Universidade Estadual de Londrina

MATHEUS FELIPE DA SILVA

EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA DIOSGENINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÃO (NCI-H460)

Londrina
2023

MATHEUS FELIPE DA SILVA

EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA DIOSGENINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÃO (NCI-H460)

Londrina
2023

MATHEUS FELIPE DA SILVA

EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA DIOSGENINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÃO (NCI-H460)

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina
2023

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

Silva, Matheus Felipe da.
Efeitos Antiproliferativos da Diosgenina em Células de Carcinoma de Pulmão (NCI-H460) / Matheus Felipe da Silva. - Londrina, 2023.
94 f. : il.

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, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Tese. 2. Diosgenina - Tese. 3. Atividade antiproliferativa - Tese. 4. Cultura celular - 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

MATHEUS FELIPE DA SILVA

EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DA DIOSGENINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÃO (NCI-H460)

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, 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. Daisy Maria Favero Salvadori
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Câmpus de Botucatu

Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 16 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof.º Dr. Mário Sérgio Mantovani por me receber em seu grupo de pesquisa e por oportunizar aprendizados que levarei para a minha vida profissional. O seu trabalho dedicado em favor da ciência e liderança como orientador são qualidades que me inspiram.

À minha família (Moyses, Sonia e André) por todo incentivo e apoio. Amo muito vocês!

Aos meus amigos do laboratório Liana, Maria, Nayane, Amanda, Simone e Ingrid por toda ajuda no desenvolvimento da dissertação e troca de experiências. Aprendi muito com vocês!

Ao meu namorado, Luan, por todo amor, companheirismo e atenção que foram significativos no decorrer do mestrado. Obrigado por toda ajuda no desenvolvimento da dissertação e por ter aprendido muito com você. Você é incrível!

À Profª. Drª. Simone Cristine Semprebon, ao Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron, à Profª. Drª. Daisy Maria Favero Salvadori e à Profª. Drª. Fernanda Simões de Almeida por contribuírem com esta dissertação com correções e sugestões.

Às agências de fomento CNPq, Fundação Araucária e Finep pelos investimentos nos projetos de pesquisa desenvolvidos no Laboratório de Genética Toxicológica (UEL).

À CAPES pela minha bolsa de mestrado.

MATHEUS, Felipe Silva. **Efeitos Antiproliferativos da diosgenina em células de carcinoma de pulmão (NCI-H460)**. 2023. 97 f. Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

RESUMO

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo, sendo assim, terapias mais eficazes são necessárias. A diosgenina (DG) é um promissor fármaco anticâncer capaz de regular diferentes vias moleculares envolvidas na carcinogênese, cuja atividade biológica é pouco conhecida no câncer de pulmão. Assim, propomos investigar a atividade antiproliferativa da DG nas células de carcinoma de pulmão NCI-H460, avaliando a viabilidade celular, a frequência de células multinucleadas, concentração celular, mudanças no ciclo celular, indução de morte celular, produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) intracelular e danos no DNA nuclear, sendo os resultados coletados relacionados com a expressão de genes. Também avaliamos a atividade da DG em alterar o volume, induzir morte celular e inibir a recuperação da proliferação e o crescimento clonogênico em esferoides de células NCI-H460. A DG reduz a viabilidade celular e a concentração celular. A inibição da proliferação foi relacionada com a fusão das células-filhas e a inibição dos genes regulares da citocinese *RAB35*, *BIRC5* e *AURKB*. A DG aumentou a frequência de células multinucleadas (principalmente binucleadas), as quais podem relacionar-se com a fusão das células-filhas e o aumento no percentual de células com o dobro do conteúdo de DNA. Os efeitos citotóxicos da DG foram relacionados com o aumento na produção de EROs intracelular e com o aumento na expressão dos genes *RIPK3*, *MLKL* e *HSPA5* e inibição do gene *TRAF2*, os quais regulam a morte por necroptose. Nos esferoides multicelulares tratados com a DG houve um aumento no volume que foi relacionado com a menor coesão entre as células. Ainda, a DG induziu morte, inibição da recuperação e do crescimento clonogênico das células dos esferoides. Esses achados demonstram os efeitos antiproliferativos da DG em células de carcinoma de pulmão humana, contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias oncológicas.

Palavras-chave: Citocinese; Fitoquímico; Necroptose; Sapogenina; Poliploidia.

MATHEUS, Felipe Silva. **Efeitos Antiproliferativos da Diosgenina em Células de Carcinoma de Pulmão (NCI-H460)**. 2023. 97 f. Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide, so more efficient therapies are necessary. Diosgenin (DG) is a promising anti-cancer drug capable of regulating different molecular pathways involved in carcinogenesis, whose biological activity is little known in lung cancer. Thus, we propose to investigate the antiproliferative activity of DG in NCI-H460 lung carcinoma cells, evaluating cellular viability, frequency of multinucleated cells, cell concentration, changes in the cell cycle, induction of cell death, production of intracellular ROS (reactive oxygen species) and nuclear DNA damage, with the results collected related to gene expression. We also evaluated the activity of DG in altering volume, inducing cell death, and inhibiting proliferation recovery and clonogenic growth in NCI-H460 cell spheroids. DG reduces cellular viability and cell concentration. Inhibition of proliferation was related to the fusion of daughter cells and the inhibition of regular cell division genes *RAB35*, *BIRC5* and *AURKB*. DG increased the frequency of multinucleated cells (mainly binucleated), which may relate to the fusion of daughter cells and the increase in the percentage of cells with double DNA content. The cytotoxic effects of DG were related to an increase in intracellular ROS production and increased expression of the genes *RIPK3*, *MLKL* and *HSPA5* and inhibition of the *TRAF2* gene, which regulates necroptosis-induced death. In the multicellular spheroids treated with DG, there was an increase in volume that was related to lower cell cohesion. Also, DG-induced death, inhibited recovery and clonogenic growth of spheroid cells. These findings demonstrate the antiproliferative effects of DG in human lung carcinoma cells, contributing to the development of new oncological therapies.

Key-words: Cell division; Phytochemical; Necroptosis; Sapogenin; Polyploidy.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Representação esquemática das 10 *hallmarks* do câncer.....16

Figura 2 – Ciclo de duplicação e divisão de células eucarióticas 18

Figura 3 – Atividades dos complexos ciclina-CDKs e APC/C no controle do ciclo celular.....21

Figura 4 – Processos de endoreplicação.....22

Figura 5 – Os quatro estágios da citocinese 23

Figura 6 – Falha na citocinese.....24

Figura 7 – Ação dos fitoquímicos em bloquear os diferentes estágios da carcinogênese.....26

Figura 8 – Estrutura química da diosgenina.....28

Figura 9 – Representação do microambiente dentro de um esferoide 44

Artigo

Figura 1 – DG reduz a viabilidade e induz a formação de vacúolos citoplasmáticos nas células NCI-H460.....66

Figura 2 – DG reduz a concentração celular e altera o conteúdo de DNA nas células NCI-H460 67

Figura 3 – DG induz a fusão das células-filhas e a formação de células NCI-H460 multinucleadas 69

Figura 4 – DG induz morte celular, produção de EROs e não causa danos de DNA nas células NCI-H460.....70

Figura 5 – DG altera a expressão de mRNA nas células NCI-H460 72

Figura 6 – DG altera a morfologia e o volume dos esferoides de células NCI-H460 74

Figura 7 – DG induz morte em esferoides de células NCI-H460 76

Figura 8 – DG inibe a recuperação e o crescimento clonogênico das células de esferoides de NCI-H460 78

Figura S1 – DG aumenta o número de núcleos nas células NCI-H460 92

Figura S2 – DG induz aumento de células mortas na zona clara dos esferoides de células NCI-H460 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores que regulam as concentrações das ciclinas e as funções dos complexos ciclina-CDKs no ciclo celular.....20
Tabela 2 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer de mama 30
Tabela 3 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer de carcinoma hepatocelular.....33
Tabela 4 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer colorretal.....35
Tabela 5 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de osteossarcoma.....37
Tabela 6 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de próstata.....38
Tabela 7 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células tumorais de outros tipos.....40

Artigo

Tabela S1 – Sequências iniciadora *forward* e *reverse* dos genes alvo utilizados na RT-qPCR.....91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO BIBILIOGRÁFICA 15
2.1 Câncer 15
2.2 Aspectos gerais sobre o ciclo celular e a sua regulação 17
2.3 Endoreplicação 22
2.4 Produtos naturais: fitoquímicos 25
2.4.1. Diosgenina 27
2.5 Cultura celular tridimensional (3D) 42

3 OBJETIVO GERAL 46
3.1 Objetivos específicos 46

REFERÊNCIAS 47

ARTIGO 56

1 INTRODUÇÃO 56

2 MATERIAL E MÉTODOS 58
2.1 Cultura de células e agentes químicos 58
2.2 Avaliações em sistema de cultura 2D 59
2.2.1 Ensaio de viabilidade celular (metabolismo da resazurina) 59
2.2.2 Microscopia de *Time Lapse* 59
2.2.3 Coloração de células multinucleadas por coloração de giemsa 60
2.2.4 Concentração celular e análise de fases do ciclo celular 60
2.2.5 Ensaio de apoptose 61
2.2.6 Avaliação da produção de EROs intracelular 61
2.2.7 Ensaio do cometa 61
2.2.8 Quantificação relativa de mRNA por RT-qPCR 62
2.3 Ensaios de cultura tridimensional (3D) 63

2.3.1 Método de obtenção dos esferoides 63
2.3.2 Ensaio de crescimento (volume) 63
2.3.3 Avalição da morte 63
2.3.4 Recuperação da proliferação nos esferoides 64
2.3.5 Ensaio clonogênico em esferoides 64
2.4 Análise estatística 64

3 RESULTADOS 65
3.1 DG reduz a viabilidade e induz a formação de vacúolos citoplasmáticos nas células NCI-H460 em sistema 2D 65
3.2 DG reduz a concentração celular e aumenta o percentual de células com o dobro do conteúdo de DNA em sistema 2D 66
3.3 DG induz a fusão das células-filhas e a formação de células multinucleadas em sistema 2D 67
3.4 DG induz morte celular e aumenta EROs intracelular em sistema 2D 70
3.5 DG modifica a expressão de genes de regulação da citocinese e da necroptose em sistema 2D 72
3.6 DG altera a morfologia e o volume dos esferoides em sistema 3D 74
3.7 DG causa morte nas células dos esferoides em sistema 3D 76
3.8 DG reduz a proliferação e o crescimento clonogênico nos esferoides em sistema 3D 78

4 DISCUSSÃO 80

5 CONCLUSÃO 84

RESUMO GRÁFICO 85

REFERÊNCIAS 85

APÊNDICES 91
APÊNDICE A 92
APÊNDICE B 93

APÊNDICE C.....95

ANEXO.....96
ANEXO A.....97

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é um importante problema de saúde para os indivíduos e os sistemas de saúde no mundo. No ano de 2020, representou 2,2 milhões de novos diagnósticos e 1,8 milhões de mortes, sendo o segundo tipo de câncer com maior incidência e o primeiro em mortalidade (SUNG et al., 2021; FERLAY et al., 2020a). Acerca da classificação histológica, os cânceres de pulmão de células não pequenas (CPCNP) e de células pequenas (CPCP) representam, respectivamente, cerca de 80% a 85% e 10 a 15% dos casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022). O primeiro, ainda é classificado em três principais subtipos: adenocarcima, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (BAXEVANOS; MOUNTZIOS, 2018). Apesar dos avanços nas estratégias diagnósticas e nos recursos terapêuticos, as taxas de mortalidade por câncer de pulmão serão 1,67 vezes maiores no ano de 2040, comparado com 2020, de forma a sinalizar a necessidade de terapias mais eficazes (TRAVIS et al., 2015; BAXEVANOS; MOUNTZIOS, 2018; FERLAY et al., 2020b).

As culturas celulares baseadas no padrão de crescimento bidimensional (2D) e tridimencional (3D) de células são modelos in vitro que permitem a testagem e auxiliam no descobrimento de novas terapias anticancer. As culturas 3D, particularmente, se destacam por melhor mimetizar diferentes características das células em seu contexto tecidual, que incluem maior interação célula-célula e célula-matriz extracelular, comparado com as culturas 2D (EDMONDSON et al., 2014). Os esferoides de células tumorais, ainda, são um tipo de modelo de cultura 3D que recapitula parte da heterogeneidade de células observada em tumores avascularizados ou pouco vascularizados, devido a um gradiente de difusão de oxigênio, nutrientes e metabólitos, que favorece a formação três camadas de células distintas: uma zona de proliferação celular externa, uma zona de células quiescentes intermediária e um núcleo de células necróticas interna (EDMONDSON et al., 2014; ZANONI et al., 2016).

A sapogenina esteroide, diosgenina (DG), é biosintetizada por plantas como Feno-grego (*Trigonella foenum-graecum* L.), *Heterosmilax yunnanensis*, *Costus speciosus* e em diferentes espécies de plantas do gênero *Dioscorea* (*D. zingiberensis*, *D. septemloba* e *D. collettii*) (CHAUDHARY et al., 2018; JAHFAR et al., 2008; YI et al., 2014). Os efeitos anticâncer da DG atraem um grande interesse devido à natureza pleiotrópica de seus efeitos. Nos modelos de linhagens de células tumorais, a DG causa parada de ciclo celular em diferentes fases (HUO et al., 2004; LI et al., 2015), induz a morte por apoptose, produzindo estresse oxidativo (KIM et al., 2012) e regulando moléculas pró-apoptóticas (CASPASES-3, -8, -9, citocromo c, BAX) (KIM et al., 2012) e anti-apoptóticas (BCL-2 e BCL-XL) (LI et al., 2010), além de interferir no

metabolismo celular ao regular as enzimas de síntese de ácidos graxos (ácido graxo sintase) (CHIANG et al., 2007) e colesterol (HMG-CoA) (RAJU; BIRD., 2007) e os transportadores de glicose (GLUT-3 e -4) (LI et al., 2021). A DG também pode mitigar, segundo esses modelos, a migração e a invasão, inibindo a transição epitélio-mesenquimal (HUANG et al., 2019) e inibir células tronco cancerosas, conhecidas pela sua quimioresistência (BHUVANALAKSHMI et al., 2017).

Contudo, os efeitos biológicos desse fitoquímico em células tumorais de origem pulmonar precisam de melhor compreensão. Apesar dos efeitos citostáticos e pró-apoptóticos da DG terem sido relatados em linhagem de adenocarcinoma de pulmão (A549) (XU et al., 2019), os mecanismos antiproliferativos em linhagens de carcinoma de pulmão são pouco conhecidos.

2 REVISÃO BIBILIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer é um grupo de doenças com mais de 100 tipos e subtipos que se inicia em diferentes tecidos ou órgãos e que se caracteriza pela proliferação desordenada de células anormais e invasão dos tecidos adjacentes (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A previsão é de que nas próximas décadas a taxa de morbimortalidade em decorrência do câncer seja ainda maior em todas as regiões do mundo. Segundo as últimas estatísticas sobre câncer no mundo, em 2020 o número de novos casos foi de 19,29 milhões de pessoas e a previsão para 2040 é de 30,2 milhões (FERLAY, 2022b). Apenas no ano de 2020, 9,95 milhões de mortes foram atribuídas ao câncer (FERLAY, 2022a). Os cânceres de mama, pulmão, colorretal e próstata são os mais incidentes na população, sendo o câncer de pulmão o responsável pelo maior número de mortes (FERLAY, 2022a). Entre os homens, os tipos mais incidentes são os cânceres de pulmão, próstata e colorretal, enquanto entre as mulheres, os mais incidentes são os cânceres de mama, colorretal e pulmão (FERLAY, 2022a).

Durante o complexo processo de desenvolvimento tumoral, as células adquirem diferentes capacidades biológicas, as quais foram descritas por Hanahan e Weinberg (2000) como as *hallmarks* do câncer. Em sua última publicação, Hanahan (2022) descreveu as 10 *hallmarks* do câncer como sendo a imortalidade, evasão aos supressores de crescimento, evasão do sistema imunológico, habilitação a imortalidade replicativa, inflamação promotora de tumor, ativação da invasão e da metástase, indução ou acesso a vasculatura, resistência à morte, desregulação do metabolismo celular e sustentação da sinalização proliferativa (Figura 1). Os pericitos, os fibroblastos associados ao câncer, as células endoteliais e inflamatórias também arquitetam o microambiente tumoral e influenciam na biologia das células cancerosas, impulsionando a tumorigênese e o fenótipo maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

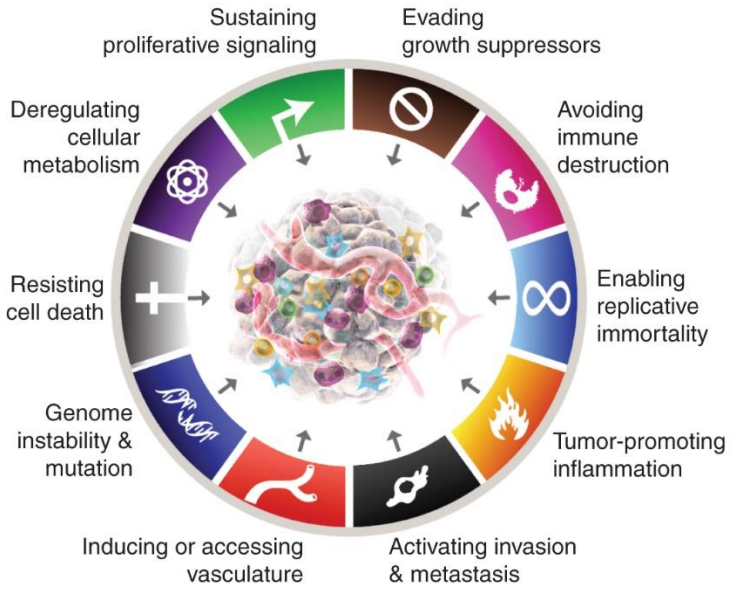


Figura 1 – Representação esquemática das 10 *hallmarks* do câncer.

Fonte: Hanahan (2022).

Dentre as *hallmarks*, a metástase figura como a mais importante para a letalidade do câncer, pois é a causa de 90% das mortes dos pacientes (WELCH; HURST, 2019; EMON et al., 2018; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). De forma geral, para colonizar locais secundários, as células têm que adquirir as capacidades de realizar os vários eventos envolvidos na metástase que são: invasão local nos tecidos próximos, invasão do sistema circulatório e sobrevivência nesse ambiente, passagem das paredes vasculares para o parênquima de tecidos distantes, formação de colônias pequenas nesse parênquima e, por fim, formação de colônias macroscópicas e clinicamente detectáveis (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

No que diz respeito ao tratamento do câncer, a radioterapia, a quimioterapia e a cirurgia são os mais tradicionais e mais utilizados no seu enfrentamento (ARRUEBO et al., 2011). Contudo, a cirurgia é um procedimento altamente invasivo e a quimioterapia e radioterapia associam-se a graves efeitos colaterais e resistência nas células tumorais (A BAUDINO et al., 2015). Os quimioterápicos convencionais, por exemplo, possuem como alvo as células em rápida divisão, atingindo não só as células cancerosas, mas também as células normais da medula óssea, folículo capilar e intestinais, resultando em depressão do sistema imunológico, queda dos cabelos e distúrbios gastrointestinais (A BAUDINO et al., 2015). Assim, existe um grande interesse científico no aprimoramento das terapias tradicionais e na descoberta e no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos.

O fenótipo proliferativo e a viabilidade das células tumorais são dependentes de certas vias de regulação do ciclo, sendo essas vias oportunidades terapêuticas no câncer (OTTO; SICINSKI, 2017).

2.2 Aspectos Gerais Sobre O Ciclo Celular E A Sua Regulação

Nas células eucarióticas, o ciclo celular conduz ao aumento, distribuição e divisão do conteúdo celular, resultando em duas células-filhas geneticamente idênticas, ao longo de dois períodos distintos: a interfase, compreendendo as fases G1 (pré-replicativa), S (replicativa) e G2 (pós-replicativa) e a fase mitótica (M), compreendendo os estágios de prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, que resultam na divisão do núcleo (mitose), e o estágio da citocinese, que resulta na divisão do citoplasma (WANG, 2021). Em cada período ocorre um dos dois principais eventos do ciclo celular, que são a duplicação do DNA na fase S da interfase e a segregação cromossômica na anáfase da fase M (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022).

De maneira a assegurar o tempo adequado e a precisão desses eventos, as células eucarióticas se utilizam de maquinarias moleculares de regulação conservadas, que permitem ou evitam o progresso do ciclo. Essas últimas maquinarias moleculares monitoram, em pontos específicos do ciclo – conhecidos como pontos de verificação – danos no DNA na interfase, a integridade das forquilhas de replicação do DNA na fase S e a montagem do fuso mitótico na fase M (FISCHER et al., 2022; MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022). Os principais pontos de verificação e eventos do ciclo celular estão representados e descritos na legenda da Figura 2.

