).

Diante do exposto, podemos apontar que o fitoquímico zerumbone atua por meio de diversos mecanismos moleculares que levam a diminuição da proliferação e migração celular, modulação da expressão de oncogenes e genes supressores tumorais, indução da parada do ciclo celular e da apoptose. Em conjunto, esses achados demonstram, que o zerumbone tem se mostrando um agente anticâncer muito promissor. Como este é o primeiro estudo a utilizar a cultura de células em 3D para testar essa droga, novos experimentos e investigações são importantes para esclarecer ainda mais os conhecimentos sobre a ação dessa droga, já que os resultados até o momento se mostraram muito encorajadores.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi possível concluir que zerumbone é um agente anticâncer promissor, que foi citotóxico e inibiu a migração de células HT-29, causando alterações na morfologia e no volume dos esferoides homotípicos dessa linhagem celular. Além disso, evidenciamos que zerumbone induz morte por apoptose e parada do ciclo celular na fase G1 em esferoides. Demonstramos também que nesse modelo zerumbone causa alterações na expressão de mRNA de genes envolvidos em vias celulares relacionadas aos processos de morte celular, estresse de retículo, dano ao DNA, regulação do ciclo celular e autofagia. Esses resultados tomados em conjunto indicam que zerumbone é um candidato em potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o arsenal de medicamentos contra o câncer, por sua atuação em múltiplas vias de sinalização celular, sendo que estudos como esse que o utilizam o sistema de cultura 3D são ferramentas importantes para este fim, pois geram resultados a partir de um sistema mais complexo, subsidiando estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009.

ABDELWAHAB, S. I. *et al.* Zerumbone inhibits interleukin-6 and induces apoptosis and cell cycle arrest in ovarian and cervical cancer cells. **International immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 594-602, 2012.

BHAT, P. *et al.* Modulating autophagy in cancer therapy: advancements and challenges for cancer cell death sensitization. **Biochemical pharmacology**, v. 147, p. 170-182, 2018.

BOSSI, G. *et al.* Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 304-309, 2006.

BOULOS, J. C. *et al.* Shikonin derivatives for cancer prevention and therapy. **Cancer letters**, v. 459, p. 248-267, 2019.

BRACCI, L. *et al.* Dietary Polyphenols: Promising Adjuvants for Colorectal Cancer Therapies. **Cancers**, v. 13, n. 18, p. 4499, 2021.

BRÜNINGK, S. C. *et al.* 3D tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

CHOUDHARI, A. S. *et al.* Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, n. 1614, 2020.

DE SIMONE, U. *et al.* Human 3D cultures as models for evaluating magnetic nanoparticle CNS cytotoxicity after short-and repeated long-term exposure. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 1993, 2018.

DEGHAN, R. *et al.* The Combination of Zerumbone and 5-FU: A Significant Therapeutic Strategy in Sensitizing Colorectal Cancer Cells to Treatment. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

DEORUKHKAR, A. *et al.* Zerumbone increases oxidative stress in a thiol-dependent ROS-independent manner to increase DNA damage and sensitize colorectal cancer cells to radiation. **Cancer medicine**, v. 4, n. 2, p. 278-292, 2015.

DILLON, C. P.; GREEN, D. R. Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer. *In*: GREGORY, C. D. (ed.). **Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy: Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy**. Switzerland: Springer, 2016. v. 930, p. 1-23.

FERRAO, P. T. *et al.* Efficacy of CHK inhibitors as single agents in MYC-driven lymphoma cells. **Oncogene**, v. 31, n. 13, p. 1661-1672, 2012.

FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 309, 2009.

- GALANOS, P. *et al.* Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. **Nature cell biology**, v. 18, n. 7, p. 777-789, 2016.
- GARCIA-OLIVEIRA, P. *et al.* Status and challenges of plant-anticancer compounds in cancer treatment. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 2, p. 157, 2021.
- GILAZIEVA, Z. *et al.* Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine. **Cancers**, v. 12, n. 10, 2020.
- GIRISA, S. *et al.* Potential of Zerumbone as an Anti-Cancer Agent. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 1-20, 2019.
- GOGA, A. *et al.* Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. **Nature medicine**, v. 13, n. 7, p. 820-827, 2007.
- GREEN, S. K. *et al.* Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 149-159, 2004.
- GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta pharmaceutica sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402-418, 2015.
- HAQUE, A.; BRAZEAU, D.; AMIN, A. R. Perspectives on natural compounds in chemoprevention and treatment of cancer: an update with new promising compounds. **European Journal of Cancer**, v. 149, p. 165-183, 2021.
- HAQUE, M. A. *et al.* Exploring the immunomodulatory and anticancer properties of zerumbone. **Food & function**, v. 8, n. 10, p. 3410–3431, 2017.
- HASSANZADEH, P. Colorectal cancer and NF- κ B signaling pathway. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, v. 4, n. 3, p. 127, 2011.
- HOFFMAN, A.; SPETNER, L. M.; BURKE, M. Cessation of cell proliferation by adjustment of cell redox potential. **Journal of Theoretical Biology**, v. 211, n. 4, p. 403-407, 2001.
- HOFFMAN, A.; SPETNER, L. M.; BURKE, M. Redox-regulated mechanism may account for zerumbone's ability to suppress cancer-cell proliferation. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 11, p. 1961-1962, 2002.
- HSIEH, A. L.; DANG, C. V. MYC, metabolic synthetic lethality, and cancer. **Metabolism in Cancer**, p. 73-91, 2016.
- HUANG, S.; XING, Y.; LIU, Y. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 α in metabolic regulation and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 49, p. 18726-18741, 2019.
- HUANG, X.-M. *et al.* Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, 2019.

- HUSZNO, J.; GRZYBOWSKA, E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. **Oncology letters**, v. 16, n. 1, p. 34-40, 2018.
- HWANG, S. *et al.* Zerumbone suppresses enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection-induced colonic inflammation through inhibition of NF- κ B. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4560, 2019.
- JALILI-NIK, M. *et al.* Zerumbone promotes cytotoxicity in human malignant glioblastoma cells through reactive oxygen species (ROS) generation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020.
- JENSEN, C.; TENG, Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 33, 2020.
- JUSTUS, Calvin R. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 88, 2014.
- KANG, C. G. *et al.* Zerumbone Suppresses Osteopontin-Induced Cell Invasion Through Inhibiting the FAK/AKT/ROCK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. **Journal of natural products**, v. 79, n. 1, p. 156-60, 2016.
- KANG, J. *et al.* Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2014.
- KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v.16, p. 713–732, 2019.
- KHANNA, S. *et al.* Multicellular Tumor Spheroids as *In Vitro* Models for Studying Tumor Responses to Anticancer Therapies. In: VERMA, A.S.; SINGH, A. (ed.). **Animal Biotechnology**. 2. ed. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2020. p. 251–268.
- LANGHANS, S.A. Three-Dimensional *in Vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. **Front Pharmacol**, v. 9, n. 6, 2018.
- LAY, M. M.; KARSANI, S. A.; MALEK, S. N. A. 1-(2, 6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(4-hydroxyphenyl) ethanone-induced cell cycle arrest in G1/G0 in ht-29 cells human colon adenocarcinoma cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 468-483, 2014.
- LE RESTE, P. J. *et al.* Local intracerebral inhibition of IRE1 by MKC8866 sensitizes glioblastoma to irradiation/chemotherapy in vivo. **Cancer Letters**, v. 494, p. 73-83, 2020.
- LEE, C. H. *et al.* NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy. **Biofactors**, v. 29, n. 1, p. 19-35, 2007.
- LIU, J. *et al.* Down-regulation of GADD45A enhances chemosensitivity in melanoma. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, 2004.

LOGUE, S. E. *et al.* Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

LOURENCO, C. *et al.* MYC protein interactors in gene transcription and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 9, p. 579-591, 2021.

LV, D. *et al.* Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. **Oncology letters**, v. 14, n. 6, p. 6999-7010, 2017.

LV, T.; ZHANG, W.; HAN, X. Zerumbone suppresses the potential of growth and metastasis in hepatoma HepG2 cells via the MAPK signaling pathway. **Oncol Lett.**, v. 15, n. 5, p. 7603-7610, 2018.

MÁRMOL, I. *et al.* Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 197, 2017.

MCQUADE, R. *et al.* Colorectal cancer chemotherapy: the evolution of treatment and new approaches. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 15, p. 1537-1557, 2017.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 976-990, 2008.

MING, J. *et al.* A novel chemical, STF-083010, reverses tamoxifen-related drug resistance in breast cancer by inhibiting IRE1/XBP1. **Oncotarget**, v. 6, n. 38, p. 40692, 2015.

MUPPALA, S. Phytochemicals Targeting Colorectal Cancer Growth and Metastasis. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 25, n. 2, 2020.

MURAKAMI, A. *et al.* Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the α , β -unsaturated carbonyl group is a prerequisite. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 795-802, 2002.

OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. Role of p53 in cell death and human cancers. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 994-1013, 2011.

PARK, J. M. *et al.* Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. **Cancer biology & therapy**, v. 14, n. 2, p. 100-107, 2013.

PARK, J.H.; PARK, G.M.; KIM, J.K. Zerumbone, Sesquiterpene Photochemical from Ginger, Inhibits Angiogenesis. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 19, n. 4, p. 335-340, 2015.

PASHIRZAD, M.; JOHNSTON, T. P.; SAHEBKAR, A. Therapeutic Effects of Polyphenols on the Treatment of Colorectal Cancer by Regulating Wnt β -Catenin Signaling Pathway. **Journal of Oncology**, 2021.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[©]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, 2002.

PHILIPPE, C. Linking amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. In: MARTIN, C. R.; PREEDY, V. R. (ed.). **Diagnosis and Management in Dementia**. Academic Press, 2020. p. 49-59.

PICCININI, F. AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 119, n. 1, p. 43-52, 2015.

PICCININI, F. *et al.* Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 118, n. 2, p. 95-106, 2015.