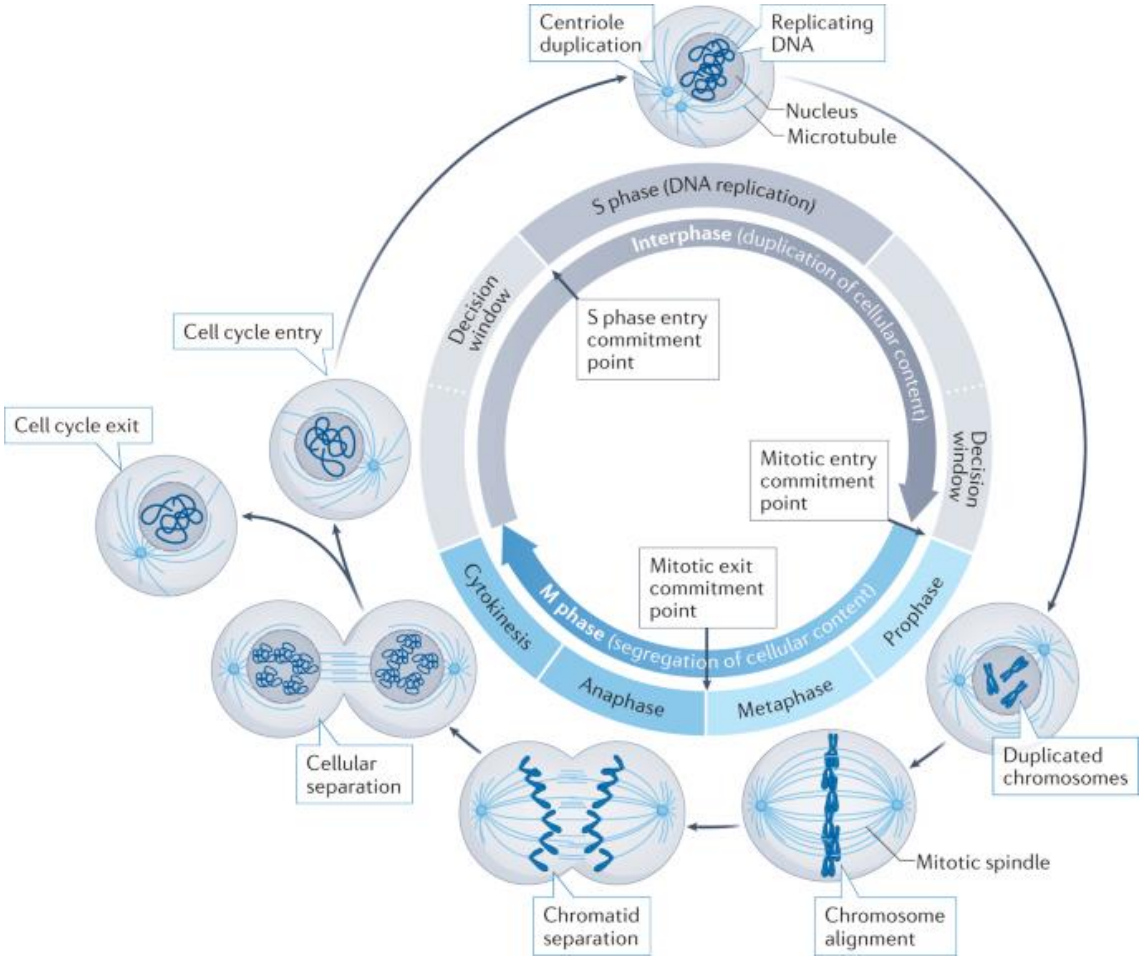


Figura 2 – Ciclo de duplicação e divisão de células eucarióticas. Os principais eventos do ciclo de síntese e duplicação de DNA e a segregação cromossômica acontecem na fase S da interfase e na fase M, respectivamente (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022). Antecedendo e assegurando o tempo e a fidelidade de tais eventos, há pontos de verificação ou janelas de decisão, nas quais as células se comprometem com a entrada nas fases S, M e anáfase da fase M (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022). A fim de separar o conteúdo genético de maneira idêntica às células-filhas, a célula progenitora duplica os centrossomos na fase S e condensa a cromatina para formar os cromossomos duplicados na prófase, que atingem máxima condensação na metáfase (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022; ALBERTS, 2017). Nessa última, os cromossomos são alinhados na região equatorial das células, com auxílio das fibras do fuso, que também auxiliam a separação das cromátides irmãs na anáfase, as quais são empacotadas em núcleos distintos na telófase (não representada na imagem) (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022; ALBERTS, 2017). Na citocinese, finalmente, existe a separação do conteúdo celular a duas células-filhas, que podem reiniciar um novo ciclo ou sair do ciclo, entrando em um estado não proliferativo, conhecido como G0 (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022).

Fonte: Matthews; Bertoli; Bruin, (2022).

As Cinases Dependentes de Ciclina (CDKs, do inglês *cyclin-dependent kinases*) formam um grupo diversificado de enzimas chave na regulação do ciclo celular, cuja ação em modular a atividade de proteínas alvo, por meio de reações de fosforilação, cria condições que permitem a progressão no ciclo (MALUMBRES, 2014). A disponibilidade de ciclinas específicas, que

oscila por meio de ciclos de síntese e degradação durante o ciclo celular, controla a atividade de CDKs específicas, ativando-as ao formarem os complexos ciclina-CDKs, os quais se acumulam e permitem transições ordenadas de fases e estágios no ciclo em um único sentido (ALBERTS, 2017; MALUMBRES, 2014) (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 – Fatores que regulam as concentrações das ciclinas e as funções dos complexos ciclina-CDKs no ciclo celular.

Ciclinas	Exemplos de fatores que ativam a transcrição ou evitam a degradação de Ciclinas	CDKs de interação	Complexos Formados	Funções do Complexo	Referências
Ciclina D1, D2 e D3	Sinais mitogênicos (ex.: fatores de crescimento e citocinas)[1]	Cdk4, Cdk6	Ciclina D-Cdk4,6	Fosforilar a proteína Rb[2] (inibidora do fator de transcrição E2F)[1]. Evita a saída das células do ciclo para G0 na fase inicial de G1[2].	Choi; Anders 2013[1] / Topacio et al. 2019[2];
Ciclina E	Fator de transcrição E2F*[3]	Cdk2	Ciclina E-Cdk2	Promove a passagem da célula do ponto de restrição em G1[3]. Hiperfosforila Rb, reduzindo a inibição de E2F, que aumenta a transcrição da ciclina E3[3]. Inibição de APC/C2, aumentando a disponibilidade da cilcina A[4].	Pennycook; Barr, 2020[3] / Cappell et al. 2018[4]
Ciclina A	Fator de transcrição E2F[3] e inibição da E3 ubiquitina ligase APC/C[3]	Cdk2, Cdk1	Ciclina A-Cdk2,1	Cilcina A-Cdk2 - Inibição de APC/C[5]. Ativação de helicases, permitindo o disparo das origens de replicação e o início da fase S[6]. Impede o relicencimento, assegurando que apenas uma origem seja ativada por ciclo[7]. Ciclina A-Cdk1 - disparo das origens de replicação na fase S tardia[8].	Lukas et al. 1999[5] / Limas; Cook, 2019[6] / Liu et al. 2004[7] / Katsuno et al. 2009[8]
Ciclina B	Fator de transcrição FOXM1[9]	Cdk1	Ciclina B-Cdk1	Participa da desintegração da lâmina nuclear e envoltório nuclear[10], condensação dos cromossomos[11], regula a dinâmica dos microtúbulos[12], regula a montagem do fuso mitótico[13] e inibição da separação das cromátides irmãs, prevenindo a transição metáfase-anáfase[14]	Zhang; Zhang; Kong, 2016[9] / Gavet; Pines, 2010[10] / Abe et al., 2011[11] / Fourest-Lieuvin et al., 2006[12] / Chee; Haase, 2010[13] / Chang; Xu; Luo, 2003[14]

Notas: *Os fatores que, primeiramente, ativam a transcrição da ciclina E são desconhecidos, sendo vias de crescimento e metabolismos potencialmente relacionadas (PENNYCOOK; BARR, 2020).

Fonte: O próprio autor.

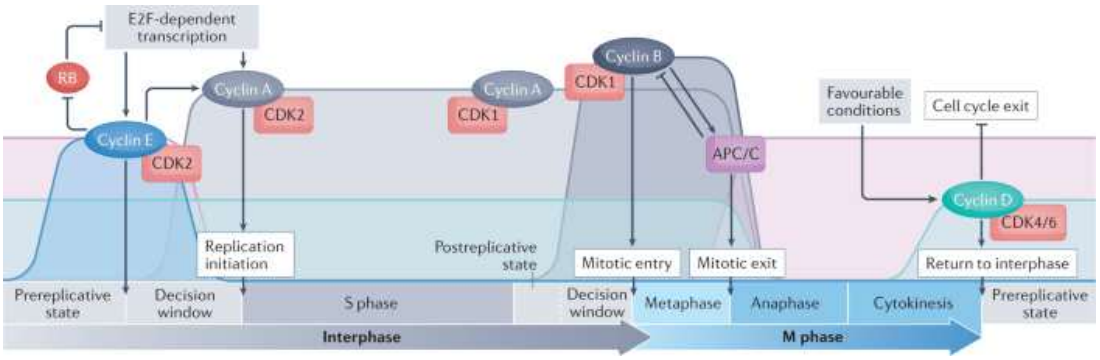


Figura 3 – Atividades dos complexos ciclina-CDKs e APC/C no controle do ciclo celular. No final da fase M e no início da fase G1 (referida na imagem como estado pré-replicativo), na presença de sinais mitogênicos (condições favoráveis), existe um aumento nas concentrações da ciclina D e o acúmulo do complexo ciclina-CDK4,6, permitindo a entrada e evitando a saída do ciclo (CHOI; ANDERS, 2013; TOPACIO et al., 2019). Na fase G1, ainda, a ciclina E se acumula e se complexa com a CDK2 (ciclina-CDK2), que hiperfosforina a proteína Rb, liberando o fator de transcrição E2F (PENNYCOOK; BARR, 2020). Esse, por sua vez, aumenta a transcrição da ciclina A e ainda mais da ciclina E, criando um reforço positivo (PENNYCOOK; BARR, 2020). Os complexos de ambas as ciclinas com a CDK2 estabelecem um ponto de verificação (referida na imagem como janela de decisão) para a entrada na fase S. O complexo ciclina A-CDK2 se forma, permitindo o início da fase de síntese de DNA (fase S), permitindo o disparo nas origens de replicação, devido a ativação das helicases, e prevenindo o relicenciamento das origens (LIU et al., 2004; LIMAS; COOK, 2019). O complexo ciclina A-CDK1 também se forma em uma fase tardia de S, promovendo o disparo de mais origens de replicação (KATSUNO et al., 2009). Um aumento nas concentrações de ciclina B ocorre após a fase S, formando o complexo ciclina B-CDK1. Ambos os complexos ciclina A-CDK1 e ciclina B-CDK1 criam uma segunda janela de decisão para a entrada na fase M e cooperam para os primeiros eventos nessa fase (CRNCEC; HOCHEGGER, 2019). A ciclina A é degradada no início da prometáfase e a ciclina B na metáfase sob influência do complexo promotor da anáfase (APC/C) (ELZEN; PINES, 2001; CLUTE; PINES, 1999). A degradação dessa última, em particular, oportuniza a segregação das cromátides irmãs na anáfase e a saída da mitose (SACKTON et al., 2014).
Fonte: Matthews; Bertoli; Bruin, (2022).

As fases e estágios que precedem tais transições, conduzem as células a eventos de síntese do DNA (G1-S) e de segregação cromossômica (G2-M e metáfase-anáfase), que são críticos para a homeostase genômica (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022). Como um mecanismo de evitar a ruptura dessa homeostase, diferentes maquinarias moleculares de defesa podem ser ativadas em situações de danos no DNA, estresse replicativo e falhas na ligação dos microtúbulos ao cinetocoro dos cromossomos, causando uma parada do ciclo, como efeito da inibição dos complexos ciclina-Cks e complexo promotor da anáfase (APC/C), até o retorno da homeostase (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022; WANG, 2021). Quando da impossibilidade desse retorno, as células podem ser encaminhadas à senescência ou à morte por apoptose (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022).

À parte dos potenciais eventos adversos ao DNA e a sua segregação, o ciclo celular também é controlado pela disponibilidade de mitógenos (ex.: fatores de crescimento) e nutrientes no meio extracelular (FOSTER et al., 2011). Nas condições de baixa disponibilidade desses últimos e baixa intensidade de danos no DNA, as células podem executar uma saída do ciclo, por meio da expressão e ativação da P53, para um estado reversível de quiescência,

também conhecido como G0 (MATTHEWS; BERTOLI; BRUIN, 2022; FOSTER et al., 2011). A senescência, em contraste, é um estado de parada do ciclo, causado por situações de estresse (ex.: oxidativo, genotóxico e replicativo), envelhecimento, sinalização oncogênica ou encurtamento dos telômeros, podendo acontecer nos pontos de verificação que se localizam nas fases G1, G1/S e G2 (BLAGOSKLONNY, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011; TERZI; IZMIRLI; GOGEBAKAN, 2016).

2.3 ENDOREPLICAÇÃO

Em condições fisiológicas ou patológicas, o progresso das células nas fases G1, S e G2/M no ciclo mitótico, bem como nos diferentes estágios da fase M, pode sofrer variações, dando lugar a endoreplicações (endociclos e endomitoses) (Figura 4), de modo a gerar células poliploides, isto é, com DNA replicado, porém sem a completa separação das células-filhas (ZHANG et al., 2022). Na endomitose, em específico, as células entram na mitose, contudo, não a completam, gerando células poliploides com um único núcleo (falhas na cariocinese e na citocinese) ou poliploides com múltiplos núcleos (cariocinese completa e falha na citocinese) (LORDIER et al., 2008).

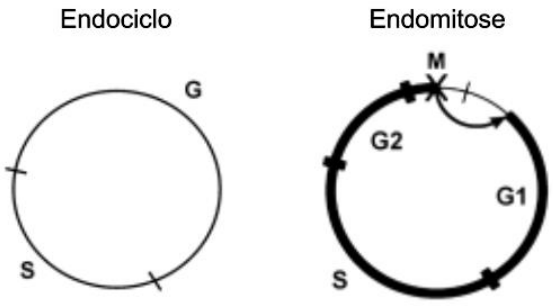


Figura 4 – Processos de endoreplicação. No endociclo, as células executam o ciclo alternando entre as fases G e S, na ausência de mitoses, gerando células poliploides com um único núcleo. Na endomitose, as células executam as fases G1, S, G2 e parcialmente a fase M, gerando células poliploides com um único núcleo ou células poliploides multinucleadas, dependendo dos estágios não completamente executados na fase M (LORDIER et al., 2008; LEE; DAVIDSON; DURONIO, 2009).
Fonte: Lee; Davidison e Douronio (2009).

A citocinese é a última etapa do ciclo celular, a qual ocorre coordenadamente com a segregação cromossômica e se desenvolve ao longo de quatro estágios: especificação do plano

de clivagem, ingresso do sulco de clivagem, formação do corpo intermediário (do inglês *midbody*) e a abscisão (NORNAMD; KING, 2010) (Figura 5).

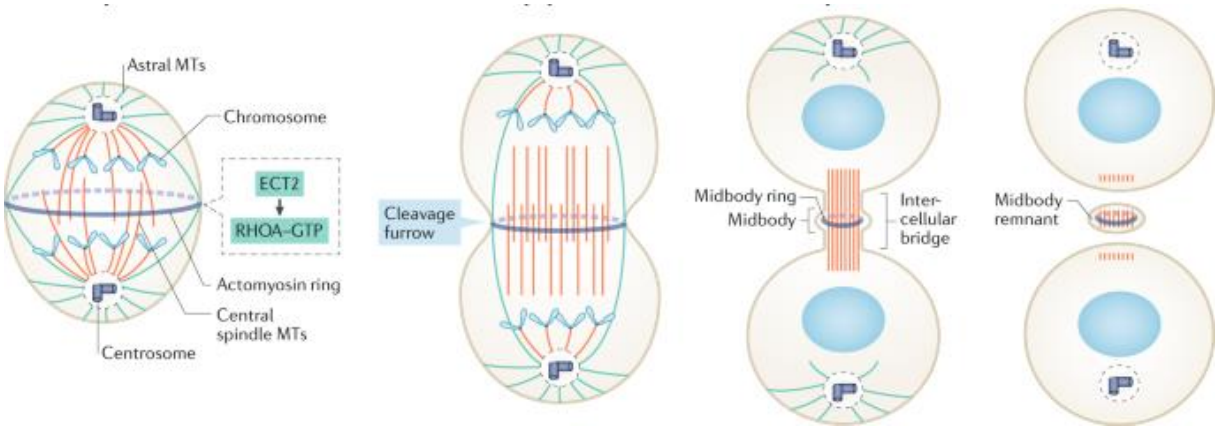


Figura 5 – Os quatro estágios da citocinese. O primeiro estágio da citocinese é a especificação do plano de clivagem, que se inicia na anáfase, em consequência da ativação da GTPase RHOA, por meio do fator de troca de nucleotídeo de guaninas ECT2 (LENS; MEDEMA, 2019; LACROIX; MADDOX, 2011). A GTPase RHOA ativa uma cascata de sinalização que resulta, em sequência, na formação e na contração do anel de actomiosina, logo abaixo da membrana plasmática e na região equatorial da célula, assegurando a redução da circunferência da células e a formação do sulco de clivagem (ingresso do sulco de clivagem) (LENS; MEDEMA, 2019; LACROIX; MADDOX, 2011). Na fase final da citocinese, forma-se o corpo intermediário (*midbody*), contendo um anel (também conhecido como *Flemming body*), que serve de ancoragem para uma maquinaria de proteínas, a qual promove a clivagem do canal intercelular e a separação das células-filhas (LENS; MEDEMA, 2019; MORITA et al., 2007).

Fonte: Lens; Medema, 2019.

Os defeitos na execução de qualquer um dos estágios da citocinese, podem levar a formação de células com o dobro do genoma (poliploides e binucleadas) e do número de centrossomos, sendo aqueles gerados após a formação do sulco de clivagem, associados à regressão do canal de clivagem e à fusão das células-filhas (NORNAMD; KING, 2010) (Figura 6). Dentre as causas dessa regressão estão a presença na ponte intercelular de pontes de cromatina ou pontes ultrafinas de DNA e a alteração na expressão ou mutações nos componentes que regulam a citocinese (LENS; MEDEMA, 2019).

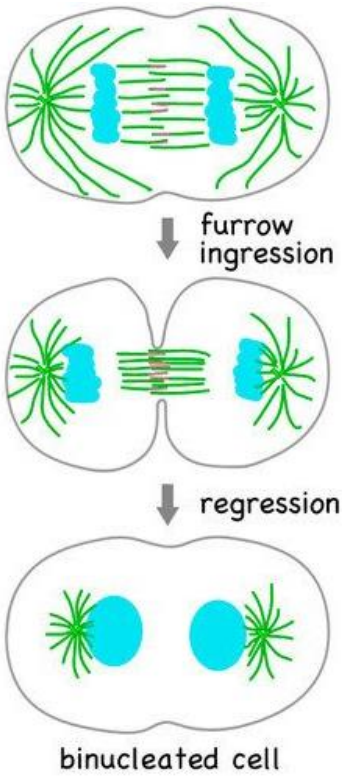


Figura 6 – Falha na citocinese. Falha na citocinese associada à regressão do sulco de clivagem, produzindo uma célula binucleada.

Fonte: Nakayama et al., 2017.

Em razão do número extra de centrossomos, as células multinucleadas recém-formadas são mais susceptíveis em gerar clones aneuploides e cromossomicamente instáveis, que contribuem para o desenvolvimento e a progressão tumoral. Contudo, dependendo do contexto genético, as células poliploides podem permanecer bloqueadas na fase G1 do ciclo ou serem conduzidas à senescência ou à morte celular, evitando os potenciais efeitos oncogênicos da aneuploidização. A P53 é descrita como uma importante proteína envolvida na condução a esses desfechos (AYLON; OREN, 2011).

Na literatura, descreve-se a ação antiproliferativa de fitoquímicos em células tumorais, ao interferirem nos componentes moleculares que regulam a citocinese, causando a falha nesse processo de divisão (NAKAYAMA et al., 2013; YAN et al., 2022). A isoflavona genisteína causa o regresso do sulco de clivagem por promover a deslocalização da RHOA na região equatorial da célula e a formação de pontes de cromatina na anáfase (NAKAYAMA et al., 2013). Em adição, o fitoquímico alcalóide *corynoline* induz falha na citocinese por meio da inibição da atividade quinase da proteína AURORA B (YAN et al., 2022).

2.4 Produtos Naturais: Fitoquímicos

Os produtos naturais formam uma rica diversidade de compostos químicos encontrados em organismos como plantas, animais e microrganismos (BAKER et al., 2007; YUAN et al., 2016). Devido às suas propriedades bioativas, os produtos naturais são milenarmente aproveitados pela medicina tradicional para o tratamento de doenças (PYE et al., 2017; YUAN et al., 2016) e destacam-se como material para o desenvolvimento da maioria dos fármacos anticâncer utilizados pela medicina moderna (NEWMAN; CRAGG, 2020). Dentre esses fármacos, existem aqueles derivados de plantas, também conhecidos como fitoquímicos (CHOUDHARI et al., 2020).

As plantas sintetizam uma ampla diversidade de fitoquímicos por meio de vias metabólicas secundárias (MENDONZA; SILVA, 2018). Sendo assim, esses metabólitos não são essenciais para o crescimento e metabolismo vegetal, porém permitem uma melhor adaptação desses seres vivos ao ambiente, protegendo contra o ataque de microrganismos e herbívoros e o excesso de radiação solar, além de atrair insetos polinizadores (YANG et al., 2018; MENDONZA; SILVA, 2018). De acordo com a origem biossintética, os fitoquímicos podem ser classificados como carotenoides, fenólicos, alcaloides, compostos contendo nitrogênio e compostos organossulfurados (LIU, 2004).

A grande diversidade de estruturas químicas e os conhecidos potenciais bioativos desses metabólitos vegetais, motivam o desenvolvimento de estudos para o descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diferentes condições patológicas, que incluem as doenças neurológicas (VELMURUGAN et al., 2018), o diabetes (SINGH et al., 2014) e o câncer (CHOUDHARI et al., 2020). Para esta última condição, existe a necessidade de tratamentos mais eficazes frente as altas taxas de morbimortalidade e com reduzidos efeitos adversos (CHOUDHARI et al., 2020).

Na literatura, relata-se os potencias quimiopreventivos e quimioterapêuticos dos fiquímicos ao atuarem, respectivamente, nos estágios iniciais e tardios da carcinogênese, que compreendem a iniciação, a promoção e a progressão (Figura 7) (KOH; HO; PAN, 2020).