PRASANAN, R. *et al.* Key cell signaling pathways modulated by zerumbone: role in the prevention and treatment of cancer. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1268-1276, 2012.

PROCHOWNIK, E. V.; WANG, H. Normal and Neoplastic Growth Suppression by the Extended Myc Network. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 747, 2022.

QING, G. *et al.* ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. **Cancer cell**, v. 22, n. 5, p. 631-644, 2012.

RAHMAN, H. S. *et al.* Biomedical properties of a natural dietary plant metabolite, zerumbone, in cancer therapy and chemoprevention trials. **BioMed research international**, v. 2014, n. 920742, 2014.

RAJEDADRAM, A. *et al.* Hydroxychavicol, a polyphenol from Piper betle leaf extract, induces cell cycle arrest and apoptosis in TP53-resistant HT-29 colon cancer cells. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 22, n. 2, p. 112-122, 2021.

RAYMUNDO, D. P. *et al.* Pharmacological targeting of IRE1 in cancer. **Trends in Cancer**, v. 6, n. 12, p. 1018-1030, 2020.

REJHOVÁ, A. *et al.* Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. **European journal of medicinal chemistry**, v. 144, p. 582-594, 2018.

REN, F. *et al.* Knockdown of p62/sequestosome 1 attenuates autophagy and inhibits colorectal cancer cell growth. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 95-102, 2014.

ROMANOV, V. S.; RUDOLPH, K. L. p21 shapes cancer evolution. **Nature cell biology**, v. 18, n. 7, p. 722-724, 2016.

- SALVADOR, J. M.; BROWN-CLAY, J. D.; FORNACE, A. J. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. **Gadd45 stress sensor genes**, p. 1-19, 2013.
- SEIDLITZ, T.; STANGE, D. E. Gastrointestinal cancer organoids—applications in basic and translational cancer research. **Experimental & Molecular Medicine**, p. 1-12, 2021.
- SHAMOTO, T. *et al.* Zerumbone inhibits angiogenesis by blocking NF- κ B activity in pancreatic cancer. **Pancreas**, v. 43, n. 3, p. 396-404, 2014.
- SINGH, Y. P. *et al.* Potential application of zerumbone in the prevention and therapy of chronic human diseases. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 248-258, 2019.
- SITHARA, T. *et al.* Zerumbone, a Cyclic Sesquiterpene from Zingiber zerumbet Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Antimigratory Effects in SW480 Colorectal Cancer Cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 3, p. 602-612, 2018.
- STINE, Z. E. *et al.* MYC, metabolism, and cancer. **Cancer discovery**, v. 5, n. 10, p. 1024-1039, 2015.
- SUAREZ-ARNEDO, A. *et al.* An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. e0232565, 2020.
- SUI, X. *et al.* JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.
- SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, p. 1-41, 2021.
- TAKADA, Y.; MURAKAMI, A.; AGGARWAL, B. B. Zerumbone abolishes NF- κ B and I κ B α kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion. **Oncogene**, v. 24, n. 46, p. 6957-6969, 2005.
- TOKINO, T.; NAKAMURA, Y. The role of p53-target genes in human cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 33, n. 1, p. 1-6, 2000.
- VIRGONE-CARLOTTA, A. *et al.* In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids: Effects of 5-Fluorouracil. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0188100, 2017.
- WANG, H-H. *et al.* GADD45A plays a protective role against temozolomide treatment in glioblastoma cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.
- WANI, N. A. *et al.* Reprogramming of Glucose Metabolism by Zerumbone Suppresses Hepatocarcinogenesis. **Molecular cancer research: MCR**, v. 16, n. 2, p. 256-268, 2018.

WONG, K. E. *et al.* Curcumin nanoformulations for colorectal cancer: a review. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 152, 2019.

XIAO, B. D. *et al.* Multifaceted p21 in carcinogenesis, stemness of tumor and tumor therapy. **World journal of stem cells**, v. 12, n. 6, p. 481, 2020.

APÊNDICE

Apêndice A – Tabelas dos resultados

Tabela 1 – Média percentual da viabilidade celular na linhagem tumoral HT-29 obtida após 24 horas de tratamento com o composto zerumbone.

Tratamentos	Média (%) ± D.P.
DMSO 0,4%	100 ± 0
30µM	74,10 ± 1,457***
40µM	74,97 ± 4,709***
50µM	68,56 ± 5,204***
60µM	58,22 ± 2,595****
80µM	50,35 ± 2,920****
DOX 20µM	40,86 ± 0,2828****

(***) e (****) representam os valores com nível de significância menor que 0,1% (p-valor ≤ 0,001) e 0,01% (p-valor ≤ 0,0001) em relação ao controle, respectivamente, pelo teste Ordinary one-way ANOVA seguido de teste de Dunnett. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tabela 2 – Área da ferida após o tratamento com zerumbone em diferentes tempos.

Tratamentos	Área da ferida (µm ²) ± DP			
	Tempo após tratamento			
	0 h	24 h	48 h	72 h
DMSO	975787 ± 111796	756238 ± 81115*	641747 ± 106981**	517542 ± 54540***
ZER 83,54µM	1016138 ± 113729	0967287 ± 94340	972463 ± 86503	984699 ± 101933

(*), (**) e (***) representam os valores com nível de significância menor que 5% (p-valor ≤ 0,05), 1% (p-valor ≤ 0,01) e 0,1% (p-valor ≤ 0,001), respectivamente, em relação ao controle pelo teste t não pareado. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tabela 3 – Largura da ferida após o tratamento com zerumbone em diferentes tempos.

Tratamentos	Largura da ferida (µm) ± DP			
	Tempo após tratamento			
	0 h	24 h	48 h	72 h
DMSO	717,8 ± 82,9	557,5 ± 60,44*	482,5 ± 84,67**	393,6 ± 38,58***
ZER 83,54µM	747,8 ± 84,13	712,2 ± 68,32	721,0 ± 62,77	733,5 ± 73,98

(*), (**) e (***) representam os valores com nível de significância menor que 5% (p-valor ≤ 0,05), 1% (p-valor ≤ 0,01) e 0,1% (p-valor ≤ 0,001), respectivamente, em relação ao controle pelo teste t não pareado. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tabela 4 – Volume médio (mm³) de esferoides de células HT-29 após o tratamento com zerumbone nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.

Tratamentos	Volume médio (mm ³) ± DP			
	Tempo após tratamento			
	0 h	24 h	48 h	72 h
DMSO	0,1033 ± 0,0040 ^a	0,1292 ± 0,0068 ^b	0,1526 ± 0,0080 ^{cd}	0,1644 ± 0,0048 ^c
ZER 83,54µM	0,1067 ± 0,0042 ^a	0,1294 ± 0,0018 ^b	0,1553 ± 0,0114 ^d	0,2265 ± 0,0110 ^e
DOX	0,1048 ± 0,0030 ^a	0,09058 ± 0,0019 ^a	0,1013 ± 0,0032 ^a	0,1449 ± 0,0083 ^{bd}

Two-way ANOVA de medida repetidas e teste post-hoc Tukey de múltiplas comparações.

Tabela 5 – Média do percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 24 horas de tratamento com zerumbone.

Morte celular	Tratamentos	
	DMSO 0,41%	Zerumbone 83,54µM
Células vivas (%) ± D.P.	73,97 ± 2,91	57,73 ± 1,06 ^{***}
Células apoptóticas (%) ± D.P.	22,43 ± 2,36	39,17 ± 1,70 ^{***}
Células mortas (%) ± D.P.	0,70 ± 0,10	3,13 ± 1,51

(***) representa os valores com nível de significância menor que 0,1% (p-valor ≤ 0.001) em relação ao controle, pelo teste t não pareado. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tabela 6 – Média do percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 72 horas de tratamento com zerumbone.

Morte celular	Tratamentos	
	DMSO 0,41%	Zerumbone 83,54µM
Células vivas (%) ± D.P.	69,47 ± 0,65	43,27 ± 2,85 ^{***}
Células apoptóticas (%) ± D.P.	27,90 ± 0,79	51,27 ± 2,53 ^{***}
Células mortas (%) ± D.P.	2,70 ± 0,26	5,20 ± 0,20 ^{***}

(***) representa os valores com nível de significância menor que 0,1% (p-valor ≤ 0.001) em relação ao controle, pelo teste t não pareado. Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tabela 7 – Média percentual relativa de células HT-29 nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento com zerumbone.

Fases do ciclo celular	Tratamentos	
	DMSO 0,41%	Zerumbone 83,54µM
G1(%) ± D.P.	69,30 ± 1,90	77,37 ± 0,47 ^{**}
S (%) ± D.P.	7,13 ± 0,25	5,10 ± 0,75 [*]
G2/M (%) ± D.P.	23,30 ± 1,73	17,17 ± 0,40 ^{**}

(*) e (**) representam os valores com nível de significância menor que 5% ($p\text{-valor} \leq 0,05$) e 1% ($p\text{-valor} \leq 0,01$) em relação ao controle, respectivamente, pelo teste t não pareado. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 8 – Média percentual relativa de células HT-29 nas diferentes fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com zerumbone.

Fases do ciclo celular	Tratamentos	
	DMSO 0,41%	Zerumbone 83,54 μ M
G1(%) \pm D.P.	74,77 \pm 1,88	83,17 \pm 1,25**
S (%) \pm D.P.	7,60 \pm 0,62	5,10 \pm 0,65**
G2/M (%) \pm D.P.	16,97 \pm 1,30	10,97 \pm 1,61**

(**) representa os valores com nível de significância menor que 1% ($p\text{-valor} \leq 0,01$) em relação ao controle pelo teste t não pareado. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Tabela 9 – Resultado obtido para o percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 24 horas de tratamento com zerumbone.