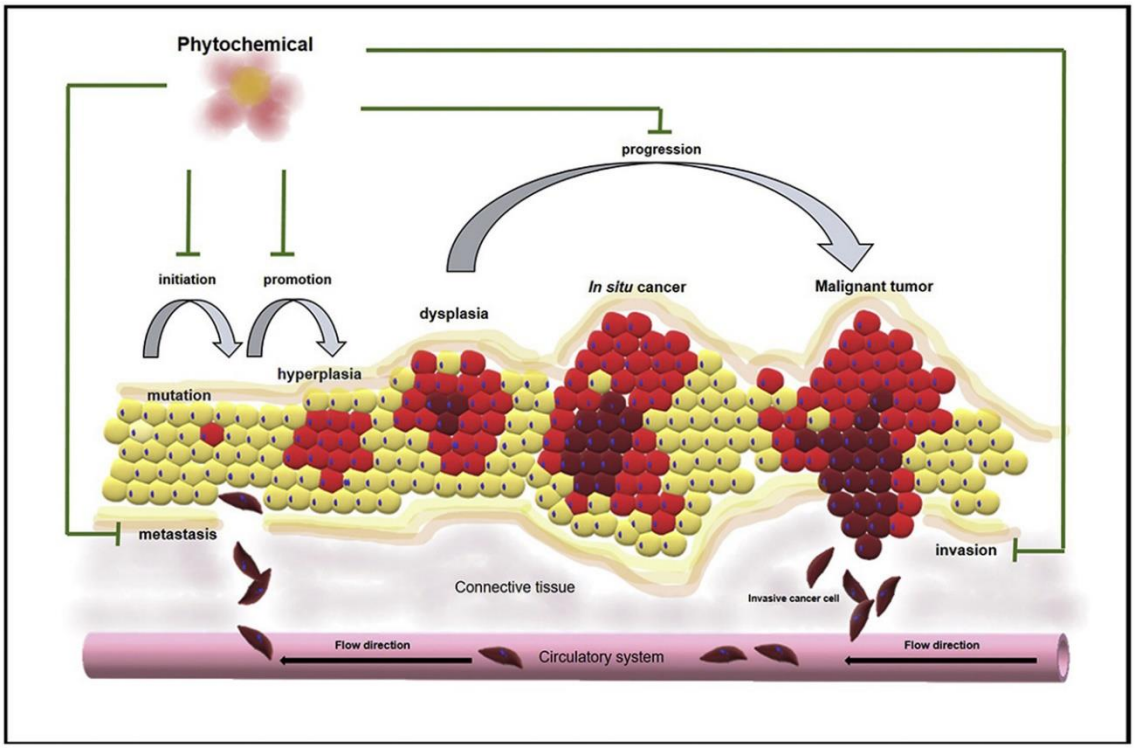


Figura 7 – Ação dos fitoquímicos em bloquear os diferentes estágios da carcinogênese. A formação de células iniciadas, estágio de iniciação, acontece por meio de mudanças na sequência de DNA e/ou alterações epigenéticas pela ação de carcinógenos (ex. químicos presentes no tabaco e radiações), resultando na promoção da expressão dos oncogenes e na supressão da expressão dos genes supressores de tumor, ambos responsáveis pelo controle do crescimento e da proliferação celular. O estágio de promoção, por sua vez, associa-se com o estímulo da proliferação (hiperplasia) das células iniciadas por agentes oncopromotores (ex. inflamação). Por fim, a progressão tumoral envolve uma maior perda do controle proliferativo e alterações na morfologia normal das células (displasia), formação do câncer *in situ* (não invasivo) e transformação malígna com invasão e metástase das células (KOH; HO; PAN, 2020).

Fonte: Koh, Ho e Pan, 2020.

Ainda, um único fitoquímico pode atuar em múltiplos alvos terapêuticos e produzir efeitos antitumorais nesses diferentes estágios. Os compostos curcumina e resveratrol são exemplos de fitoquímicos com amplas atividades biológicas capazes de interferir negativamente na proliferação (SU et al., 2017; GARVIN; OLLINGER; DABROSIN, 2006) e invasão celular (SU et al., 2017; TANG et al., 2008), angiogênese (WANG; CHEN, 2019; GARVIN; OLLINGER; DABROSIN, 2006) e metástase (CHEN et al., 2008; YUAN et al., 2019) do câncer e se encontram atualmente em fase de estudos clínicos (códigos de identificação NCT03769766 e NCT00256334 dos estudos clínicos encontrados no site www.clinicaltrials.gov).

A diosgenina (DG) é um fitoquímico esteroidal da classe dos terpenoides e um candidado a agente farmacológico, com potenciais efeitos quimiopreventivo e quimioterápico, que atua em múltiplos alvos moleculares (SETHI et al., 2018). Além disso, esse fitoesteroide pode tanto potencializar os efeitos citotóxicos de diferentes quimioterápico como reduzir os efeitos tóxico de quimioterápicos em tecidos não alvo (LI et al., 2010; CHIANG et al., 2007. CHEN et al., 2015).

2.4.1. Diosgenina

Os terpenóides são a maior e mais diversa classe de compostos naturais com mais de 23 mil estruturas químicas conhecidas (KOBERA et al., 2014). Estruturas lineares e policíclicas de terpenóides são formadas pela condensação de unidades de isopreno (C_5), cuja síntese ocorre pela via do melanovato a partir do acetato (RUZICKA et al., 1953; MAHMOUD; CROTEAU, 2002). Os monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e triterpenos (C_{30}) são exemplos de moléculas formadas pela junção de duas, quatro e seis moléculas de isopreno, respectivamente (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

As sapogeninas são exemplos de compostos triterpênicos que, quando glicosiladas, formam outro grupo de moléculas anfifílicas conhecidas como saponinas (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Durante o processo de biossíntese das sapogeninas, algumas perdem três radicais metil ($-CH_3$), resultando na formação das sapogeninas esteroides com 27 carbonos e estrutura com seis anéis (AGOSTINI-COSTA et al., 2012; SPARG; LIGHT; STADEN, 2004).

A DG ($C_{27}H_{42}O_3$) (Figura 8) é uma sapogenina esteroide encontrada em plantas como Feno-grego (*Trigonella foenum-graecum* L.), *Heterosmilax yunnanensis*, *Costus speciosus* e em diferentes espécies de plantas do gênero *Dioscorea* (*D. zingiberensis*, *D. septemloba* e *D. collettii*) (CHAUDHARY et al., 2018; JAHFAR et al., 2008; YI et al., 2014). As plantas produzem diferentes saponinas a partir da glicosilação da DG (ex. dioscina), assim a sua obtenção ocorre por meio de reações de hidrólise ácida, básica ou enzimática (CAI et al., 2020; TAYLOR et al., 2000).

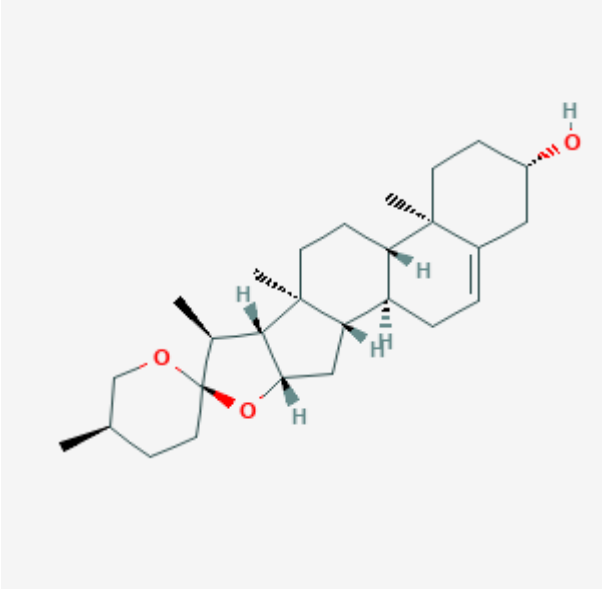


Figura 8 – Estrutura química da diosgenina.
Fonte: National Center for Biotechnology Information (2021a)

A DG apresenta grande valor econômico para indústria farmacêutica como uma molécula precursora de medicamentos esteroides, em razão de sua semelhança estrutural com os hormônios esteroides (SHEN et al., 2018). Além disso, suas amplas propriedades terapêuticas têm atraído um grande interesse científico (JESUS et al., 2016).

De acordo com estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, a DG demonstra ser um candidato farmacológico promissor para o tratamento de doenças como a aterosclerose (WU; JIANG, 2019), o diabetes (GAN et al., 2020), doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (TOHDA et al., 2012; TOHDA et al., 2013; KOH et al., 2016), a doença de Parkinson (LI et al., 2018a) e a esclerose múltipla (XIAO et al., 2012; ZEINALI et al., 2021), além de atividades antitumorais ao atuar em diferentes alvos moleculares (SETHI et al., 2018).

Os estudos *in vitro* com diferentes tipos celulares cultivados em monocamada indicam que os efeitos antitumorais da DG envolvem a regulação das oncoproteínas TAZ (CHEN et al., 2018; ZHANG et al., 2019), SKP2 (LIU et al., 2020) e NEDD4 (ZHANG et al., 2019) e da proteína supressora tumoral DDX3 (YU et al., 2018); das moléculas envolvidas nos processos celulares inflamatórios (COX2 e NF-κB) (MOLIC et al., 2001), pró-apoptóticos (caspases-3, -8 e -9, citocromo C, AIF, Bim, Bax, Bid, DR5) (LIAO et al., 2020; LI et al., 2014; KIM et al., 2012; LI et al., 2021; LAPAGE et al., 2011, LONG et al., 2019) anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e survivina) (KIM et al., 2012; LI et al., 2010), metabólicos (HGM-CoA, ácido graxo sintase, piruvato carboxilase, GLUT-3 e -4) (RAJU; BIRD, 2007; CHIANG et al., 2007; LI et al., 2021), citostáticos (ciclinas D1 e B1, Cdk-1, Cdc25C, Cdc2, p21, p27 e p53) (YU et al.,

2018; CORBIERE et al., 2003; LI et al., 2014; LIAO et al., 2020), autofágicos (mTOR, LC3-II e Beclin) (NIE et al., 2016), de angiogênese (VEGF) (CHEN et al., 2011) e de motilidade celular (MMP-2 e 9, Timp-2, TGF-β1, RhoA, VAV2, Cdc42, integrina α5, integrina β6, vimentina, fibronectina e E-caderina) (LI et al., 2021; CHEN et al., 2011; CHANG et al., 2011; HE et al., 2014; HUANG et al., 2019; LIU et al., 2020; MAO et al., 2012). Nas Tabelas 2 a 7 estão resumidos alguns dos estudos realizados com a DG em cultura de células tumorais.

Tabela 2 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer de mama.

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Liao (2020)	**Monocamada:** MCF-7 (responsiva a p53) e Hs578T (não responsiva a p53)	10-40 μM	24-48h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ G2/M e sub-G1; ↓ MMP	↓ (ptn) ciclina B, Cdc2, Bcl-2 e ↑ (ptn) p-Cdc2, p-Chk1, p-Cdc25C, citocromo c, caspase-3 (Hs578T) e -9 ativas.	**Ciclo celular:** parada G2/M por meio da modulação da via Cdc25C-Cdc2-Ciclina B. **Morte celular:** apoptose intrínseca via regulação negativa de Bcl-2.
Liu (2020a)	**Monocamada:** MCF7 e MDA-MB-231	50 e 75 μM	48-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose; ↓ invasão	↓ (ptn e mRNA) Skp2; ↑ (ptn e mRNA) p57 e FOXO1.	**Morte e motilidade celular:** Apoptose e menor invasão por inibição da expressão do oncogene SKp2.
He (2014)	**Monocamada:** MDA-MB-231	5 μM (dose não citotóxica)	24 h	↓ (MTT) viabilidade; ↓ migração; ↓ polimerização actina	↓ (ptn) p-Vav2 e GTP-Cdc42	**Motilidade celular:** menor migração foi associada a inibição da polimerização de actina, fosforilação de Vav2 e redução da ativação da GTP-Cdc42.
Chiang (2007)	**Monocamada:** AU565 (superexpressão de HER2)	5-20 μM	24h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose (sub-G1)	↑ (ptn) PARP clivada e p-JNK; ↓ (ptn) FAS, p-Akt e p-mTOR	**Morte celular:** apoptose por regulação negativa da enzima FAS (ácido graxo sintase) por meio da regulação da fosforilação de JNK, Akt e mTOR. **Observação:** efeito antiproliferativo maior da diosgenina em linhagens com maior expressão de HER2
	Monocamada: 435.eb (MDA-MB-435 modificada com superexpressão de HER2)	20 μM + 5-20 nM (paclitaxel)	24h	↓ (MTT) viabilidade	-	Citotoxicidade induzida pelo paclitaxel foi aumentada. Efeito não observado em células com baixa expressão de HER2. Hipótese: inibição de FAS pela diosgenina aumentou a sensibilidade das células ao quimioterápico.

(Continua)

Tabela 2 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer de mama. (Continuação)

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Srinivasan (2009)	**Monocamada:** MCF-7 e MDA-MB-231	5-120μM	24-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ G1; ↑ apoptose	↓ (ptn) p-Akt, p-GSK-3β, XIAP, Bcl-2, survivina, Cdk-2, ciclina D1; ↔ (ptn) PI3K e p53; ↑ (ptn) p21	-
	Monocamada: MDA-MB-231				↓ (ptn) p65; p-Elk1; ↑ (ptn) IkB-α (citoplasma), Bax e caspase 3 ativa; ↔ (ptn) Raf, MEKK-1, MEK-1, MEK-4, p-MEK 1/2 e p-MEK 3/6	**Inibição de vias de sobrevivência celular:** Akt e NF-κB. **Morte celular:** apoptose com redução de XIAP, Bcl-2 e survivina e aumento de Bax e caspase 3 ativa. **Ciclo celular:** parada em G1 com redução de Cdk-2 e ciclina D1
	Monocamada: MCF-7				↓ (ptn) Raf, MEKK-1, MEK-1, MEK-4, p-MEK 1/2 e p-MEK 3/6; ↔ (ptn) Bax; ↑ (ptn) p-Elk1	**Inibição de vias de sobrevivência celular:** Akt, Raf/MEK e NF-κB. **Morte celular:** apoptose com redução de XIAP, Bcl-2 e survivina. **Ciclo celular:** parada em G1 com redução de Cdk-2 e ciclina D1
	Monocamada: MCF-10A	5-30 μM	24-72h	↔ (MTT) viabilidade; ↔ apoptose	-	-

Tabela 2 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer de mama. (Conclusão)

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Bhuvanalakshmi (2017)	**Monocamada:** linhagens MDA-MB-231, MCF7 e T47D enriquecidas com células tronco tumorais (CSC)	400 μM	24h	↓ (MTT) viabilidade (IC50 enriquecida: 400 μM/IC50 não enriquecida: 100 μM)	↑ EROs (MCF7 não avaliado), ↑ (mRNA) Caspase-3 e -7 (MCF7 não avaliado), ↑ G0/G1, ↓ (mRNA, MDA-MB-231 e T47D) K167, Ciclina D1, Bax e ABCC2; ↑ (mRNA, MDA-MB-231 e T47D), GSK3β, β-catenina, Dkk e FRP4; ↑ (ptn) p-β-catenina; ↓ (ptn) β-catenina	Inibição das células tronco tumorais por meio da via Wnt/β-catenina.
	Mamosfera: linhagens MDA-MB-231, MCF7 e T47D enriquecidas com células tronco tumorais (CSC)	400 μM		Redução no tamanho e desintegração	↓ (ptn e mRNA) CD44, ↓ (mRNA) ALDH.	

Notas: ↑ maior/aumento; ↓ menor/redução; ↔ sem efeito; MMP (potencial de membrana mitocondrial).
Fonte: O próprio autor.

Tabela 3 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer de carcinoma hepatocelular.

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Yu (2018)	**Monocamada:** HepG2 e SMMC-7721	25-100 μM	24-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose; ↑ G2/M; ↓ migração; ↓ invasão	↑ (ptn e mRNA) DDX3; ↑ (ptn) p21 e E-caderina; ↓ (ptn) Ciclina D1, Nocth-1 e β-catenina	**Ciclo celular e morte celular:** apoptose e parada de ciclo nas fases G2/M com aumento na expressão de DDX3 e p21 e redução na expressão da ciclina D1.
Kim (2012)	**Monocamada:** HepG2	10-40 μM	24-48h	↓ (MTT) viabilidade, ↑ apoptose, ↑ EROs	↑ (ptn) citocromo c, Bax, caspases -3, -8 e -9 ativas, p-p38, p-JNK e p-ASK1; ↓ (ptn) Bcl-2, PARP e Bid	**Morte celular:** apoptose pode estar associada com aumento na produção de EROs, ativação de ASK1 e das MAPKs JNK e p38
Li (2015)	**Monocamada:** HepG2, Bel-7402 e SMMC-7721	10-40 μM	24-48h	↓ (MTT) viabilidade, ↑ apoptose, ↑ G2/M	↑ (ptn e mRNA) p21 e p27; ↔ (ptn e mRNA) p53; ↓ (ptn) p-Akt; ↔ (ptn) Bax e Bcl-2; ↑ (ptn) caspases -3, -8 e -9 ativadas.	**Ciclo celular e morte celular:** Apoptose e parada nas fases G2/M com inativação de Akt, ativação de caspases e regulação positiva de p21 e p27.
Chen (2018)	**Monocamada:** HepG2	25-100 μM	48-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose; ↑ G2/M; ↓ migração; ↓ invasão	↓ (ptn) TAZ e β-catenina	**Ciclo celular e morte celular:** apoptose e parada nas fases G2/M. **Motilidade celular:** redução da migração e invasão. Efeitos antitumorais associados com a inibição do oncogene TAZ.
Cruz (2018)	**Monocamada:** HepG2	10-100 μM	24h	↓ (MTT) viabilidade, ↓ (ensaio clonogênico) proliferação, ↑ (ensaio do Cometa) danos no DNA, ↑ frequência de micronúcleos	-	**Morte celular:** apoptose pode estar associadas à indução de danos de DNA pela diosgenina

(Continua)

Tabela 3 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer de carcinoma hepatocelular. (Conclusão)

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
		10-100 μM		↓ (MTT) viabilidade, ↑ apoptose, ↑ G1	↓ (ptn) p-STAT3, STAT3 (núcleo), p-Src, p-JAK-1, p-JAK-2, Ciclina D1, Bcl-2, Bcl-xL, survivin, Mcl-1, VEGF; ↑ (ptn) SH-PTP2, caspase-3 ativa e PARP clivado	Efeitos antitumorais da diosgenina estão associados à inibição da via de sinalização STAT3
Li (2010)	**Monocamada:** C3A	25μM + 10 nM Doxorrubicina 25μM + 5 nM Paclitaxel	6-24h	↑↑ apoptose	-	Diosgenina potencializa os efeitos pró-apoptóticos dos quimioterápicos doxorrubicina e paclitaxicel
	Monocamada: HUH-7 + IL6 (indutor da fosforilação de STAT3 e Akt)	10-100 μM		-	↓ (ptn) p-STAT3, p-Akt	-

Notas: ↑ maior/aumento; ↓ menor/redução; ↔ sem efeito.
Fonte: O próprio autor.

Tabela 4 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer colorretal.

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Li (2021)	**Monocamada:** RKO (p53 selvagem) e SW1116 (p53 mutante)	10-80 μM	24h	↓ [CCK-8] proliferação, ↓ tamanho e número de colônias, ↑ apoptose, ↓ migração, ↓ invasão, ↑ EROs, ↓ MMP, ↓ metabolismo (glicólise e fosforilação oxidativa)	↑ (ptn) p53, Bax, PARP (clivado), caspase-3 (clivado) e AIF; ↓ (ptn) Bcl-2, MMP-9, GLUT-3 e -4, piruvato carboxilase (PC), p-PKA e p-CREB; ↔ MMP-13 e -19	**Morte celular:** apoptose intrínseca com aumento de Bax, AIF, PARP, CASP-3 e p53 e redução de Bcl-2. **Motilidade celular:** redução da migração e invasão com redução de MMP-9. **Metabolismo celular:** inibição da glicólise com redução nos transportadores de glicose (GLUT-3 e -4) e na enzima responsável pela síntese do ácido lático (PC). Todos estes efeitos podem estar associados a inibição da via cAMP/PKA/CREB.
Lepage (2011)	**Monocamada:** HT-29	20-40 μM	24h	↔ apoptose	↔ (ptn) PARP clivada e ativação CASP-8, -9, -3 e Bid; ↑ (ptn) DR5, p-p38, COX-2 e PGR2; ↓ (ptn) p-Akt.	**Morte celular:** diosgenina sensibiliza as células HT-29 à apoptose induzida pelo ligante TRAIL por meio da regulação negativa da via PI3K/Akt e ativação da via p38 MAPK com subsequente regulação positiva do receptor DR5. Aumento na expressão e atividade de COX-2 induzida pela diosgenina e TRAIL reduziu os efeitos pró-apoptóticos da combinação diosgenina + TRAIL.
		20-40 μM (diosgenina + TRAIL)		↑ apoptose	↑ (ptn) PARP clivada e ativação Caspases-8, -9, -3 e Bid, p-p38, COX-2 e PGR2; ↓ (ptn) p-Akt	
Lepage (2010)	**Monocamada:** HT-29 e HT-116	40 μM	24-48h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose	↑ (ptn) Caspase-3 (atividade), ↑ PARP clivada (HCT-116), COX-2 (HT-29, atividade e expressão), 5-LOX (HT-29, atividade e expressão; HT-116, atividade); ↑ fragmentos de DNA	**Morte celular:** inibir a COX-2 na linhagem HT-29 aumenta a sensibilidade à apoptose e para a HCT-116 aumenta a resistência à apoptose. Inibir 5-LOX aumenta a resistência à apoptose para ambas as linhagens.

(Continua)

Tabela 4 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de câncer colorretal. (Conclusão)

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Raju (2007)	**Monocamada:** HT-116	20-100 μM	24-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose	↑ fragmentos do DNA, ↑ (ptn) PARP clivado, ↓ (ptn e mRNA) HMG-CoA redutase; ↓ (ptn) p21 ras, β-catenina	**Morte celular:** apoptose com aumento na clivagem de PARP. **Tumorigênese:** a inibição de p21 ras e β-catenina pode estar associada a supressão de eventos moleculares precoces na tumorigênese do cólon. Os efeitos no crescimento e apoptose celular podem estar associados com a inibição da enzima que participa da biossíntese do colesterol, HMG-CoA.
Raju (2004)	**Monocamada:** HT-29	20-100 μM	24h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose	↓ (ptn) Bcl-2; ↑ (ptn) Caspase-3	**Morte celular:** apoptose por meio da modulação da expressão das proteínas Bcl-2 e caspase-3.