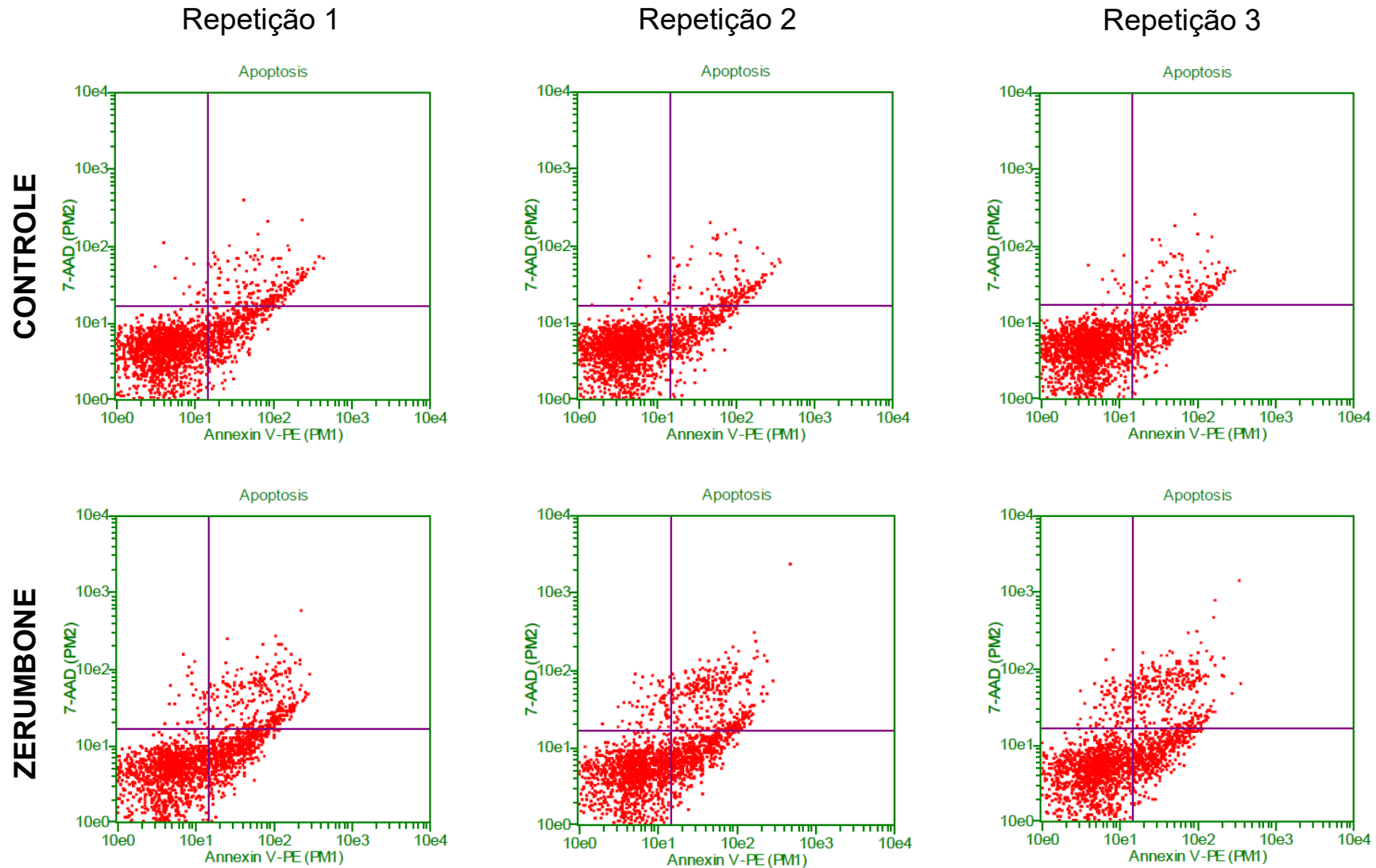


Tabela 10 – Resultado obtido para o percentual relativo de células vivas, apoptóticas e mortas após 72 horas de tratamento com zerumbone.