Notas: ↑ maior/aumento; ↓ menor/redução; ↔ sem efeito; MMP (potencial de membrana mitocondrial).
Fonte: O próprio autor.

Tabela 5 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de osteossarcoma.

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Huang (2019)	**Monocamada:** MG63 e U2OS	6,25-200 μM	12-24h	↓ (MTT) viabilidade, ↓ migração, ↓ invasão,	↓ (ptn e mRNA) TGF-β1, ↓ (ptn) p-p38, ↓ (mRNA) p38; ↑ (ptn e mRNA) E-caderina	**Motilidade celular:** redução da migração e invasão por meio da inibição da EMT com regulação negativa do TGF-β1 e positiva da E-caderina. A inibição da EMT associa-se com a inibição da via MAPK.
Moalic (2001)	**Monocamada:** 1547	10-100 μM	24-96h	↓ (MTT) viabilidade, ↑ G1, ↑ apoptose, ↑ atividade de COX	↑ (mRNA) p21, p53 e hsp70; ↓ (mRNA) Bax, bcl-2 e COX-2; ↑ (ptn) bax/bcl-2 e NF-κB (núcleo)	**Ciclo celular e morte celular:** parada em G1 e apoptose com aumentos em p53, p21, na razão bax/bcl-2, hsp70, ativação de NF-κB e atividade de COX-2.
Corbiere (2003)	**Monocamada:** 1547	40 μM	24-96h	↓ (MTT) viabilidade e ↑ apoptose	↑ (ptn e mRNA) p53; ↑ (mRNA) p21; ↑ (ptn) PPARγ; ↑ ligação de NF-κB no DNA	**Morte celular:** apoptose com aumento em p53 e ativação de NF-κB.
Long (2019)	**Monocamada:** U2OS e MG63	40-160 μM	48-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose; ↓ migração; ↓ invasão	↓ (ptn e mRNA) Cdc20, ↑ (ptn) p21 e Bim	Diosgenina inibe o crescimento, a migração e invasão e induz a apoptose regulando negativamente Cdc20.

Notas: ↑ maior/aumento; ↓ menor/redução; ↔ sem efeito.
Fonte: O próprio autor.

Tabela 6 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de próstata.

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Zhang (2019)	**Monocamada:** PC-3	25-100 μM	48-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ G2/M; ↑ apoptose; ↓ migração; ↓ invasão	↓ (ptn) NEDD4, TAZ e p-Akt; ↑ (ptn) p73 e LATS1	**Morte e motilidade celular:** apoptose e inibição da migração e invasão por meio da regulação negativa de NEDD4
Nie (2016)	**Monocamada:** DU145	0.6, 3 e 15 μg/ml	48h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose; ↑ autofagia	↑ (ptn) LC3-II e caspase 9; ↓ (ptn) p-PI3K, p-Akt e p-mTOR; ↑ (mRNA) Beclin; ↓ (mRNA) Bcl-2	**Morte celular e autofagia:** aumento na apoptose e autofagia podem estar associadas com a inibição da via PI3K/Akt/mTOR. A inibição da autofagia reduz a citotoxidade e a indução de morte pela diosgenina.
Sun (2020)	**Monocamada:** PC-3	250-1000 μM	24h	↑ [Ca2+] intracelular (não observado em células MG63 e OC2); ↓ viabilidade	-	**Aumento [Ca2+]i:** Libração de Ca2+ por meio do retículo endoplasmático regulado pela fosfolipase C e influxo de Ca2+ operado por armazenamento dependente de PKC. Efeito não associado com a citotoxicidade da diosgenina.
Chen (2011)	**Monocamada:** PC-3	5-30 μM	24-48h	↓ [MTT] viabilidade, ↓ migração, ↓ invasão; ↓ angiogênese	↓ (ptn) MMP-2 e -9 (atividade e expressão), p-PI3K, p-ERK 1/2, p-Akt, p-JNK 1/2 e NF-κB (núcleo); ↑ (ptn) IκBα (citoplasmático); ↓ (mRNA) MMP-2, -7 e -9, EMMPRIN e VEGF; ↑ (mRNA) TIMP-2.	**Motilidade celular:** redução da migração e invasão que pode estar associada à inibição da expressão e atividade das MMPs 2 e 9 pela diosgenina por meio da inibição das vias ERK, JNK e PI3K/Akt e da atividade de NF-κB. **Angiogênese:** inibição da formação de tubo pelas células HUVEC induzida pelas células PC-3 que pode estar associada à inibição da expressão do VEGF. **Observação:** os efeitos na angiogênese e motilidade ocorreram em doses não citotóxicas (↓ 20 μM).

(Continua)

Tabela 6 – Efeitos antitumorais da diosgenina em células de próstata. (Conclusão)

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Chang (2011)	**Monocamada:** DU145	1-10 μM (diosgenina + HGF)	1-22h	↓ espalhamento (Scattering Assay); ↓ migração; ↓ invasão	↓ (ptn) Vimentina, Mdm2, p-Akt, p-mTOR e c-Met; ↔ (ptn) E-caderina;	**Motilidade celular:** redução da migração e invasão induzida pelo HGF ao prevenir a EMT por meio da inibição da fosforilação de Akt e mTOR.

Notas: ↑ maior/aumento; ↓ menor/redução; ↔ sem efeito.
Fonte: O próprio autor.

Tabela 7 - Efeitos antitumorais da diosgenina em células tumorais de outros tipos.

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Rahmati-Yamchi (2013)	**Monocamada:** A549 (pulmão)	10-60 μM	24-72h	↓ (MTT) viabilidade	↓ (mRNA) hTERT	Inibição do gene *TERT* que expressa a proteína transcriptase reversa da telomerase, que é um dos constituintes da enzima telomerase
Mao (2019)	**Monocamada:** SK-ChA1, HuH28, RIBE, Mz-ChA-1 w (apenas ensaio de viabilidade), HuCCT1 e QBC939 (Colangiocarcinoma)	5-40 μM	24-72h	↓ (MTS) viabilidade, ↓ do número de colônias, ↑ G2/M, ↑ apoptose, ↓ MMP	↑ (ptn e mRNA) p21; ↓ (ptn e mRNA) ciclina B1; ↑ (ptn) Bax/Bcl-2, PARP-1 clivada, CASP-3 ativada, citocromo C citoplasmática; ↓ (ptn) p-GSK3β	**Ciclo celular:** parada em G2/M com aumento em p21 e redução na ciclina B1. **Morte celular:** apoptose intrínseca com liberação de citocromomo C para o citoplasma, aumento da CASP3 e PARP-1 clivados e da razão Bax/Bcl-2 e inibição da atividade de GSK3β
Corbiere (2004)	HEp-2 (laringocarcinoma)	20-100 μM	24-96h	↓ (MTT) viabilidade, ↑ S, ↑ apoptose, ↓ MMP	↔ (ptn) p53, ↑ (ptn) p-p53, acúmulo de AIF no núcleo, atividade das caspases -3 e -9 e PARP clivada	**Ciclo celular e morte celular:** parada em S (Hep-2) e G2/M (M4Beu) e apoptose com redução do MMP, liberação de AIF e ativação da caspase-3.
	M4Beu (melanoma)			↓ (MTT) viabilidade, ↑ G2/M, ↑ apoptose, ↓ MMP	↓ (ptn) p53, ↑ (ptn) p-p53, bax/bcl-2, ↑ acúmulo de AIF no núcleo, atividade das caspases -3 e -9 e PARP clivada	
Mao (2012)	**Monocamada:** BGC-823 (tratadas com cloreto de cobalto - indutor de hipóxia) (câncer gástrico)	10 μM	24-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↓ invasão	↓ (ptn) integrina α5 e E-caderina; ↑ (ptn) integrina β6	**Motilidade celular:** a inibição da invasão pode estar associada a regulação das moléculas de adesão integrina α5, E-caderina e integrina β6. Estes efeitos foram superiores na presença de inibidor de HIF-1α.

(Continua)

Tabela 7 - Efeitos antitumorais da diosgenina em células tumorais de outros tipos.

(Conclusão)

Primeiro autor e ano	Modelo experimental utilizado	Doses testadas	Tempos avaliados	Efeitos observados	Biomarcadores avaliados (genes e proteínas)	Mecanismos de ação encontrados
Liu (2020b)	**Monocamada:** AGS e SGC-7901 (câncer gástrico)	1-32 μM (diosgenina + GSK126 - inibidor de EZH2)	24-72h	↓ (CCK-8) proliferação; ↑ G1/G0; ↑ apoptose; ↓ migração; ↓ invasão	↓ (ptn) EZH2, RhoA, ROCK, N-caderina, vimentina e fibronectina; ↑ (ptn) E-caderina	Efeito supressivo sinérgico da diosgenina combinada com o inibidor de EZH2, GSK16, na proliferação, migração e invasão celular. Estes efeitos podem estar associados a inibição da transição epitélio-mesenquimal mediada por EZH2 via RhoA/ROCK
Hernández-Vázquez (2020)	**Monocamada:** HeLa e CaSki (câncer cervical)	20-80 μM	24h	↓ (cristal violeta) proliferação, ↔ necrose, ↑ apoptose	↑ (ptn) caspases-3, -8 e -9 ativadas	**Morte celular:** indução da apoptose com ativação das caspases -3, -8 e -9.
Stefanowicz-Hajduk (2021)	**Monocamada:** HeLa e SKOV-3 (câncer ovário)	1-50 μg/mL	24h	↓ (MTT e RTCA) viabilidade	-	-
Huo (2004)	**Monocamada:** Hela (câncer cervical)	15-120 μM	12-36h	↓ (MTT) viabilidade, ↑ apoptose, ↑ sub-G0/G1, ↓ MMP	↑ (ptn) caspase-3; ↔ (ptn) caspase-8; ↓ (ptn) Bcl-2	**Morte celular:** apoptose por meio da ativação das caspases -3 e -9.
Guo (2019)	**Monocamada:** Patu8988 e Panc-1 (câncer de pâncreas)	25-100 μM	48-72h	↓ (MTT) viabilidade; ↑ apoptose; ↑ G2/M; ↓ migração; ↓ invasão	↓ (ptn e mRNA) EZH2; ↓ (ptn) vimentina; ↑ (ptn) PTEN	**Ciclo celular e morte celular:** apoptose e parada nas fases G2/M. **Motilidade celular:** redução na migração e invasão. Estes efeitos estão associados com a inibição de EZH2.

Notas: ↑ maior/aumento; ↓ menor/redução; ↔ sem efeito.

Fonte: O próprio autor.

A DG se destaca ainda pela sua capacidade em atuar de maneira seletiva nas células tumorais (LIAO et al., 2020; LIU et al., 2020; LI et al., 2021), inibir as células tronco do câncer, conhecidas por sua quimioresistência (BHUVANALAKSHMI et al., 2017) e potencializar os efeitos antitumorais dos quimioterápicos paclitaxel (CHANG et al., 2007; LI et al., 2010) e doxorrubicina (LI et al., 2010). Os estudos indicam que a associação da DG a esse último quimioterápico pode ser uma estratégia eficaz na terapia do câncer, pois a DG aumentou os efeitos pró-apoptóticos da doxorrubicina nas células C3A de carcinoma hepatocelular (LI et al., 2010) e reduziu os efeitos cardiotóxicos desse quimioterápico em roedores (CHEN et al., 2015).

Apesar da DG apresentar baixa toxicidade em diferentes tecidos nos estudos com roedores (LI et al., 2021; MAO et al., 2019), sabe-se que essa sapogenina esteroide é capaz de aumentar a frequência de micronúcleos e de gerar danos ao DNA em células metabolizadoras de carcinoma hepatocelular (HepG2), o que sinaliza a necessidade de estudos toxicológicos para uma melhor compreensão do potencial genotóxico dessa molécula (CRUZ et al., 2018). Outro fator que pode limitar o uso clínico da DG é a sua baixa biodisponibilidade oral demonstrada em estudos farmacológicos com roedores e humanos (OKAWARA et al., 2014; CAYEN et al., 1979). A baixa biodisponibilidade da DG pode estar associada à sua baixa solubilidade em água (0,7 ng/mL) e a sua extensa biotransformação enzimática (OKAWARA et al., 2013; CAYEN et al., 1979).

2.5 Cultura Celular Tridimensional (3D)

As pesquisas inclinadas ao desenvolvimento de novos fármacos totalizam, desde a concepção de uma ideia original até o lançamento de um produto final, um alto consumo de recursos financeitos e de tempo, podendo atingir de 12 a 15 anos de estudos. Somado a isso, uma grande porcentagem dos candidatos farmacológicos que foram bem-sucedidos nos testes pré-clínicos falha nos estudos clínicos (HUGHES et al., 2011). Para exemplificar, nos ensaios clínicos de fase II e III, mais da metade das falhas são associadas à eficácia e cerca de um terço à segurança dos compostos testados, sendo a oncologia a área terapêutica com maior participação nestas falhas (29,5%) (ARROWSMITH; MILLER, 2013).

Em geral, os testes pré-clínicos de candidados farmacológicos são inicialmente conduzidos em modelos de estudos *in vitro*, principalmente em células cultivadas em monocamada (bidimensional ou 2D) e, posteriormente em modelos animais (*in vivo*) (LANGHANS, 2018). No modelo de cultura em 2D, as células crescem e se proliferam aderidas

a uma superfície plana e rígida, condição essa considerada pouco fisiológica e pouco representativa do complexo microambiente tecidual em que as células estão naturalmente inseridas (LANGHANS, 2018). Como efeito, as respostas biológicas coletadas nesse modelo nem sempre encontram correspondência com aquelas coletadas *in vivo* (RAVI et al., 2015). Desta maneira, existe um esforço científico para aperfeiçoar os modelos de cultura de células, no sentido de estreitar a lacuna existente entre os modelos de cultura 2D e *in vivo* nos testes de fármacos candidatos, tornando-os fisiologicamente mais representativos (RAVI et al., 2015).

É nesse cenário que os sistemas de cultura tridimensional (3D) foram desenvolvidos. O modo tridimensional com que as células se organizam nessas culturas celulares mimetiza diferentes características do tecido humano como a morfologia natural das células, as interações célula-célula e célula-matriz extracelular (EDMONDSON et al., 2014). Estas características tecido-específicas influenciam na expressão de genes e proteínas (KENNY et al., 2007; MELISSARIDOU et al., 2019), na sensibilidade a compostos químicos (MELISSARIDOU et al., 2019; GASKELL et al., 2016) e na proliferação, diferenciação e metabolismo celular (LAGIES et al., 2020; GASKELL et al., 2016). Por estas razões, as culturas celulares 3D ganham destaque no estudo da eficácia e toxicidade de candidados farmacológicos ao fornecer dados fisiologicamente mais relevantes e preditivos para os modelos de estudo *in vivo* (RAVI et al., 2015; EDMONDSON et al., 2014).

Diferentes técnicas podem ser empregadas para a obtenção de diferentes modelos de cultura 3D, sendo comuns aquelas destinadas à obter agregados celulares de formato esférico, conhecidos como esferoides (EDMONDSON et al., 2014). Uma dessas técnicas é conhecida como técnica de sobreposição líquida (LOT) (METZGER et al., 2011), uma técnica de baixo custo e fácil manuseio, a qual se baseia no cultivo celular em uma superfície não aderente formada por diferentes materiais como o ágar ou a agarose (YUHAS et al., 1977; METZGER et al., 2011). A superfície não aderente permite a formação de interações célula-célula, levando a formação de esferoides (COSTA et al., 2018). Esta técnica pode ser utilizada para a obtenção de esferoides de células tumorais e serve de modelo para o estudo das propriedades antitumorais de diferentes compostos naturais (BEHESHTI et al., 2021; SALEHI et al., 2020; JAMALI; KAVOOSI; ARDESTANI, 2020).

Os esferoides tumorais além de apresentarem características tecido-específicas, também melhor representam a heterogeneidade de células observadas em tumores sólidos *in vivo* (EDMONDSON et al., 2014). A ausência de vasculatura nos esferoides mimetiza uma limitação observada em áreas pouco vascularizadas de tumores sólidos em relação a difusão de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento para o interior e a difusão de metabólitos para o

exterior do aglomerado de células, favorecendo a formação de três camadas celulares distintas: uma zona de proliferação celular externa, uma zona de células quiescentes intermediária e um núcleo de células necróticas interna (EDMONDSON et al., 2014; ZANONI et al., 2016) (Figura 9). Tal limitação é agravada quanto maior o volume e grau de compactação dos esferoides (IMAMURA et al., 2015).

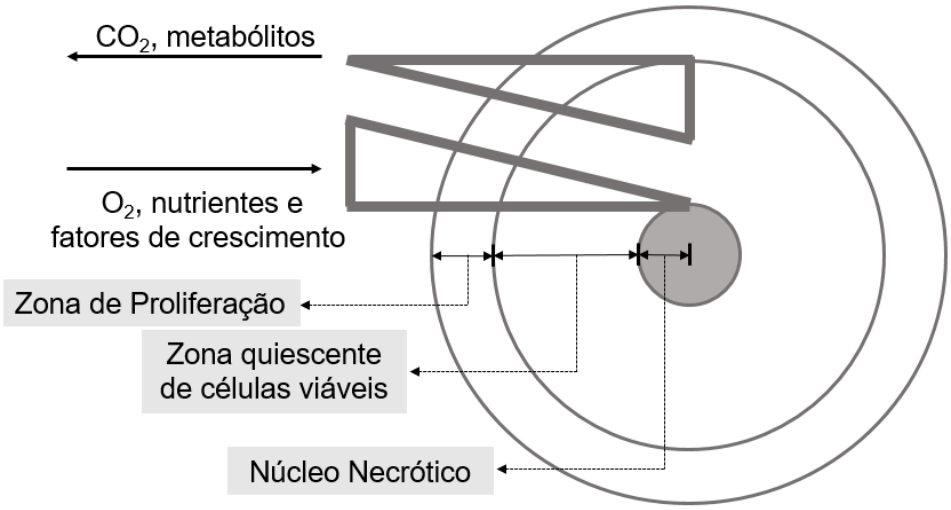


Figura 9 – Representação do microambiente dentro de um esferoide. A zona de células proliferativas, a zona quiescente de células viáveis e o núcleo necrótico são formados pela redução gradativa da difusão de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento para dentro do esferoide e redução gradativa da difusão de metabólitos e gás carbônico para fora do esferoide.
Fonte: LIN; CHANG, 2008 com modificações.

A difusão limitada de oxigênio ainda cria uma condição de hipóxia que favorece adaptações celulares semelhantes àquelas observadas em tumores *in vivo* que resultam em uma maior predominância no metabolismo glicolítico (RODRÍGUES-ENRÍQUEZ et al., 2008; WARTENBERG et al., 2010; KHAITAN et al., 2006) e em uma maior resistência a quimioterápicos ao provocar um aumento na população de células em G0 e regular negativamente fatores pró-apoptóticos (IMAMURA et al., 2015) e positivamente transportadores de efluxo de fármacos, como a glicoproteína P (WARTENBERG et al., 2010). Ademais, também é observada uma distribuição e exposição desigual de compostos químicos nas células dos esferoides em razão da organização tridimensional das céluals (EDMONDSON

et al., 2014). Sendo assim, os esferoides celulares figuram como um importante modelo *in vitro* para o estudo das propriedades anticâncer de compostos químicos.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antiproliferativos da diosgenina (DG) nas células de carcinoma pulmonar NCI-H460 em modelos de cultura 2D e 3D.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar as concentrações inibitórias 12,5, 25 e 50 da DG por meio do uso do indicador metabólico de células vivas, resazurina, em cultura 2D.
- ✓ Investigar a atividade da DG em interferir no ciclo celular e em induzir morte celular em cultura 2D
- ✓ Verificar a propriedade da DG em induzir multinucleação em cultura celular 2D.
- ✓ Avaliar o potencial da DG de indução de estresse oxidativo e de danos no DNA em cultura 2D.
- ✓ Avaliar os mecanismos moleculares antiproliferativos da DG, por meio da quantificação de transcritos de genes alvo em cultura 2D.
- ✓ Avaliar a atividade da DG em inibir a proliferação celular em cultura 3D de esferoides, por meio da avaliação do volume, morte celular, recuperação da proliferação e o crescimento clonogênico das células.

REFERÊNCIAS

A BAUDINO, Troy. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. **Current drug discovery technologies**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2015.

ABE, Satoshi et al. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. **Genes & development**, v. 25, n. 8, p. 863-874, 2011.

AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Secondary metabolites. In: DHANARASU, S. **Chromatography and its applications**. Rijeka: InTech, 2012. p. 131-164.

ALBERTS, Bruse et al. Ciclo Celular. *In:* ALBERTS, Bruse et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6º ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 963-979.

ARROWSMITH, John; MILLER, Philip. Trial watch: phase II and phase III attrition rates 2011-2012. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 8, p. 569, 2013.

ARRUEBO, Manuel et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. **Cancers**, v. 3, n. 3, p. 3279-3330, 2011.

AYLON, Yael; OREN, Moshe. p53: guardian of ploidy. Molecular oncology, v. 5, n. 4, p. 315-323, 2011.

BAKER, Dwight D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural product reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.

BAXEVANOS, Panagiotis; MOUNTZIOS, Giannis. Novel chemotherapy regimens for advanced lung cancer: have we reached a plateau?. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 8, 2018.

BEHESHTI, F. et al. Anticancer Activity of Ipomoea purpurea Leaves Extracts in Monolayer and Three-Dimensional Cell Culture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

BHUVANALAKSHMI, G. et al. Breast cancer stem-like cells are inhibited by diosgenin, a steroidal saponin, by the attenuation of the Wnt β-catenin signaling via the Wnt antagonist secreted frizzled related protein-4. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 124, 2017.

BLAGOSKLONNY, Mikhail V. Cell cycle arrest is not senescence. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 2, p. 94, 2011.

CAI, Bangrong et al. Therapeutic potential of diosgenin and its major derivatives against neurological diseases: recent advances. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020.