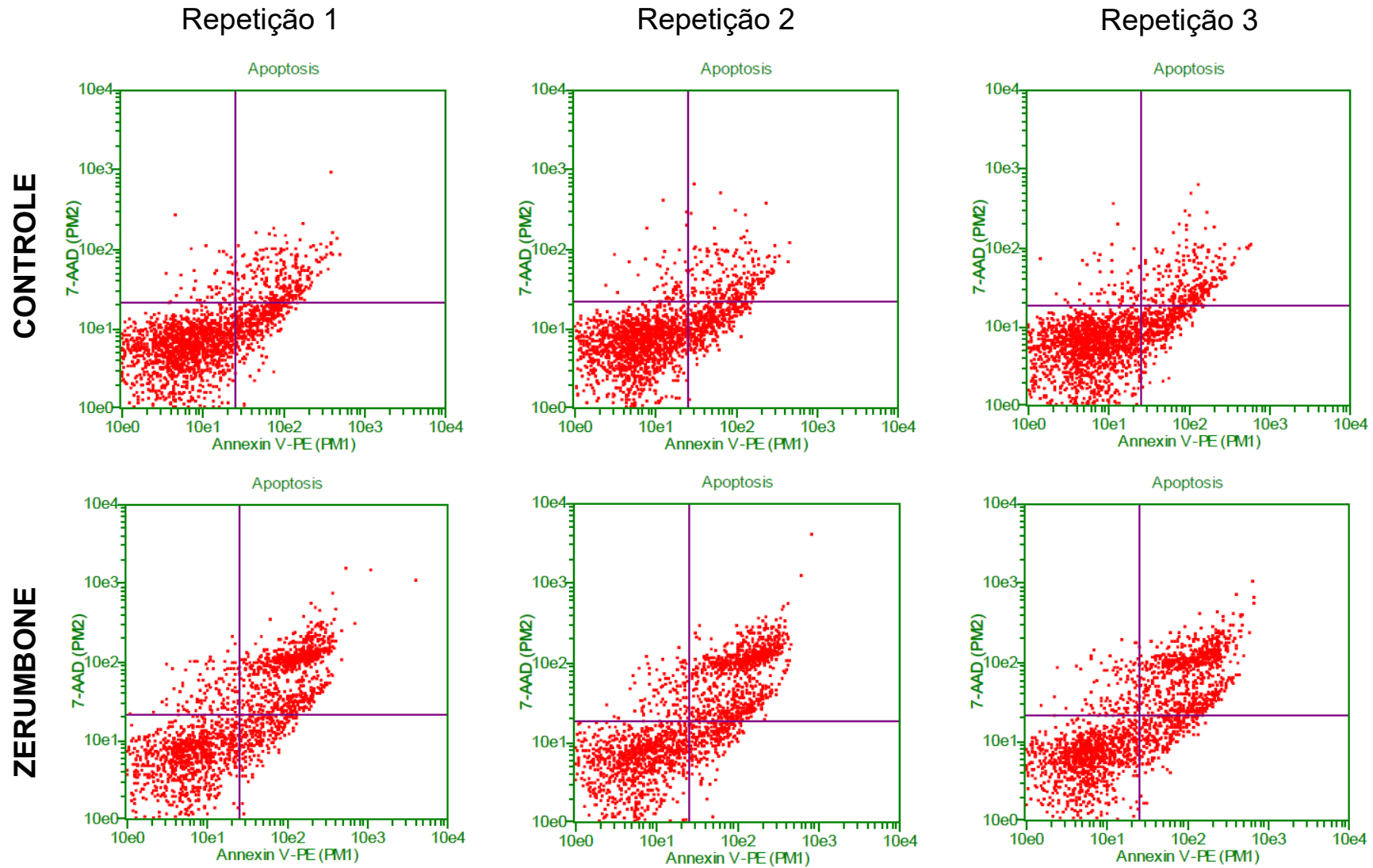


Tabela 11 – Resultado obtido para o percentual relativo de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento com zerumbone. Em rosa estão representadas as células na fase G₁, em verde na fase S e em azul na fase G₂/M do ciclo celular.

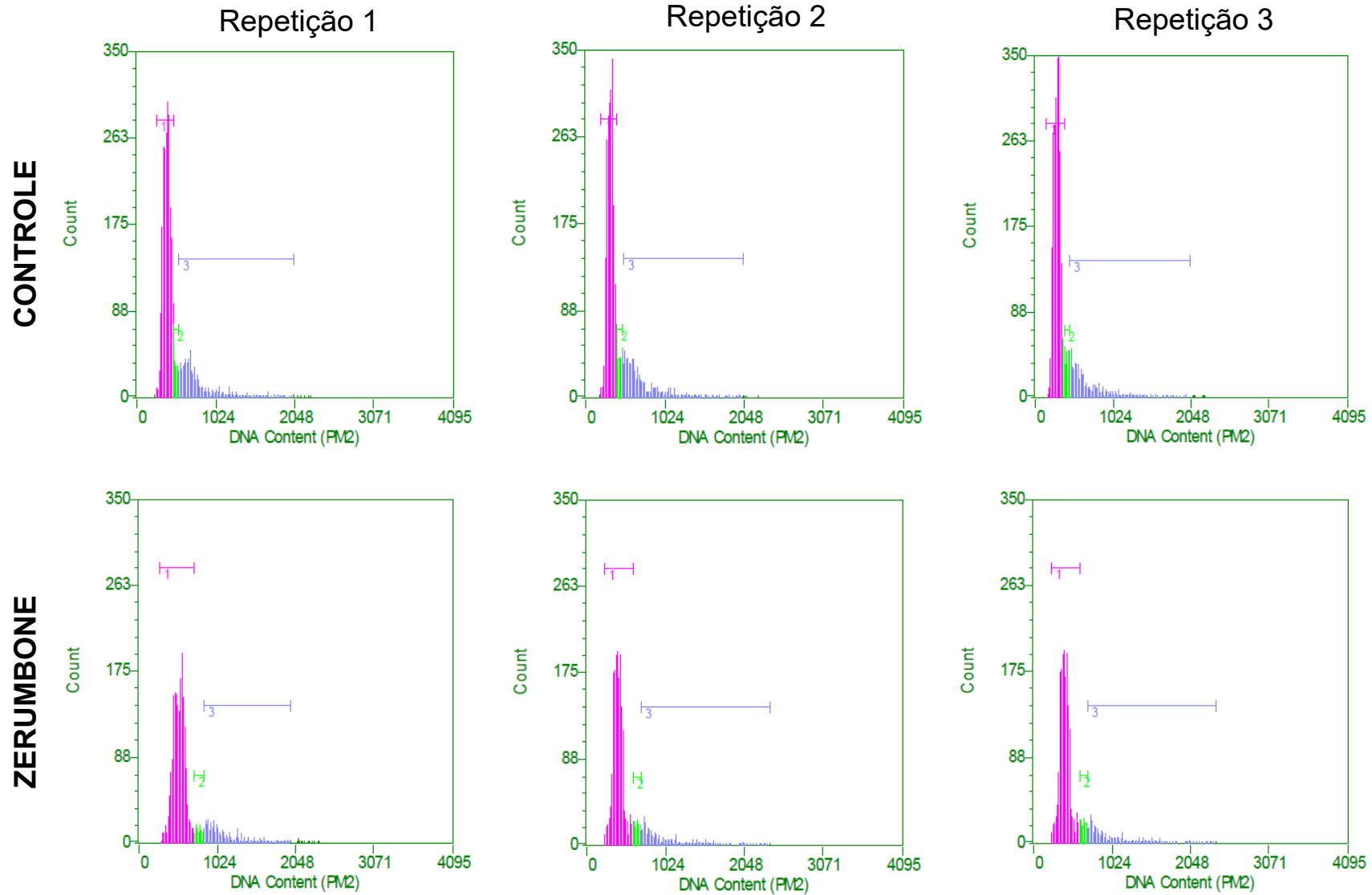


Tabela 12 – Resultado obtido para o percentual relativo de células nas diferentes fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com zerumbone. Em rosa estão representadas as células na fase G1, em verde na fase S e em azul na fase G2/M do ciclo celular.