CAPPELL, Steven D. et al. EMI1 switches from being a substrate to an inhibitor of APC/CCDH1 to start the cell cycle. **Nature**, v. 558, n. 7709, p. 313-317, 2018.

CAYEN, Mitchell N. et al. Studies on the disposition of diosgenin in rats, dogs, monkeys and man. **Atherosclerosis**, v. 33, n. 1, p. 71-87, 1979.

CHANG, Donald C.; XU, Naihan; LUO, Kathy Q. Degradation of cyclin B is required for the onset of anaphase in Mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37865-37873, 2003.

CHANG, Hsiang-Yu et al. Diosgenin suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial–mesenchymal transition by down-regulation of Mdm2 and vimentin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5357-5363, 2011.

CHAUDHARY, Spandan A. et al. Validation of a method for diosgenin extraction from fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.). **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 17, n. 4, p. 377-385, 2018.

CHEE, Mark K.; HAASE, Steven B. B-cyclin/CDKs regulate mitotic spindle assembly by phosphorylating kinesins-5 in budding yeast. PLoS genetics, v. 6, n. 5, p. e1000935, 2010.

CHEN, Chih-Tai et al. In vivo protective effects of diosgenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 4938-4954, 2015.

CHEN, Jun et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. **Neoplasia**, v. 2, n. 3, p. 235-241, 2000.

CHEN, Pin-Shern et al. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20164, 2011.

CHEN, Zhize et al. Diosgenin inhibited the expression of TAZ in hepatocellular carcinoma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 503, n. 3, p. 1181-1185, 2018.

CHEN, Zhize et al. Diosgenin inhibited the expression of TAZ in hepatocellular carcinoma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 503, n. 3, p. 1181-1185, 2018.

CHIANG, Chun-Te et al. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. **FEBS letters**, v. 581, n. 30, p. 5735-5742, 2007.

CHOI, Yoon J.; ANDERS, Lars. Signaling through cyclin D-dependent kinases. **Oncogene**, v. 33, n. 15, p. 1890-1903, 2014. (choi, 2013).

CHOUDHARI, Amit S. et al. Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1614, 2020.

CLUTE, Paul; PINES, Jonathon. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. **Nature cell biology**, v. 1, n. 2, p. 82-87, 1999.

CORBIERE, Cecile et al. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. **International journal of oncology**, v. 22, n. 4, p. 899-905, 2003.

COSTA, Elisabete C. et al. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: Considerations and practical approaches. **Biotechnology journal**, v. 13, n. 1, p. 1700417, 2018.

CRNCEC, Adrijana; HOCHEGGER, Helfrid. Triggering mitosis. **FEBS letters**, v. 593, n. 20, p. 2868-2888, 2019.

DEN ELZEN, Nicole; PINES, Jonathon. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. **The Journal of cell biology**, v. 153, n. 1, p. 121-136, 2001.

DEWHURST, Sally M. et al. Tolerance of Whole-Genome Doubling Propagates Chromosomal Instability and Accelerates Cancer Genome EvolutionGenome Doubling Accelerates Cancer Evolution. **Cancer discovery**, v. 4, n. 2, p. 175-185, 2014.

EMON, Bashar et al. Biophysics of tumor microenvironment and cancer metastasis-a mini review. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 279-287, 2018.

FERLAY, Jacques et al. **Global Cancer Observatory:** Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020a. Disponívem em: https://gco.iarc.fr/today. Acesso em: 13 out. 2022.

FERLAY, Jacques et al. **Global Cancer Observatory:** Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020b. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow. Acesso em: 13 out. 2022.

FISCHER, Martin et al. Coordinating gene expression during the cell cycle. **Trends in Biochemical Sciences**, 2022.

FUJIWARA, Takeshi et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1043-1047, 2005.

GALOFRÉ, Claudia et al. Tetraploidy-associated genetic heterogeneity confers chemo-radiotherapy resistance to colorectal cancer cells. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1118, 2020.

GAN, Qingxia et al. The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 198, p. 105575, 2020.

GARG, Himani et al. Survivin: a unique target for tumor therapy. **Cancer cell international**, v. 16, n. 1, p. 1-14, 2016.

GASKELL, Harriet et al. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. **Toxicology research**, v. 5, n. 4, p. 1053-1065, 2016.

GAVET, Olivier; PINES, Jonathon. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 2, p. 247-259, 2010.

GUO, Wenhao et al. Diosgenin exhibits tumor suppressive function via down-regulation of EZH2 in pancreatic cancer cells. **Cell Cycle**, v. 18, n. 15, p. 1745-1758, 2019.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HE, Zhongmei et al. Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. **Phytomedicine**, v. 21, n. 6, p. 871-876, 2014.

HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, José Misael Vicente et al. Apoptotic, necrotic, and antiproliferative activity of diosgenin and diosgenin glycosides on cervical cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 871, p. 172942, 2020.

HOU, Rui et al. Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 8, p. 1077-1082, 2004.

HUANG, Huaming et al. Diosgenin inhibits the epithelial-mesenchymal transition initiation in osteosarcoma cells via the p38MAPK signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 18, n. 4, p. 4278-4287, 2019.

HUGHES, James P. et al. Principles of early drug discovery. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.

JAHFAR, M. et al. Assay of steroidal sapogenin in Costus speciosus rhizomes. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 1382, 2008.

JAMALI, Tahereh; KAVOOSI, Gholamreza; ARDESTANI, Susan K. In-vitro and in-vivo anti-breast cancer activity of OEO (Oliveria decumbens vent essential oil) through promoting the apoptosis and immunomodulatory effects. **Journal of ethnopharmacology**, v. 248, p. 112313, 2020.

JESUS, Mafalda et al. Diosgenin: recent highlights on pharmacology and analytical methodology. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2016, 2016.

KABERA, Justin N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.

KATSUNO, Yuko et al. Cyclin A–Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 9, p. 3184-3189, 2009.

KENNY, Paraic A. et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular oncology**, v. 1, n. 1, p. 84-96, 2007.

KHAITAN, Divya et al. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. **Journal of translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2006.

KOH, Eun-Kyoung et al. Beneficial effect of diosgenin as a stimulator of NGF on the brain with neuronal damage induced by Aβ-42 accumulation and neurotoxicant injection. **Laboratory Animal Research**, v. 32, n. 2, p. 105-115, 2016.

KOH, Yen-Chun; HO, Chi-Tang; PAN, Min-Hsiung. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. **journal of food and drug analysis**, v. 28, n. 1, p. 14-37, 2020.

LACROIX, Benjamin; MADDOX, Amy Shaub. Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. **The Journal of pathology**, v. 226, n. 2, p. 338-351, 2012.

LAGIES, Simon et al. Cells grown in three-dimensional spheroids mirror in vivo metabolic response of epithelial cells. **Communications biology**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2020.

LAMERS, Fieke et al. Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. **Endocrine Related Cancer**, v. 18, n. 6, p. 657, 2011.

LANGHANS, Sigrid A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 6, 2018.

LEE, Hyun O.; DAVIDSON, Jean M.; DURONIO, Robert J. Endoreplication: polyploidy with purpose. **Genes & development**, v. 23, n. 21, p. 2461-2477, 2009.

LENS, Susanne; MEDEMA, René H. Cytokinesis defects and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 1, p. 32-45, 2019.

LEPAGE, C. et al. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. **Cancer letters**, v. 301, n. 2, p. 193-202, 2011.

LEPAGE, Clemence et al. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways in diosgenin-induced apoptosis in HT-29 and HCT-116 colon cancer cells. **International journal of oncology**, v. 36, n. 5, p. 1183-1191, 2010.

LI, Bingyu et al. Diosgenin attenuates lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease by inhibiting the TLR/NF-κB pathway. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, n. 3, p. 943-955, 2018.

LIAO, Wen-Ling et al. Induction of G2/M phase arrest by diosgenin via activation of Chk1 kinase and Cdc25C regulatory pathways to promote apoptosis in human breast cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 172, 2019.

LIMAS, Juanita C.; COOK, Jeanette Gowen. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. **FEBS letters**, v. 593, n. 20, p. 2853-2867, 2019.

LIU, Enbo et al. Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17283-17288, 2004.

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

LIU, Shanshan et al. Diosgenin and GSK126 produce synergistic effects on epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer cells by mediating EZH2 via the Rho/ROCK signaling pathway. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 5057, 2020.

LIU, Yanling et al. Diosgenin exerts antitumor activity via downregulation of Skp2 in breast cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020a.

LORDIER, Larissa et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 112, n. 8, p. 3164-3174, 2008.

LUKAS, Claudia et al. Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 815-818, 1999.

MAHMOUD, Soheil S.; CROTEAU, Rodney B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in plant science**, v. 7, n. 8, p. 366-373, 2002.
MALUMBRES, Marcos. Cyclin-dependent kinases. **Genome biology**, v. 15, n. 6, p. 1-10, 2014.

MAO, Xiao-Mei et al. Diosgenin suppresses cholangiocarcinoma cells via inducing cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 9093, 2019.

MAO, Zhu-Jun et al. Anti-proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1α shRNAs. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 5, p. 6521-6533, 2012.

MATTHEWS, Helen K.; BERTOLI, Cosetta; DE BRUIN, Robertus AM. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 74-88, 2022.

MC GEE, Margaret M. Targeting the mitotic catastrophe signaling pathway in cancer. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

MELISSARIDOU, Styliani et al. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. **Cancer cell international**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019.

MENDOZA, Nadia; SILVA, Eleazar M. Escamilla. Introduction to phytochemicals: secondary metabolites from plants with active principles for pharmacological importance. **Phytochemicals: Source of antioxidants and role in disease prevention**, v. 25, 2018.

MOALIC, Sandra et al. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. **FEBS letters**, v. 506, n. 3, p. 225-230, 2001.

MOHAMMAD, Rahmati Yamchi et al. Diosgenin inhibits hTERT gene expression in the A549 lung cancer cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 11, p. 6945-6948, 2013.

MORITA, Eiji et al. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. **The EMBO journal**, v. 26, n. 19, p. 4215-4227, 2007.

NAKAYAMA, Yuji et al. Cytokinesis failure leading to chromosome instability in v-Src-induced oncogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 811, 2017.

NAKAYAMA, Yuji et al. Genistein induces cytokinesis failure through RhoA delocalization and anaphase chromosome bridging. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 4, p. 763-771, 2014.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIE, Chao et al. Diosgenin-induced autophagy and apoptosis in a human prostate cancer cell line. **Molecular medicine reports**, v. 14, n. 5, p. 4349-4359, 2016.

OKAWARA, Masaki et al. Enhancement of diosgenin distribution in the skin by cyclodextrin complexation following oral administration. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 36-40, 2013.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93-115, 2017.

PENNYCOOK, Betheney R.; BARR, Alexis R. Restriction point regulation at the crossroads between quiescence and cell proliferation. **FEBS letters**, v. 594, n. 13, p. 2046-2060, 2020.

PYE, Cameron R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

RAJU, Jayadev et al. Diosgenin, a steroid saponin of Trigonella foenum graecum (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 8, p. 1392-1398, 2004.

RAVI, Maddaly et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.

RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, Sara et al. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. **Journal of cellular physiology**, v. 216, n. 1, p. 189-197, 2008.

RUZICKA, Leopold. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia**, v. 9, n. 10, p. 357-367, 1953.

SACKTON, Katharine L. et al. Synergistic blockade of mitotic exit by two chemical inhibitors of the APC/C. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 646-649, 2014.

SALEHI, Fahimeh et al. Stabilization of Zataria essential oil with pectin-based nanoemulsion for enhanced cytotoxicity in monolayer and spheroid drug-resistant breast cancer cell cultures

and deciphering its binding mode with gDNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3645-3655, 2020.

SETHI, Gautam et al. Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: a comprehensive and critical review. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 645, 2018.

SHEN, Liang et al. Predicting the potential global distribution of diosgenin-contained Dioscorea species. **Chinese medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2018.

SINGH, Rambir et al. Phytochemicals in antidiabetic drug discovery. **J Biomed Ther Sci**, v. 1, p. 1-33, 2014.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.

SRINIVASAN, Sowmyalakshmi et al. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 4, p. 961-967, 2009.

SUN, Gwo-Ching; JAN, Chung-Ren; LIANG, Wei-Zhe. Exploring the impact of a naturally occurring sapogenin diosgenin on underlying mechanisms of Ca2+ movement and cytotoxicity in human prostate cancer cells. **Environmental toxicology**, v. 35, n. 3, p. 395-403, 2020.

TAYLOR, Wesley G. et al. Microdetermination of diosgenin from fenugreek (Trigonella foenum-graecum) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5206-5210, 2000.

TEMME, Achim et al. Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 1, p. 78-92, 2003.

TERZI, Menderes Yusuf; IZMIRLI, Muzeyyen; GOGEBAKAN, Bulent. The cell fate: senescence or quiescence. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 11, p. 1213-1220, 2016.

TOHDA, Chihiro et al. Diosgenin is an exogenous activator of 1, 25D3-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. **Scientific reports**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2012.

TOHDA, Chihiro et al. Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1, 25D3-MARRS. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

TOPACIO, Benjamin R. et al. Cyclin D-Cdk4, 6 drives cell-cycle progression via the retinoblastoma protein's C-terminal helix. **Molecular cell**, v. 74, n. 4, p. 758-770. e4, 2019.

TRAVIS, William D. et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. **Journal of thoracic oncology**, v. 10, n. 9, p. 1243-1260, 2015.

VELMURUGAN, Bharath Kumar et al. Neuroprotective role of phytochemicals. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2485, 2018.

WANG, Zhixiang. Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3327, 2021.

WARTENBERG, Maria et al. Glycolytic pyruvate regulates P-Glycoprotein expression in multicellular tumor spheroids via modulation of the intracellular redox state. **Journal of cellular biochemistry**, v. 109, n. 2, p. 434-446, 2010.

WATANABE, Shunsuke et al. Polyphyllin D, a steroidal saponin in Paris polyphylla, induces apoptosis and necroptosis cell death of neuroblastoma cells. **Pediatric surgery international**, v. 33, p. 713-719, 2017.

WELCH, Danny R.; HURST, Douglas R. Defining the hallmarks of metastasis. **Cancer research**, v. 79, n. 12, p. 3011-3027, 2019.

WU, Fang-Chun; JIANG, Jian-Guo. Effects of diosgenin and its derivatives on atherosclerosis. **Food & function**, v. 10, n. 11, p. 7022-7036, 2019.

XIAO, Lin et al. Diosgenin promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation through estrogen receptor-mediated ERK1/2 activation to accelerate remyelination. **Glia**, v. 60, n. 7, p. 1037-1052, 2012.

YAN, Ziqi et al. The phytochemical, corynoline, diminishes Aurora kinase B activity to induce mitotic defect and polyploidy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 147, p. 112645, 2022.

YANG, Li et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

YI, Tao et al. Comparative analysis of diosgenin in Dioscorea species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS. **BMC biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2014.

YUAN, Haidan et al. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

ZANONI, Michele et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

ZEINALI, Hossein; BALUCHNEJADMOJARAD, Tourandokht; ROGHANI, Mehrdad. Diosgenin ameliorates cellular and molecular changes in multiple sclerosis in C57BL/6 mice. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 55, p. 103211, 2021.

ZHANG, Jin et al. Diosgenin inhibits the expression of NEDD4 in prostate cancer cells. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 6, p. 3461, 2019.

ZHANG, Jing et al. Human cell polyploidization: The good and the evil. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2021.

ARTIGO

Diosgenina interfere em vias de regulação da citocinese e da necroptose para inibir a proliferação de células de carcinoma de pulmão NCI-H460

Matheus Felipe da Silva[1*], Luan Vitor Alves de Lima[1], Liana Martins de Oliveira[1], Simone Cristine Semprebon[1]; Nayane Oliveira Silva[1], Amanda Passuello de Aguiar[1], Mário Sérgio Mantovani[1].

1 Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo, sendo assim, terapias mais eficazes são necessárias. A diosgenina (DG) é um promissor composto com atividade anticâncer que pode regular diferentes vias moleculares envolvidas na formação e na evolução de tumores. No entanto, a atividade biológica da DG no câncer de pulmão ainda não é completamente compreendida. Neste estudo, investigamos a atividade antiproliferativa da DG nas células de carcinoma de pulmão NCI-H460. Analisamos a viabilidade celular, frequência de células multinucleadas, concentração celular, mudanças no ciclo celular, indução de morte celular, produção de EROs intracelular e danos no DNA nuclear, relacionando os resultados com a expressão de genes. Também avaliamos a atividade da DG em alterar o volume, induzir morte celular e inibir a recuperação da proliferação e crescimento clonogênico em esferoides de células NCI-H460. Observamos que a DG reduziu a viabilidade celular e concentração celular, aumentando a frequência de células com múltiplos núcleos, principalmente binucleadas, relacionada com a fusão das células-filhas. Este efeito foi relacionado com a inibição de genes reguladores da citocinese *RAB35*, *BIRC5* e *AURKB*. Ainda, a DG induziu morte celular, aumentando a permeabilidade da membrana, tumefação celular e rompimento da membrana plasmática. Os mecanismos de citotoxicidade da DG foram relacionados com o aumento da produção de EROs intracelular e da expressão dos genes *RIPK3*, *MLKL* e *HSPA5*, além da inibição do gene *TRAF2*, os quais regulam a morte celular por necroptose. Além disso, a DG aumentou o volume dos esferoides multicelulares, induziu morte celular nesses esferoides e inibiu a recuperação da proliferação e crescimento clonogênico das células. Concluímos que a DG apresenta potencial antiproliferativo em células de carcinoma de pulmão humano, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias oncológicas.

Palavras-chave: Citocinese; Fitoquímico; Necroptose; Sapogenina; Poliploidia.

1 INTRODUÇÃO

Em 2020, houve 2,2 milhões de novos casos de câncer de pulmão, com 1,8 milhões de mortes, tornando-o o segundo tipo de câncer mais comum e o primeiro em mortalidade globalmente (FERLAY et al., 2020a). Cerca de 80-85% dos cânceres de pulmão são de células não pequenas (CPCNP), que se dividem nos três principais subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a

estimativa é que a mortalidade por câncer de pulmão em 2040 seja 1,67 vezes maior do que em 2020, destacando a necessidade urgente de desenvolver terapias mais eficazes (TRAVIS et al., 2015; BAXEVANOS; MOUNTZIOS, 2018; FERLAY et al., 2020b).

Pacientes com CPCNP frequentemente recebem quimioterapia que visa impedir a divisão celular por meio do uso de drogas antimitóticas como taxanos e alcalóides da vinca (CHOUDHARI et al., 2020). No entanto, a resistência a essas terapias limita sua eficácia e há um interesse crescente em desenvolver novos agentes antimitóticos de origem natural (CUI et al., 2020; LI et al., 2011; ZHANG; YANG; GUO, 2017). Inibir a citocinese, o processo final da divisão celular, pode ser uma abordagem promissora para o tratamento do câncer (MCKENZIE; D'AVINO et al., 2016). A falha na citocinese resulta em células multinucleadas que podem ser visadas por compostos que induzem desagrupamento dos centrossomos (KARNA et al., 2011; YAN et al., 2022) e têm atividade antioxidante (ROH; MEER; ABDULKADIR, 2012). A quercetina e a acovenoside A são exemplos de fitoquímicos com atividade antiproliferativa em células de CPCNP por impedir a conclusão da citocinese (KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA et al., 2017; EL GAAFARY et al., 2017).

A resistência à apoptose é uma das marcas registradas do câncer e um importante mecanismo para o desenvolvimento de resistência a terapias (HANAHAN; WEINBERG, 2011; NEOPHYTOU et al., 2021). Por esses motivos, vias de morte não-apoptóticas são alvos promissores para tratamentos anticâncer (KOREN; FUCHS, 2021). A necroptose é uma forma de necrose regulada geneticamente que envolve a ativação das proteínas RIPK3 (*receptor interacting protein kinase*-3) e MLKL (*mixed lineage kinase domain-like*) (GALLUZZI et al., 2018). Estudos sugerem que a indução da necroptose é uma abordagem terapêutica promissora no câncer para inibir a progressão tumoral (SNYDER et al., 2019; HAN et al., 2018). Os fitoquímicos têm sido estudados por sua capacidade de induzir diferentes modalidades de morte celular, incluindo a necroptose em células de CPCNP (LIN et al., 2021; SUN et al., 2019).

A diosgenina (DG) é uma sapogenina esteroidal produzida por várias plantas, incluindo *Trigonella foenum-graecum* L., *Heterosmilax yunnanensis*, *Costus speciosus* e plantas do gênero *Dioscorea* (CHAUDHARY et al., 2018; JAHFAR et al., 2008; YI et al., 2014). Em plantas, a DG é encontrada principalmente na forma glicosilada, conhecida como saponina (CHAUDHARY et al., 2018). Estudos pré-clínicos mostram que a DG tem atividade farmacológica promissora no tratamento de diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas, além de ser um potencial agente anticâncer (SEMWAL et al., 2022). A DG tem a capacidade de afetar diferentes alvos moleculares em células tumorais, inibindo o ciclo celular, induzindo

a apoptose, inibindo a migração e a invasão (LIU et al., 2020; HUANG et al., 2019; MAO et al., 2019; ZHANG et al., 2019). Em células de adenocarcinoma de pulmão (A549), a DG induz danos ao DNA, apoptose, parada do ciclo celular em G1 e aumenta a sensibilidade das células à cisplatina, um quimioterápico (XU et al., 2019; WANG et al., 2022).