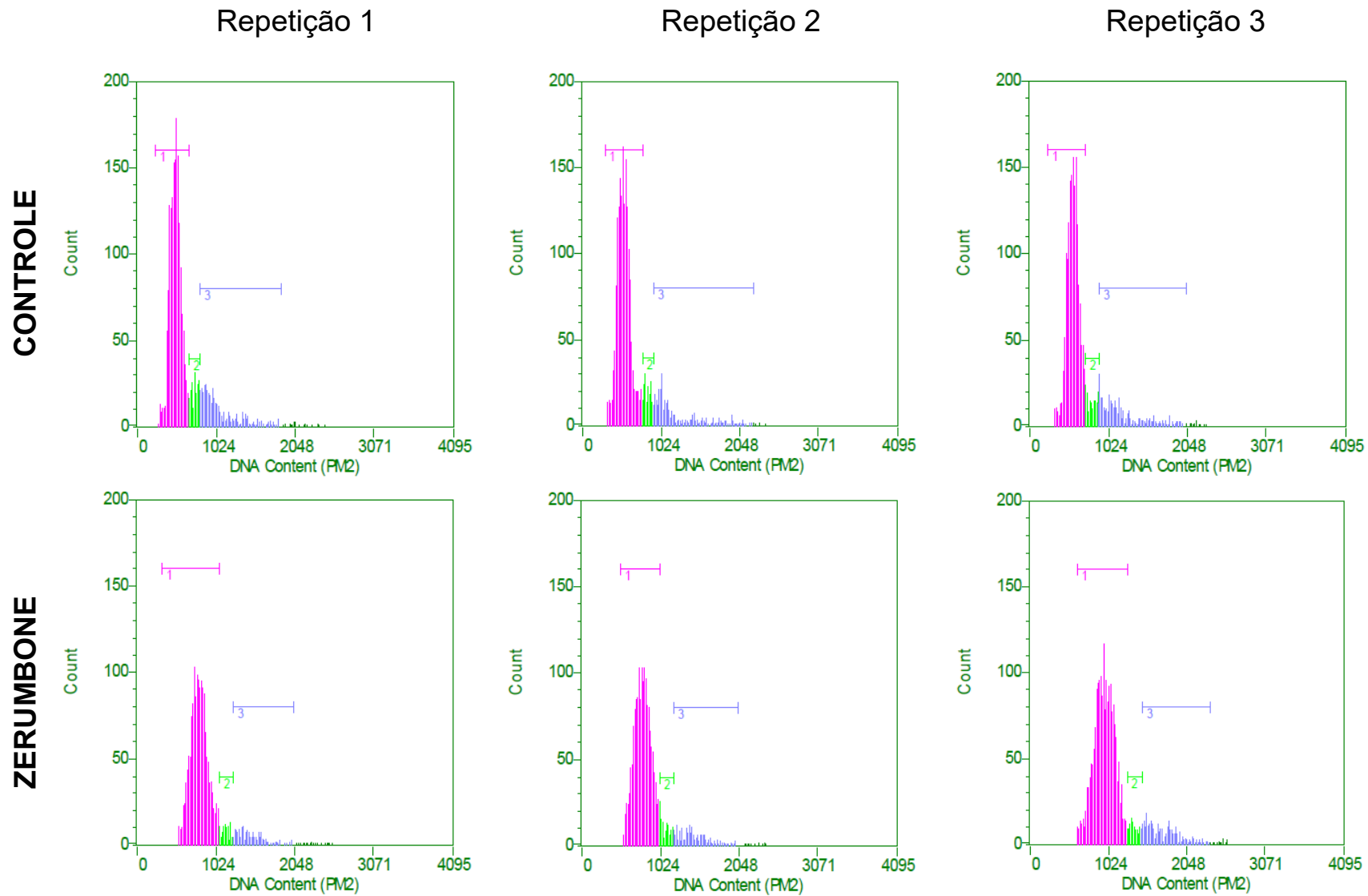


Tabela 13 - Sequências iniciadoras utilizadas na RT-qPCR.

GENE	NOME OFICIAL	SINÔNIMOS		SEQUÊNCIA
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene	MRTL; MYCC; c-Myc; bHLHe39	Forward Reverse	TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG
<i>CASP3</i>	caspase 3	CPP32; SCA-1; CPP32B	Forward Reverse	AAA GCA CTG GAA TGA CAT C CGC ATC AAT TCC ACA ATT TC
<i>CASP9</i>	caspase 9	MCH6; APAF3; APAF-3; PPP1R56; ICE-LAP6	Forward Reverse	CTC TAC TTT CCC AGG TTT TTT CAC CGA AAC AGC ATT
<i>CASP8</i>	caspase 8	CAP4; MACH; MCH5; FLICE; ALPS2B; Casp-8	Forward Reverse	CTA CAG GGT CAT GCT CTA TC ATT TGG AGA TTT CCT CTT GC
<i>BBC3</i>	BCL2 binding component 3	JFY1; PUMA; JFY-1	Forward Reverse	GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG
<i>GADD45A</i>	growth arrest and DNA damage inducible alpha	DDIT1; GADD45	Forward Reverse	TCA GCG CAC GAT CAC TGT C CCA GCA GGC ACA ACA CCA C
<i>H2AX</i>	H2A.X variant histone	H2A.X; H2A/X; H2AFX	Forward Reverse	AAT CCA AGC ACC TAG ATA CC CAG AAT TCC AGT TCA GAA GC
<i>CDKN1A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	P21; CIP1; SDI1; WAF1; CAP20; CDKN1; MDA-6; p21CIP1	Forward Reverse	CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG
<i>BECN1</i>	beclin 1	ATG6; VPS30; beclin1	Forward Reverse	CAG TAT CAG AGA GAA TAC AGT G TGG AAG GTT GCA TTA AAG AC
<i>NFKB1</i>	nuclear factor kappa B subunit 1	KBF1; EBP-1; NF-kB; CVID12; NF-kB1; NFKB-p50; NFkappaB; NF-kappaB; NFKB-p105; NF-kappa-B1; NF-kappabeta	Forward Reverse	GCA GCT CTT CTC AAA GCA GCA GCT CAA AGT TCT CCA CCA GGG
<i>TP53</i>	tumor protein p53	P53; BCC7; LFS1; BMFS5; TRP53	Forward Reverse	ACC TAT GGA AAC TAC TTC CTG ACC ATT GTT CAA TAT CGT CC
<i>ERN1</i>	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	IRE1; IRE1P; IRE1a; hIRE1p	Forward Reverse	ACG GAC GTC AAG TTT GAT CC TTG GTA GAC GCA GAC AGT GG
<i>SQSTM1</i>	sequestosome 1	p60; p62; A170; DMRV; OSIL; PDB3; ZIP3; p62B; NADGP; FTDALS3	Forward Reverse	TCC GAG TGT GAA TTT CCT G AGC TGC CAC ACT CTC CC
<i>ACTB</i>	actin beta	BRWS1; PS1TP5BP1	Forward Reverse	GAC GAC ATG GAG AAA ATC TG ATG ATC TGG GTC ATC TTC TC
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD; GAPD; HEL-S-162eP	Forward Reverse	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT

Tabela 14 – Expressão gênica relativa normalizada com os genes de referência *ACTB* e *GAPDH* utilizando o software REST. Os valores de fold-change representam quantas vezes o gene foi mais ou menos expresso em relação ao grupo controle.

GENE	FOLD-CHANGE	DESVIO PADRÃO
<i>MYC</i>	2.229	1.419279
<i>CASP3</i>	-1.49701	0.428825
<i>CASP8</i>	-1.07527	0.826883
<i>CASP9</i>	-1.03627	0.091227
<i>BBC3</i>	-3.27869	0.211877
<i>TP53</i>	-4.21941	0.181656
<i>ERN1</i>	-2.12766	0.168749
<i>GADD45A</i>	-2.22222	0.095453
<i>CDKN1A</i>	-35.7143	0.015694
<i>H2AX</i>	1.111	0.196131
<i>BECN1</i>	-2.23714	1.156499
<i>NFKB1</i>	-2.40385	0.434337
<i>SQSTM1</i>	-5.98802	0.262466