Os efeitos biológicos da DG em modelos de carcinoma de células grandes de pulmão ainda não são conhecidos. Esse tipo de carcinoma representa 5% a 10% dos casos de câncer de pulmão (DUMA et al., 2019). Trata-se de células pouco diferenciadas, que tendem a crescer e se espalhar rapidamente, o que pode tornar o tratamento difícil (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). Além disso, efeitos anticâncer da DG em modelos de cultura de células 3D são pouco explorados (DA SILVA et al., 2022). Modelos de cultura 3D têm vantagens sobre os modelos de cultura 2D, pois melhor mimetizam o contexto tecidual, incluindo interações célula-célula e célula-matriz extracelular (EDMONDSON et al., 2014). Esferoides de células tumorais são um tipo de modelo 3D que recapitula a heterogeneidade de células observada em tumores avasculares ou pouco vascularizados, devido a um gradiente de difusão de oxigênio, nutrientes e metabólitos, que favorece a formação três camadas de células distintas: uma zona de proliferação celular externa, uma zona de células quiescentes intermediária e um núcleo de células necróticas interno (EDMONDSON et al., 2014; ZANONI et al., 2016). Portanto, esse estudo visa avaliar os efeitos antiproliferativos da DG em modelos de cultura 2D e 3D de células NCI-H460 de carcinoma de pulmão de grandes células.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura De Células E Agentes Químicos

A linhagem celular NCI-H460 foi obtida da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil, e testada negativa para micoplasma por RT-qPCR. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 contendo 10 mL de *Minimum Essential Medium* (MEM, Gibco®, CAT. 41500-034) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco®, CAT. 12657-029), 10 mM de piruvato de sódio ($C_3H_3NaO_3$, Gibco®, CAT. 11360-070) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco®, CAT. 15240-096), em estufa umidificada a 37ºC e 5% de CO_2. Antes dos tratamentos, as células foram incubadas por 24 horas para estabilização e a viabilidade celular, monitorada por azul de tripan no *Cell Counter LifeTechnology*®, permaneceu acima de 80%.

A DG (C27H42O3, Sigma-Aldrich-Brasil, CAS: 512–04–9) foi dissolvida em etanol absoluto (C_2H_5OH, Emsure®, CAT: 64-17-5) a uma concentração de 20 mM, armazenada a -20ºC e diluída em meio de cultura antes dos tratamentos. O etanol absoluto não ultrapassou 0,22% nos ensaios com cultura em monocamada e 0,44% nos ensaios com cultura 3D, e essas porcentagens foram usadas nos controles de veículo dos respectivos ensaios. O quimioterápico Doxorrubicina (DOX, Pharmacia; CAS: 23214–92–8) foi usado como controle positivo em uma concentração de 8 µM nos ensaios de metabolismo da resazurina, Cometa, volume (crescimento) e clonogênico. O quimioterápico Camptotesina (CPT, Sigma-Aldrich, CAT. C9911) foi usado em uma concentração de 10 µM no ensaio de apoptose.

2.2 Avaliações Em Sistema De Cultura 2D

2.2.1 Ensaio De Viabilidade Celular (Metabolismo Da Resazurina)

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio que tem como princípio a conversão metabólica da resazurina ao composto fluorescente resorufina (O'BRIEN et al., 2000). Foram semeadas $2{,}5x10^4$ células em placas de 48 poços e adicionado as concentrações de 30, 40, 50, 60 e 70 µM da DG. Após 24 h de tratamento, foi descartado o sobrenadante, as células incubadas por 2 h em 200µL/poço da solução de resazurina (60 µM) diluída em meio de cultura sem SBF e, em seguida, mensurada a fluorescência no instrumento Glomax® (520 nm de excitação e 580/40 de emissão, Promega). Conduziu-se o ensaio em três repetições biológicas e 6 replicatas para cada tratamento. Os dados de viabilidade foram expressos pela fórmula: [(média de fluorescência do tratamento / média do controle de veículo) × 100]. A viabilidade do controle de veículo foi considerada como 100%. As concentrações inibitórias (IC) 50, 25 e 12,5 foram calculadas com o software estatístico GraphPad 9.0 e o coeficiente de correlação linear de Pearson com o software estatístico RStudio.

2.2.2 Microscopia De *Time Lapse*

A dinâmica de resposta das células expostas à DG foi monitorada por microscopia de *time lapse*. Para essa análise, uma densidade de $2{,}5x10^5$ células foram semeadas em placa de seis poços e tratadas com o IC50 da DG. Durante um período de 24 h de tratamento, a placa permaneceu incubada em uma câmara de cultura (EVOS *Onstage Incubator*), umidificada à 37ºC e 5% de CO_2 e as imagens foram capturadas a cada 3 min dos poços com o microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) no aumento de 400x.

2.2.3 Coloração De Células Multinucleadas Por Coloração de Giemsa

Neste estudo, foram investigados os efeitos da DG na frequência de células multinucleadas por meio da coloração de Giemsa. Foram semeadas $5x10^4$ células em placas de 12 poços, submetidas ao tratamento com os valores de IC50, IC25 e IC12,5 da DG durante um período de 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS (*phosphate buffered saline*), fixadas em solução 3:1 de metanol e ácido acético durante 1 min, coradas com solução 1:10 de tampão de Sorensen e Giemsa por 10 min, e imagens foram capturadas com um microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (aumento de 200x). Foram contabilizadas um total de 1000 células/tratamento/repetição, considerando apenas células com limites de membrana plasmática distinguíveis das células adjacentes. Não foram contabilizados micronúcleos como núcleos, e apenas núcleos com limites nucleares distinguíveis dos outros núcleos foram considerados na contagem (FENECH et al., 2003). O percentual de células mononucleadas, binucleadas e número de núcleos maior que 2 (>2 núcleos) foi obtido pela fórmula: [(número de células multinucleadas/1000)x100]. Três repetições biológicas foram realizadas.

2.2.4 Concentração Celular E Análise De Fases Do Ciclo Celular

A concentração celular (células/mL) foi determinada no citômetro de fluxo Guava® easyCyte (Merck Millipore, USA). Foram semeadas $2,5x10^5$ células em placas de seis poços e os tratamentos feitos com o IC50, IC25 e IC12,5 da DG por 24h. Foram realizadas três repetições biológicas e 10000 eventos foram adquiridos para cada amostra.

A distribuição do percentual de células com diferentes conteúdos de DNA foi avaliada no citômetro de fluxo Guava® easyCyte (Merck Millipore, USA). A densidade de $2,5x10^5$ células foi semeada em placas de seis poços. No tempo de estabilização (24 h), as células permaneceram sem SBF para a sincronização na fase G0 do ciclo celular. Ao final do período de 24 h de tratamento com o IC50, IC25 e IC12,5 da DG em meio completo, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (1000 rpm por 5 min) e ressuspendidas em PBS. Uma quantidade de 100 µL da suspenção celular foi a adicionada a 100 µL de solução de citrato de sódio (0,1%)/Triton X-100 (0,1%) e 2,5 µL de iodeto de propídio (50 µg/mL) para a permeabilização das membranas celulares e a coloração do DNA, respectivamente. Foram realizadas três repetições biológicas e adquiridos 5000 eventos para cada amostra.

2.2.5 Ensaio De Apoptose

A morte celular foi avaliada no citômetro de fluxo Guava® easyCyte (Merck Millipore, USA) no ensaio baseado na ligação da Anexina V à fosfatifilserina nas células apoptóticas e na difusão do 7-AAD através da membrana das células mortas. Foram semeadas $2{,}5x10^5$ células em placas de seis poços e tratadas com o IC50, IC25 e IC12,5 da DG por 24 h. Após, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (1000 rpm por 5 min) e ressuspendidas em PBS. O kit de apoptose Guava Nexin (Merck Millipore 4500–0450) foi utilizado. Para a coloração, 2 µL de Anexina V e 2 µL de 7-AAD foram adicionados à suspensão celular, que foi deixada protegida da luz por 15 min. Foram realizadas três repetições biológicas e adquiridos 10000 eventos para cada amostra.

2.2.6 Avaliação Da Produção De EROs Intracelular

A produção de EROs intracelular foi estimada no citômetro de fluxo Guava® easyCyte (Merck Millipore, USA) por meio da fluorescência do DCF (2',7'-*dichlorofluorescein*), formado por meio de reações de hidrólise por esterases e oxidação por EROs intracelular a partir do composto H_2DCFDA (2',7'-*dichlorodihydrofluorescein diacetate*) (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). Semeou-se em placas de seis poços $2{,}5x10^5$ células, que foram tratadas com o IC50, IC25 e IC12,5 da DG por 12 h. Após isso, o meio de cultura foi removido dos poços, que foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, uma solução de 10 µM de H_2DCFDA foi adicionada à cultura celular, a qual foi deixada em estufa umidificada a 37ºC e 5% de CO_2 por 30 min. Ao término do período de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS e as células colhidas com solução de Accutase® (Sigma-Aldrich, Cat. No. A6964), centrifugadas (1000 rpm por 5 min.) e ressuspendidas em PBS. Foram realizadas três repetições biológicas e adquiridos 10000 eventos para cada amostra. Os dados foram expressos por intermédio da razão entre a média da intensidade de fluorescência do tratamento e a média de fluorescência do controle.

2.2.7 Ensaio Do Cometa

O potencial efeito da DG em produzir danos no DNA foi avaliado pelo ensaio do Cometa (COLLINS et al., 2008). Em tubos de proliferação (10 cm^2), foram semeadas $2{,}5x10^5$ células, que foram tratadas com o IC50, IC25 e IC12,5 da DG por 6 h. O tempo de tratamento foi baseado no estudo de Da Silva et al., (2022), pelo qual danos genotóxicos foram observados em células de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A) tratadas com a DG nesse tempo. As

próximas etapas do ensaio de preparo de células e das lâminas, eletroforese e coloração foram descritas no protocolo de Biazi et al., (2020) com modificações, pois uma concentração de 0,8% de agarose foi utilizada no protocolo do presente estudo. Foram feitas capturas de imagens de nucleoides para cada tratamento com o microscópio de fluorescência EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) no aumento de 200x. O percentual de DNA na cauda foi estimado para 100 nucleoides/tratamento utilizando o software CometScore^{TM}. Para esse ensaio, foram realizadas três repetições biológicas.

2.2.8 Quantificação Relativa De mRNA Por RT-qPCR

Os mRNA dos genes alvo foram quantificados por meio das reações da Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR). Para tanto, 2,5x10^5 células foram semeadas em placas de seis poços, as quais foram tratadas com o IC50 da DG por 12 h. O RNA foi extraído e isolado utilizando o RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade e a pureza das amostras de RNA foram certificadas, respectivamente, por eletroforese em gel de agarose (1%) e pela razão de absorbância no UV (A260 nm/A280 nm), obtida no Biodrop µLite (Biochrom), devendo estar dentro do intervalo entre 1,9 e 2,1. As concentrações de RNA foram mesuradas no Biodrop µLite (Biochrom) e corrigidas para 1000 ng/µL para posterior síntese das moléculas de DNA complementar (cDNA), como descrito por Zanetti et al., (2018). Os cDNA foram sintetizados em triplicata e os produtos incorporados para a obtenção de uma única amostra. As reações de PCR foram preparadas em tubos de reação que continham 5 µL de cDNA (1:10), 0,5 µL de cada primer (f*orward* e *reverse*) e 5 µL de QuantiNova^{TM} SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen Cat. No. 157036645). Um total de 35 ciclos reação ocorreram no termociclador CFX96 TOUCH™ (Bio-rad Laboratories, USA) nas condições, para cada ciclo, de 95ºC por 15 s, 72ºC por 20s e 55ºC por 20 s. Ao término das reações, a especificidade das amplificações e a presença de dímeros de *primers* foram monitoradas por meio da curva de dissociação, produzida a partir do aumento gradual da temperatura (0,5ºC/s) de 55ºC até 95ºC. Foram avaliadas as expressões de genes alvos que regulam o ciclo celular (*BIRC5*, *AURKB, PRC1, SESN1, RAB35, OCRL, APC, CHEK1, CDK1* e *CCNB1*), a morte celular (*NFKB1*, *TNF*, *TRAF2*, *HSPA5, RIPK1, RIPK3, MLKL, BCL2, BBC3* e *CASP8*), a autofagia (*MTOR, BECN1* e *SQSTM1*) e as respostas a danos ao DNA (*ATM, GADD45G* e *H2AFX*), ao estresse oxidativo (*GPX1* e *SOD1*) e ao estresse de retículo endoplasmático (RE) (*GADD153*, *EIF2AK3* e *ERN1*) (Tabela S1 do apêndice A). Para esse ensaio, foram realizadas três repetições biológicas.

2.3 Ensaios De Cultura Tridimensional (3D)

2.3.1 Método De Obtenção Dos Esferoides

Os efeitos antiproliferativos da DG foram testados em esferoides multicelulares, que foram produzidos por meio da técnica de sobreposição líquida descrita por Yuhas et al. (1977). Essa técnica se baseia no crescimento de células tumorais em um meio líquido e superfície não aderente. Para esse ensaio, foram adicionados 50 µL/poço de solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%), dissolvida em meio de cultura MEM sem SBF, em placas de 96 poços. Um total de 3000 células/poço foi cultivado em 150 µL/poço de meio de cultura. Em seguida, as placas foram centrifugadas (2500 rpm por 1 min e 40 s) e deixadas em estufa umidificada a 37ºC e 5% de CO_2 durante 4 dias para a formação dos esferoides (período de esferoidização). Os tratamentos ocorreram a partir do quarto dia de esferoidização.

2.3.2 Ensaio De Crescimento (Volume)

Os esferoides foram tratados com o IC50 e 2 x IC50 da DG para a avaliação do crescimento. Ao fim de cada um dos períodos de tratamento de 24 h, 48 h e 72 h, foram feitas capturas de imagens dos esferoides com o microscópio de fluorescência EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) no aumento de 100x. Os volumes dos esferoides foram obtidos nos *softwares* Anasp e Revisp (PICCININI et al., 2015; PICCININI; TESEI; BEVILACQUA, 2016). Para esse ensaio, foram realizadas três repetições e mensurado o volume de seis esferoides por tratamento.

2.3.3 Avalição Da Morte

A morte celular foi avaliada nos esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 da DG por 24 h. A metodologia de avaliação da morte nos esferoides foi baseada nos achados do estudo de Zanoni et al. (2016), que demonstraram a presença de uma zona de células viáveis e de uma zona de células mortas bem definidas em esferoides multicelulares. Logo, os marcadores de viabilidade celular diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo (PI) foram utilizados para a caracterização dessas zonas. A morte celular foi avaliada qualitativamente pela maior ou menor presença de células mortas na camada de células viáveis dos esferoides. As imagens foram capturadas com o microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) no aumento de 100x.

2.3.4 Recuperação Da Proliferação Nos Esferoides

Os esferoides foram tratados com o IC50 e 2x IC50 da DG por 24 h. Após o tratamento, os esferoides foram transferidos para uma placa de 48 poços com superfície aderente e incubados (37ºC e 5% de CO_2) por 24 h para a avaliação da recuperação da proliferação celular na ausência de tratamento. A área do halo de proliferação formado foi obtida pela fórmula: área (μm^2) do halo de proliferação – área (μm^2) do esferoide. As áreas foram avaliadas no software EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher).

2.3.5 Ensaio Clonogênico Em Esferoides

O crescimento clonogênico das células dos esferoides foi avaliado por meio do ensaio clonogênico. Após o período de esferoidização, os esferoides foram tratados com o IC50 e 2x o IC50 da DG por 24 h. Logo após, cinco esferoides de cada tratamento foram transferidos para microtubos (1,5 mL), onde foram centrifugados (6000 rpm por 10 s) e o sobrenadante removido em seguida. Aos tubos foi adicionado 250 µL de Accutase® (Sigma-Aldrich, Cat. No. A6964) e a solução gentilmente agitada 10 vezes com micropipeta. Os tubos foram deixados em agitação no Themo-Shaker por 10 min e a 37ºC para a dissociação das células dos esferoides. Em seguida, a solução foi gentilmente agitada 10 vezes com micropipeta, centrifugada (6000 rpm por 10 s) e o sobrenadante removido. As células foram ressuspendidas em meio de cultura MEM, semeadas em placas de 12 poços (500 células/poço) e incubadas à 37ºC e 5% de CO_2 por um período de 5 dias para a formação das colônias. Após esse período, uma solução de resazurina (60µM), diluída em meio de cultura sem SBF, foi adicionada aos poços. Após 2h de incubação, a fluorescência foi mensurada no instrumento Glomax® (520 nm de excitação e 580/40 de emissão, Promega). Por fim, as colônias foram fixadas em solução 3:1 de metanol e ácido acético e coradas em solução de 0,5% de cristal violeta. Para esse ensaio, três repetições biológicas foram realizadas.

2.4 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições experimentais. A significância das médias foi testada por meio da Análise de Variância (ANOVA) one-way seguida do teste Tukey para o ensaio da resazurina e do teste de Dunnett para os demais ensaios, exceto RT-qPCR, considerando a diferença significativa quando $p < 0,05$. As pressuposições da ANOVA de independência (teste de Durbin Watson), normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Levene) dos resíduos foram

verificadas e atendidas ($p > 0,05$). Os valores de Cq (*quantification cycle*), obtidos no ensaio de RT-qPCR, foram normalizados com os valores de Cq do gene constitutivo *RPLP0*. O *fold change* foi calculado por meio do método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e os dados expressos como médias ± desvio padrão do log2 (*fold change*). As médias foram comparadas com teste t de *Student* bicaudal para amostras não pareadas, considerando a diferença significativa quando $p < 0,05$ e valor de log2 (f*old change*) ≥ 1 ou ≤ - 1. As estatísticas foram realizadas no software RStudio.

3 RESULTADOS

3.1 DG Reduz A Viabilidade E Induz A Formação De Vacúolos Citoplasmáticos Nas Células NCI-H460 Em Sistema 2D

Após o tratamento de 24 h com a DG, houve uma redução na viabilidade celular nas concentrações (30 µM-70 µM) testadas, e de maneira dose-dependente ($r^2 = 0,89$ e $p<0,05$), quando comparada com o controle (Figura 1 A e B). Com os dados de viabilidade, foram determinados os valores de IC12,5 (31,28 µM), IC25 (36,42 µM) e IC50 (44,36 µM) da DG, os quais serviram de referência para a execução dos ensaios subsequentes. Na Figura 1 C, nota-se uma redução na quantidade de células nas concentrações a partir de 50 µM, em oposição às células controle, enquanto nas concentrações de 60 µM e 70 µM, as células diminuíram de tamanho em relação às concentrações de 30 µM e 40 µM, bem como o controle. Ainda, foram identificados vacúolos citoplasmáticos nos tratamentos, exceto no tratamento com 70 µM (Figura 1 C.1).

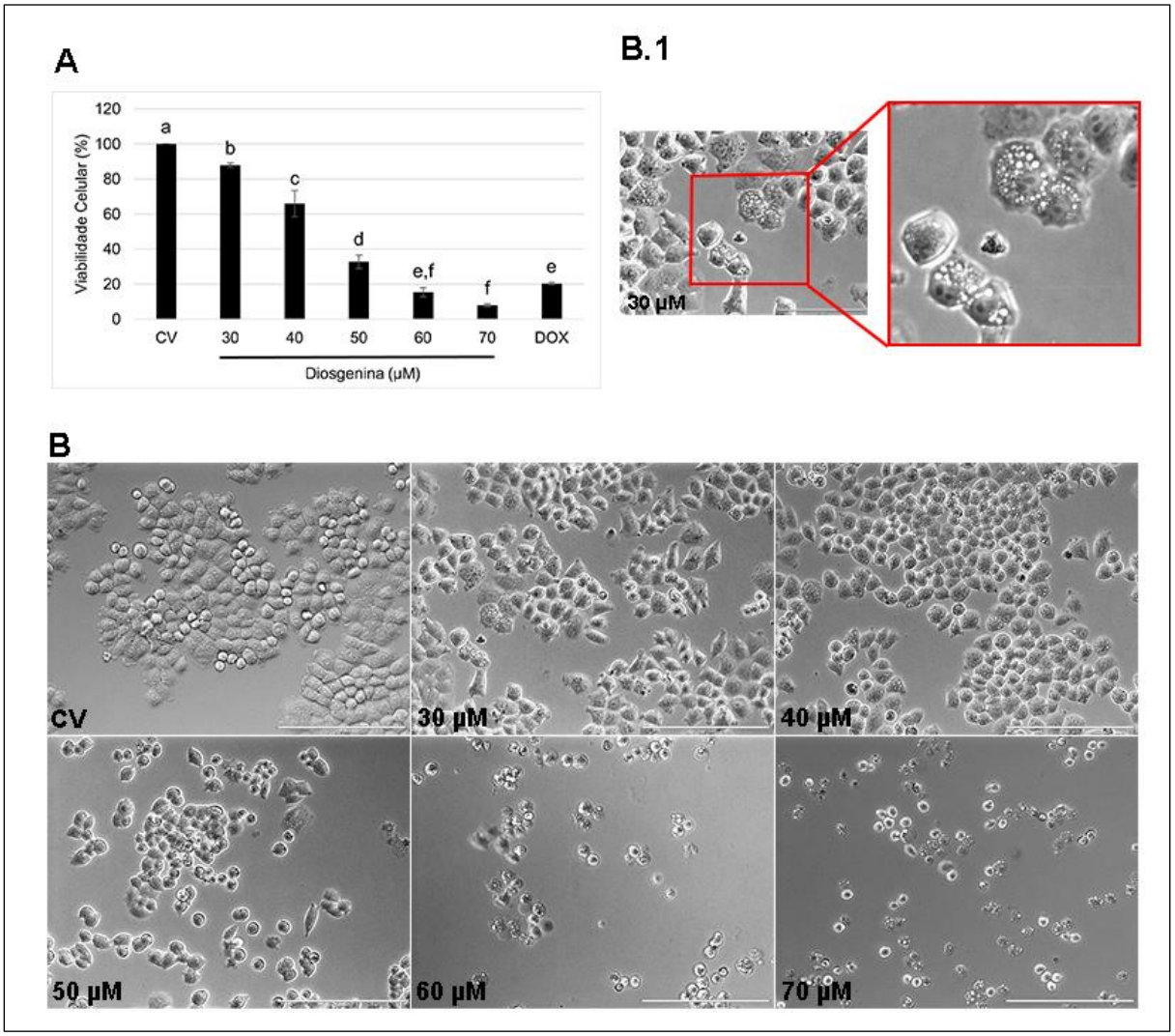


Figura 1 – DG reduz a viabilidade e induz a formação de vacúolos citoplasmáticos nas células NCI-H460. (A) Dados de viabilidade celular percentual média obtidos no ensaio da resazurina, após 24 h de tratamento com concentrações da DG que variaram entre 30µM e 70 µM da DG. (B) Fotomicrografias (aumento de 200x) das células controle e das células tratadas com concentrações entre 30 µM e 70 µM da DG por 24 h. (B.1) Fotomicrografia (aumento de 400x) de células tratadas com 30 µM da DG por 24 h, destacando as células contendo vacúolos citoplasmáticos. As barras de erro representam ± o desvio padrão da média de três repetições biológicas. As letras diferentes indicam médias diferentes, a $p < 0,05$, definidas por ANOVA seguida de teste Tukey. CV, controle de veículo. DOX, doxorrubicina.

3.2 DG Reduz A Concentração Celular e Aumenta o Percentual de Células Com o Dobro do Conteúdo De DNA Em Sistema 2D

A concentração celular e o conteúdo de DNA das células foram estimados no tempo de 24 h. A concentração celular (células/mL) apresentou redução com uso do IC12,5 (-18,1%), IC25 (- 19,8%) e IC50 (- 28,1%) da DG quando comparada com o controle (Figura 2 A). No ensaio de ciclo celular, foi verificado um menor percentual de células na fase S com o uso do IC12,5 (11,93%), IC25 (8,43%) e IC50 (8,73%) da DG, em comparação com o controle (20,67%). Por outro lado, o percentual de células nas fases G2/M, que contém o dobro do conteúdo de DNA em comparação com as células nas fases G0/G1, aumentou com o uso do

IC12,5 (27,4%), IC25 (30,07%) e IC50 (29,3%) da DG, em comparação com o controle (18%) (Figura 2 B e B.1).

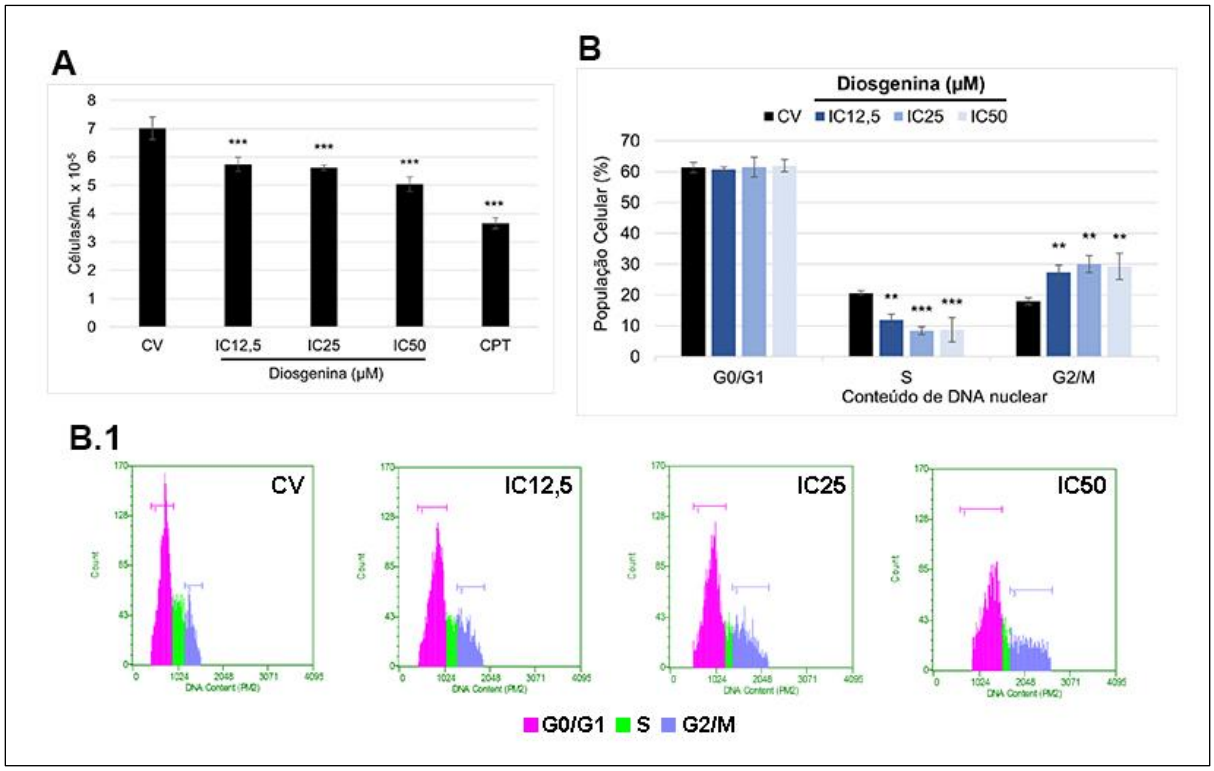


Figura 2 – DG reduz a concentração celular e altera o conteúdo de DNA nas células NCI-H460. (A) Concentração celular (células/mL) média obtida por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG. (B) Percentual celular médio de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, determinados por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG. (B.1) Distribuição da população de células com diferentes conteúdos de DNA, determinada por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG. As barras de erro representam ± o desvio padrão da média de três repetições biológicas. ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$), indicam diferença na média do tratamento em relação ao controle definida por ANOVA seguida do teste de Dunnett. CV, controle de veículo. CPT, Camptotecina.

3.3 DG Induz A Fusão Das Células-Filhas e a Formação de Células Multinucleadas Em Sistema 2D

Células expostas ao IC50 da DG foram monitoradas por 24 h por microscopia de *time-lapse* e comparadas com as células controle (Vídeos S1 A e B do apêndice C). Enquanto as células-filhas do controle permaneciam separadas e recuperavam a morfologia característica da interfase, após a formação do sulco de clivagem na citocinese, algumas células-filhas do tratamento com DG se fundiam após a separação pelo sulco de clivagem (Figura 3 A e Vídeos S1 C e D do apêndice C). Das 200 células contabilizadas, 9,5% (n = 19) sofreram fusão das

células-filhas no tratamento com a DG, ao passo que nenhum evento de fusão de células foi contabilizado no controle.

A frequência de células multinucleadas, principalmente binucleadas, aumentou significativamente após 24 h de tratamento com as concentrações testadas da DG, em comparação com o controle (Figura 3 B e C e Figura S1 A do apêndice B). Observou-se uma redução dose-dependente ($r^2 = 0,99$ e $p < 0,001$) na frequência média de células mononucleadas com o IC12,5 (91,43%), IC25 (86,8%) e IC50 (78,93%) da DG, em comparação com o controle (98,47%). Houve um aumento expressivo e dose-dependente ($r^2 = 0,98$ e $p < 0,05$) nas frequências médias de células binucleadas, que foram de 12,94x, 7,64x e 5,03x nos tratamentos com o IC50, IC25 e IC12,5 da DG, respectivamente, em comparação com o controle. Além disso, a frequência de células com >2 núcleos aumentou nos tratamentos com o IC12,5 (1,37%), IC25 (2,27%) e IC50 (2,57%) da DG, em comparação com o controle.

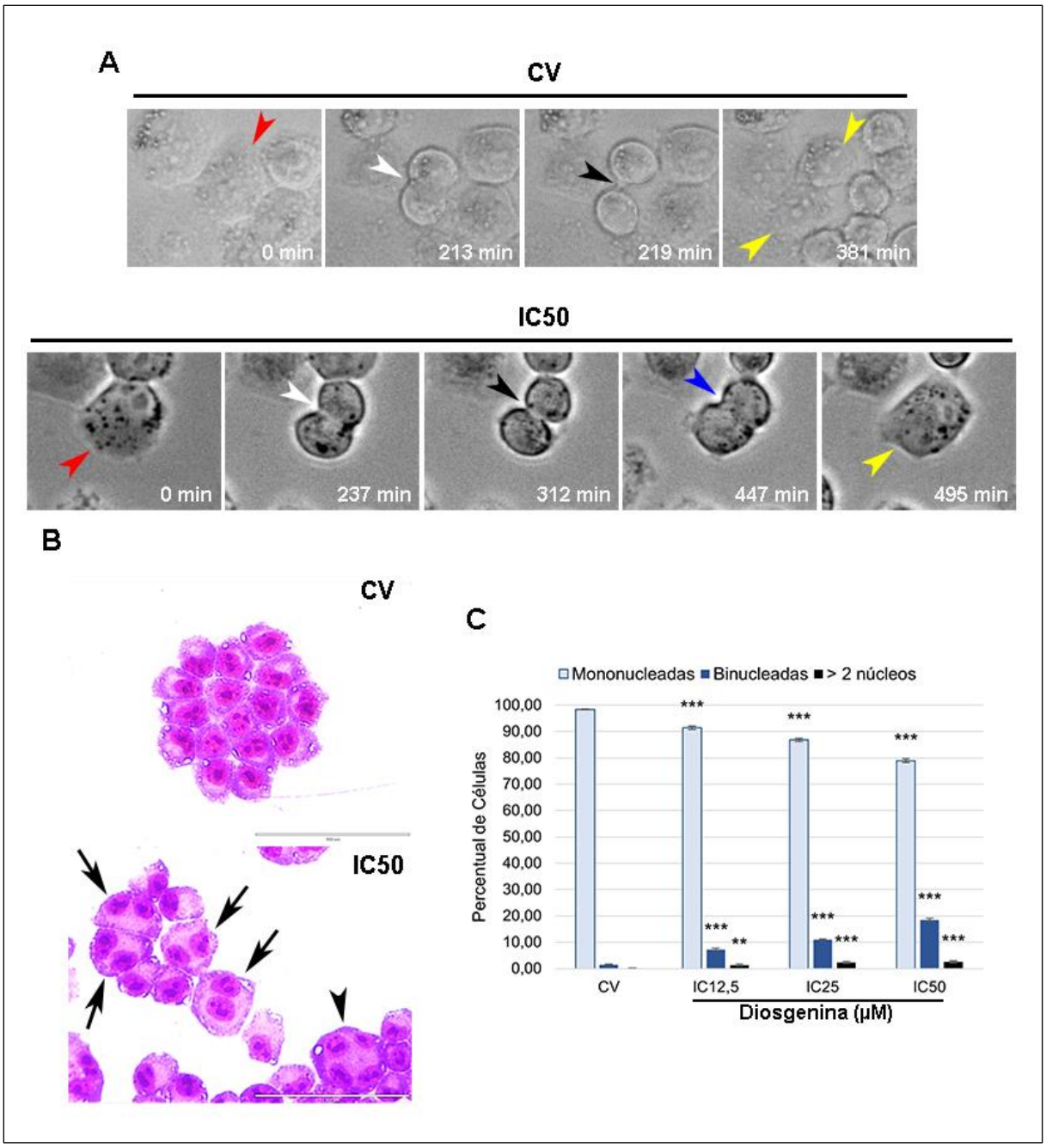


Figura 3 – DG induz a fusão das células-filhas e a formação de células NCI-H460 multinucleadas. (A) Fotomicrografias (aumento de 400x) de *time lapse* de células controle e tratada com o IC50 da DG por 24 h. A ponta de seta vermelha indica as células antes da citocinese. A ponta de seta branca indica as células-filhas sendo separadas pela formação do sulco de clivagem na citocinese. A ponta de seta preta indica as células-filhas ligadas por membrana em uma fase mais tardia da citocinese. A ponta de seta azul indica a regressão das células-filhas, após serem separadas pelo sulco de clivagem. A ponta de seta amarela indica as células resultantes do processo de citocinese. (B) Fotomicrografias (aumento de 400x) de células controle e de células tratadas com o IC50 da DG por 24 h, obtidas após a coloração de Giemsa. As setas pretas indicam as células binucleadas e a ponta de seta preta indica uma célula com quatro núcleos. (C) Percentual de células binucleadas e com número maior que 2 núcleos, determinada por contagem de 1000 células, após 24 h de tratamento com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG e coloração de Giemsa. As barras de erro representam ± o desvio padrão da média de três repetições biológicas. **($p<0,01$) e *** ($p<0,001$), indicam diferença na média do tratamento em relação ao controle definida por ANOVA seguida do teste de Dunnett. CV, controle de veículo.

3.4 DG Induz Morte Celular e Aumenta EROs Intracelular Em Sistema 2D

A natureza dos efeitos antiproliferativos da DG também foi investigada quanto à indução de morte celular no tempo de 24 h. A dupla marcação com os corantes FDA e PI, nas células tratadas com o IC50 da DG, revelou uma maior presença de células mortas – marcadas apenas com PI – em comparação com o controle (Figura 4 A). No ensaio de morte celular por citometria de fluxo, a DG aumentou a frequência de células mortas de 2,63% no controle para 6,53% no tratamento com o IC50 (Figura 4 B). Houve ainda uma redução na viabilidade celular de 6,15% com o IC50 da DG em relação as células controle (Figura 4 B) e a presença de tumefação celular (Vídeo S2 A) e rompimento da membrana plasmática (Vídeo S2 B do apêndice C) nessa mesma concentração da DG (Figura 4 C).

Foi investigada a capacidade da DG em aumentar a produção de EROs e causar danos no DNA como mecanismos de ação citotóxicos. Verificou-se com o IC50 da DG uma maior concentração de EROs intracelular após 12 h de tratamento em comparação com o controle (Figura 4 D). O ensaio de detecção de EROs intracelular mostrou um aumento de EROs com o IC25 (1,27x) e o IC50 (1,35x) da DG, após 12 h de tratamento em relação ao controle (Figura 4 E). No entanto, a DG não foi genotóxica após 6 h de tratamento, conforme demonstrado no ensaio do Cometa (Figura 4 F).

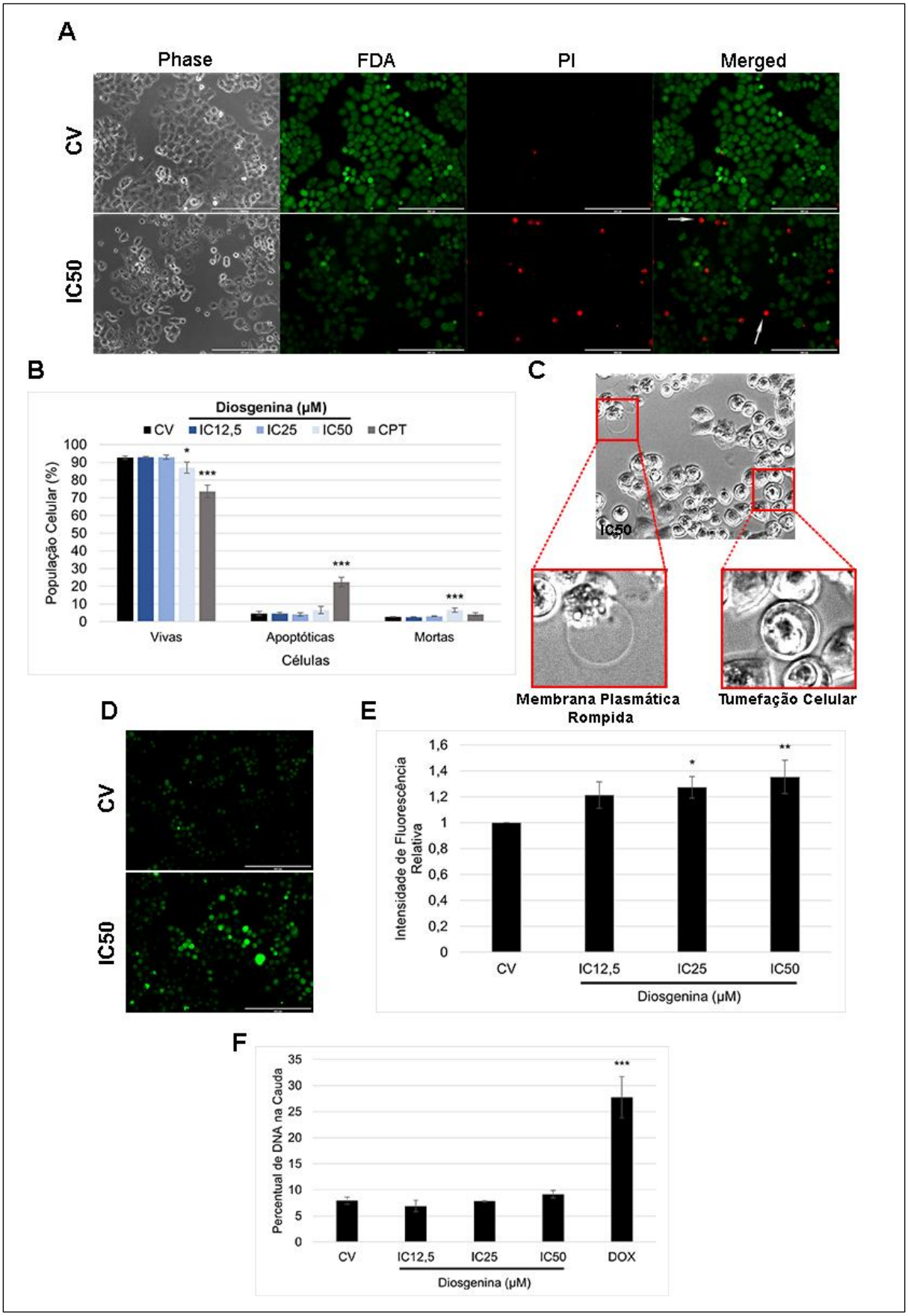


Figura 4 – DG induz morte celular, produção de EROs e não causa danos de DNA nas células NCI-H460. (A) Fotomicrografias (aumento de 200x) das células tratadas com o IC50 da DG por 24 h, obtidas por microscopia de fluorescência, após a coloração com FDA (diacetato de fluoresceína, fluorescência verde que indica as células

viáveis) e PI (iodeto de propídio, fluorescência vermelha que indica o núcleo das células mortas). As setas brancas indicam as células mortas (núcleo marcado com PI e ausência de marcação com FDA). (B) Percentual das células viáveis (não coradas), apoptóticas (coradas com Anexina V) e mortas (coradas apenas com 7-AAD), obtida por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG. (C) Fotomicrografia (aumento de 400x) das células tratadas com o IC50 da DG por 24 h, destacando células com a membrana plasmática rompida e tumefação celular. (D) Fotomicrografias (aumento de 200x) das células controle e das células tratadas com o IC50 da DG por 12 h, obtidas por microscopia de fluorescência, indicando a presença de EROs intracelular (fluorescência verde do DCF). (E) Quantificação da intensidade de fluorescência relativa do DCF nas células tratadas com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG por 12 h, obtida por citometria de fluxo. (F) Percentual de DNA na cauda médio de cometas provenientes de células tratadas com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG por 6 h, após o ensaio do Cometa. O percentual de DNA na cauda dos cometas foi determinado no *Software Comet Score* 9. As barras de erro representam ± o desvio padrão da média de três repetições biológicas. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$), indicam diferença na média do tratamento em relação ao controle, definida por ANOVA seguida do teste de Dunnett. CV, controle de veículo. CPT, Camptotecina. DOX, Doxorrubicina.

3.5 DG Modifica a Expressão de Genes de Regulação da Citocinese e da Necroptose em Sistema 2D

Avaliou-se os efeitos de 12 h de exposição ao IC50 da DG na transcrição de genes que regulam o ciclo celular, a morte celular e a autofagia, assim como as respostas aos danos no DNA, ao estresse oxidativo e ao estresse de RE. A DG regulou negativamente a expressão dos genes de controle da citocinese *BIRC5*, *AURKB*, *OCRL* e *RAB35*. A expressão dos genes que regulam a morte celular por necroptose também foi inibida pela DG. Foi observada uma redução na expressão do gene *TRAF2* e um aumento na expressão dos genes *RIPK3*, *MLKL* e *HSPA5* (Figura 5).

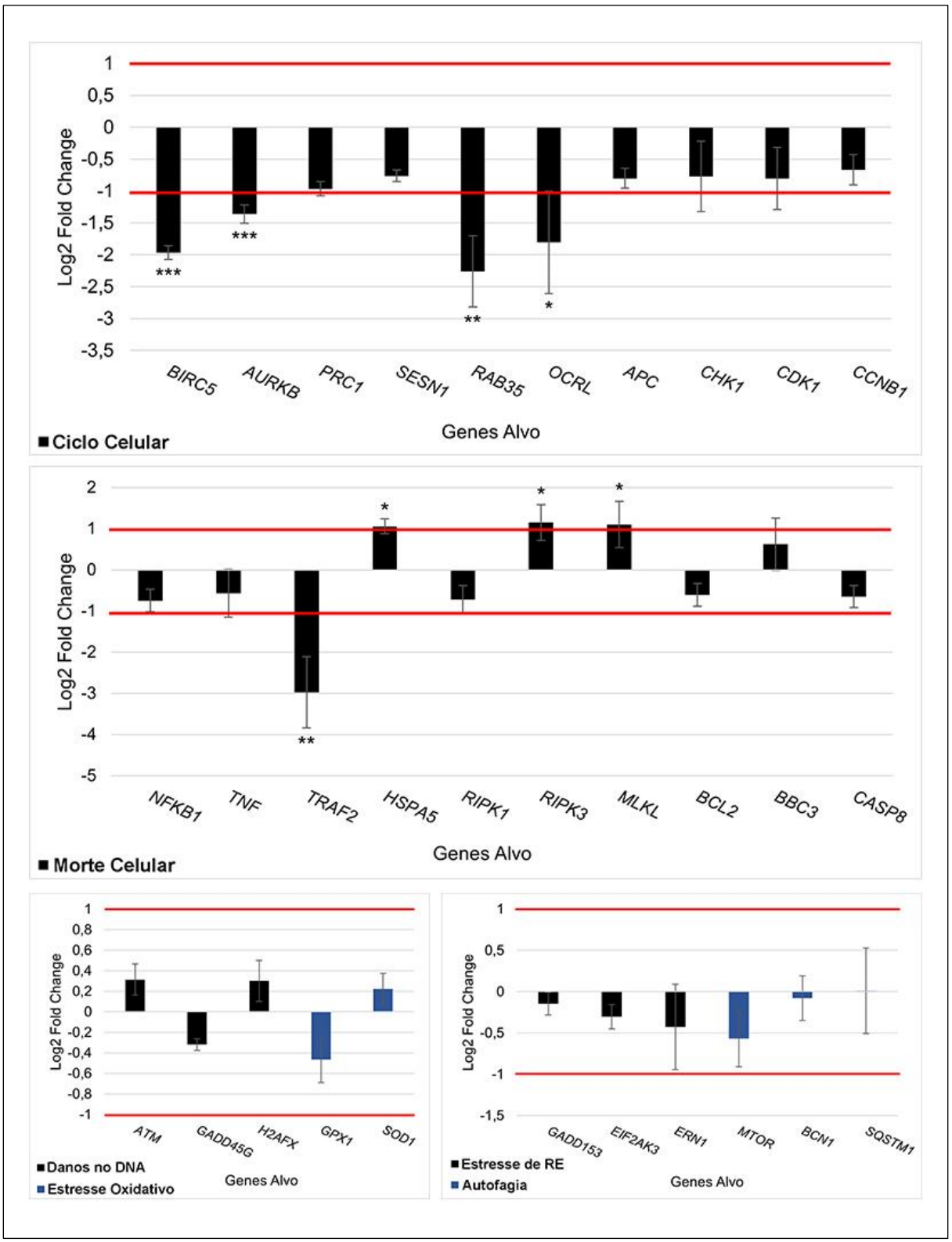


Figura 5 – DG altera a expressão de mRNA nas células NCI-H460. Representações gráficas em colunas dos valores de expressão relativa de mRNA relacionados com o ciclo celular, morte celular, danos no DNA, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático (RE) e autofagia, obtidos por RT-qPCR, após 12 h de tratamento com o IC50 da DG. Os valores de Cq (*quantification cycle*) foram normalizados com os valores de Cq do gene de referência *RPLP0*. Os resultados foram expressos como log2 (*fold change*). As barras de erro representam ± o desvio padrão da média de três repetições biológicas. * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$), indicam diferença na média do tratamento em relação ao controle de veículo, definida por test t de *Student* e valor de log2(*fold change*) ≥ 1 ou ≤ - 1 (linhas vermelhas nos gráficos).

3.6 DG Altera a Morfologia e o Volume Dos Esferoides Em Sistema 3D

Na Figura 6 A e 6 B, nota-se nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h que os esferoides controle apresentavam duas zonas celulares distintas e bem definidas: uma zona clara periférica e uma zona escura central. Os esferoides tratados com o IC50 da DG por 24 h tinham zonas escura e clara de tamanhos aparentemente semelhantes aos esferoides controle. Contudo, nos esferoides tratados com 2x IC50, houve um efeito de espessamento da zona clara e uma redução da zona escura em relação ao controle. Nos esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 da DG por 48 h, observa-se esse mesmo efeito, além de uma organização menos compactada das células em relação ao controle. Nos esferoides tratados por 72 h, por sua vez, ocorreu a desagregação e a deposição de células no entorno dos esferoides, especialmente no tratamento com 2x IC50 da DG (Figura 6 B). Em consequência da desagregação, a estrutura dos esferoides foi descaracterizada. Portanto, não foram mesurados os volumes médios dos esferoides no tempo de 72 h, mas apenas nos tempos de 0 h, 24 h e 48 h. No ensaio de volume, os esferoides tratados com o IC50 da DG por 24 h apresentaram uma redução de 3,45% no volume médio em relação ao controle. Contudo, um aumento no volume médio foi observado nos esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 da DG por 48 h, que foram de 6,36% e 67,42%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 6 C).

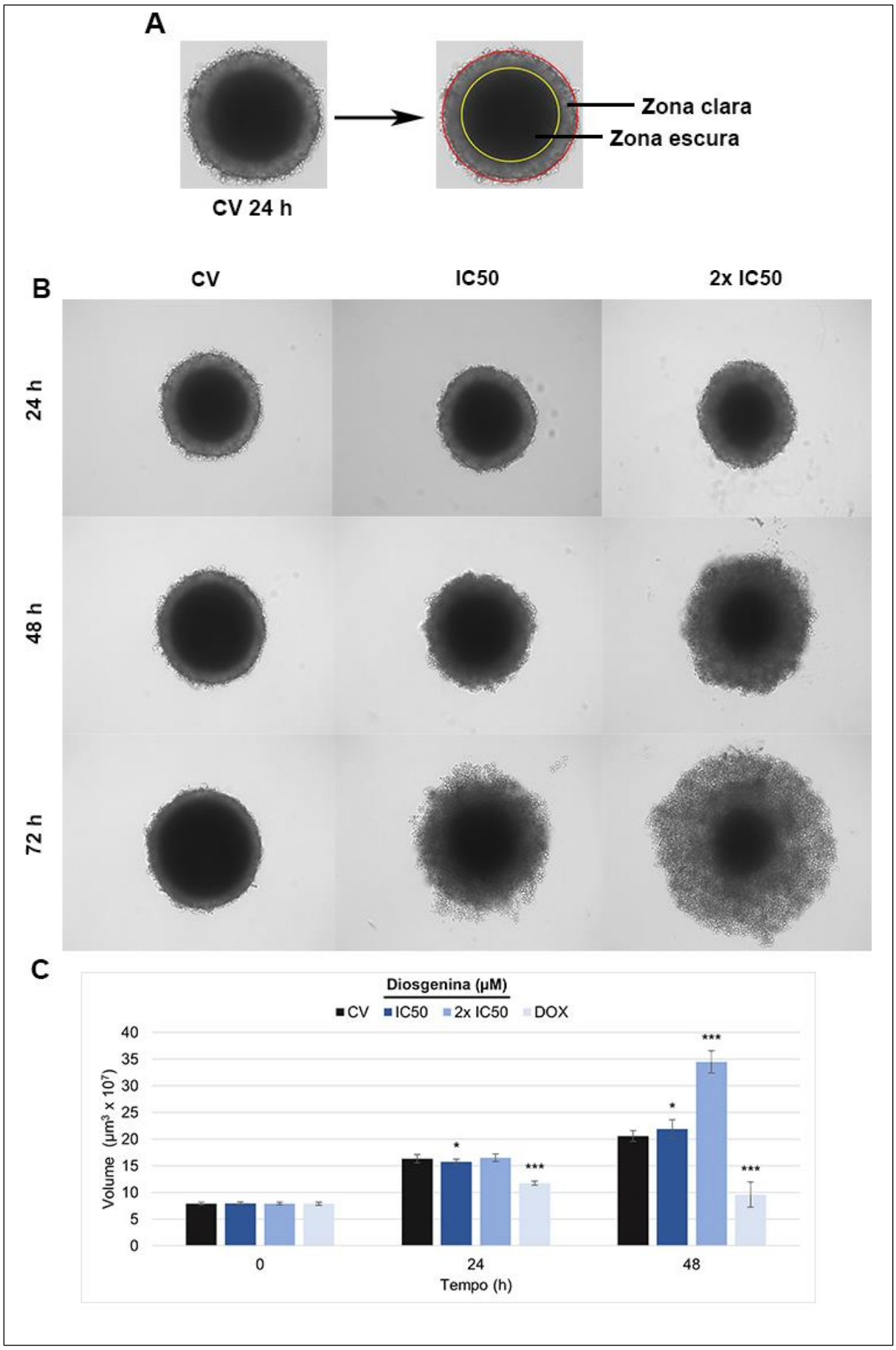

A
Zona clara
Zona escura
CV 24 h
B
CV
IC50
2x IC50
24 h
48 h
72 h
C
Diosgenina (μM)
CV
IC50
2x IC50
DOX
Volume (μm³ x 10⁷)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
24
48
Tempo (h)
*
***
*
***
***

Figura 6 – DG altera a morfologia e o volume dos esferoides de células NCI-H460. (A) Fotomicrografia (aumento de 100x) de um esferoide controle (esquerda) e do mesmo esferoide (direita) com uma zona clara periférica e uma zona escura central delimitadas, após o tempo de 24 h de tratamento. (B) Fotomicrografias (aumento de 100x) dos esferoides após 24, 48 e 72 h de tratamento com o IC50 e 2x IC50 da DG. (C) Volume médio dos esferoides antes (0h) e após 24 e 48 h de tratamento com o IC50 e 2x IC50 da DG. As barras de erro representam ± o desvio padrão da média de três repetições biológicas. * ($p<0,05$) e *** ($p<0,001$), indicam diferença na média do tratamento em relação ao controle, definida por ANOVA seguida do teste de Dunnett. CV, controle de veículo. DOX, Doxorrubicina.

3.7 DG Causa Morte Nas Células Dos Esferoides Em Sistema 3D

Nos esferoides controle, por meio dos marcadores de viabilidade celular FDA e PI, ficou evidente uma zona verde fluorescente (células viáveis) na zona clara e uma zona de fluorescência vermelha (células mortas) principalmente na zona escura. Nos esferoides tratados com DG, foi notado uma maior presença de células mortas na zona de células viáveis, após 24 horas de tratamento com o IC50 e, especialmente, 2x IC50 (Figura 7 A). Esses esferoides tratados com 2x IC50 tinham uma zona clara mais espessa em comparação com os esferoides controle (Figura 6 B), o que nos levou a realizar uma coloração com PI para entender a natureza das células nessa zona. Uma maior presença de células mortas foi observada na zona clara, principalmente no tratamento com 2x IC50, em comparação com o controle (Figura 7 B). O mesmo efeito foi observado nos esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 por 48 h (Figura S2). Além disso, notamos que, após 72 horas de tratamento com 2x IC50 de DG, havia tanto células mortas como células viáveis no entorno dos esferoides (Figura 7 C).

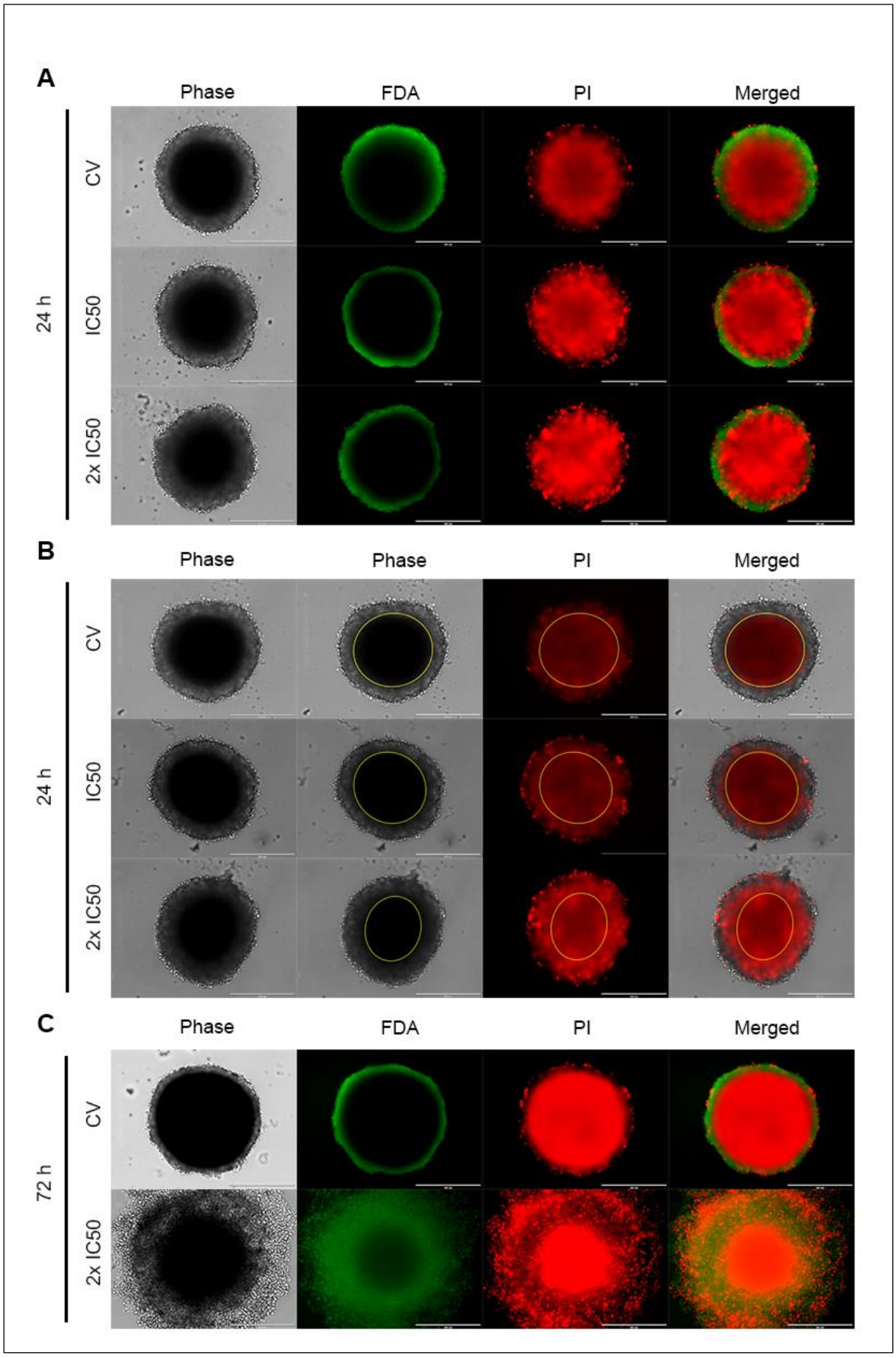

A
Phase
FDA
PI
Merged
24 h
CV
IC50
2x IC50
B
Phase
Phase
PI
Merged
24 h
CV
IC50
2x IC50
C
Phase
FDA
PI
Merged
72 h
CV
2x IC50

Figura 7 – DG induz morte em esferoides de células NCI-H460. (A) Fotomicrografias (aumento de 100x) dos esferoides corados com os indicadores de células viáveis (fluorescência verde do FDA, diacetato de fluoresceína) e mortas (fluorescência vermelha do PI, iodeto de propídio), após 24 h de tratamento com o IC50 e 2x IC50 da DG. Fotomicrografias (aumento de 100x) dos esferoides corados apenas com o PI após 24 h de tratamento com o IC50 e 2x IC50 da DG. O círculo amarelo delimita a zona escura dos esferoides. Fotomicrografias (aumento de 100x) das células desagregadas dos esferoides após 72 h de tratamento com 2x IC50 da DG. CV, controle de veículo.

3.8 DG Reduz A Proliferação E O Crescimento Clonogênico Nos Esferoides Em Sistema 3D

Após o período de recuperação, houve a formação de um halo de proliferação em torno dos esferoides. Os esferoides transferidos que se depositaram próximo a borda do poço de cultura não foram avaliados, pois formaram um halo de proliferação incompleto. Por esse motivo, nesse ensaio foram avaliados um número pequeno e variado de esferoides (8, 6 e 7 esferoides controle, IC50 μM e 2x IC50 μM, respectivamente) e, por conseguinte, os dados não foram submetidos à análise estatística inferencial. Os halos de proliferação dos esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 da DG tinham uma área média de 27,92% e de 35,04% menor em relação ao controle, respectivamente (Figura 8 A e B). Na superfície dos poços de cultura que continham os esferoides tratados, também foi observada um menor crescimento de células em forma de colônias, em comparação com o controle (Figura 8 C). No ensaio clonogênico, foi notado uma menor quantidade de colônias nos tratamentos com o IC50 e 2x IC50 da DG por 24 h em relação ao controle (Figura 8 D). Foi observado ainda uma intensidade de fluorescência relativa 30,00% e 53,61% menor nos tratamentos com o IC50 μM e 2x IC50 μM da DG, respectivamente, em comparação com o controle (Figura 8 E).

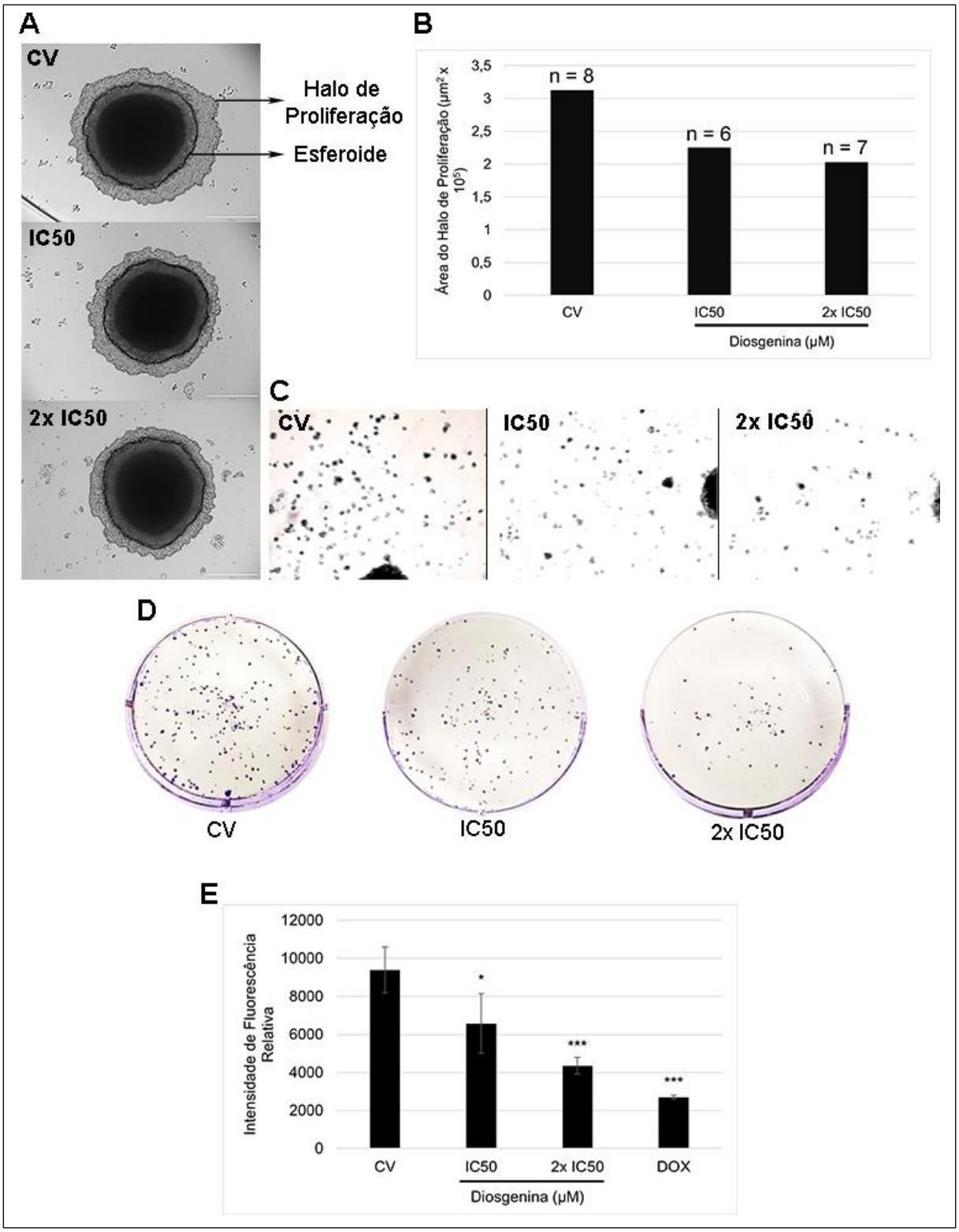


Figura 8 – DG inibe a recuperação e o crescimento clonogênico das células de esferoides de NCI-H460. (A) Fotomicrografias (aumento de 100x) representando o esferoide e o halo de proliferação, que foi formado após 24 h da transferência dos esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 da DG por 24 h para placas de cultura com superfície aderente e sem tratamento. (B) Área (µm^2) do halo de proliferação dos esferoides. (C) Fotomicrografias (aumento de 40x) das células que cresceram ao redor dos esferoides que foram transferidos para placas de cultura com superfície aderente. As células foram fixadas com solução 3:1 de metanol e ácido acético e coradas com cristal violeta (0,5%). (D) Imagens das colônias formadas após 5 dias do cultivo de 500 células viáveis, que foram provenientes de esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 por 24 h. As colônias foram fixadas com solução 3:1 de

metanol e ácido acético e coradas com cristal violeta (0,5%). (F) Intensidade de Fluorescência Relativa da resorufina (metabólito fluorescente do substrato resazurina) após 5 dias do plaqueamento de 500 células viáveis de esferoides tratados com o IC50 e 2x IC50 da DG por 24 h. As barras de erro representam ± o desvio padrão da média de três repetições biológicas. * ($p<0,05$) e *** ($p<0,001$), indicam diferença na média do tratamento em relação ao controle, definida por ANOVA seguida do teste de Dunnett. CV, controle de veículo. DOX, doxorrubicina.

4 DISCUSSÃO

A DG é um promissor metabólito vegetal com atividade anticâncer, pois regula múltiplas vias moleculares que sustentam diferentes características do câncer, que incluem o estresse oxidativo, a rápida proliferação, a resistência a morte e capacidade de invasão (KIM et al., 2012; YU et al., 2018; LI et al., 2021b). Outros estudos mostram que a inibição das células tronco cancerosas e a imunomodulação também são propriedades anticâncer desse fitoquímico (DONG et al., 2018; BHUVANALAKSHMI et al., 2017). No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos antiproliferativos da DG em células cancerosas pulmonares. Nesse contexto, nossos resultados auxiliam na compreensão desses efeitos da DG nas células NCI-H460 de carcinoma de pulmão de grandes células. O presente estudo é o primeiro a sugerir uma atividade da DG em regular vias da citocinese como mecanismo de formação de células multinucleadas e de inibição da proliferação celular. Nosso estudo também demonstrou pela primeira vez a ação da DG em induzir uma morte semelhante à necrose, a qual nossos dados de expressão sugerem ser a necroptose. Em adição, os efeitos antiproliferativos da DG também foram demonstrados em esferoides multicelulares, os quais melhor mimetizam as condições tumorais *in vivo*, em comparação com as culturas 2D.

No presente estudo, encontramos um valor de 44,36 µM de IC50 da DG nas células NCI-H460, o qual é próximo aos valores de 47 µM e 45 µM de IC50 da DG atingidos nos estudos de Mohammad et al. (2013) e Ganesan e Arockiam (2019), respectivamente, porém em células A549 de adenocarcinoma de pulmão, após 24 h de tratamento. Além disso, no tempo avaliado de 24 h, nossos resultados sugerem que os mecanismos antiproliferativos da DG podem ser influenciados pela sua concentração. Evidenciamos reduções na concentração celular com as concentrações inibitórias 12,5 e 25 da DG, que não foram citotóxicas pelo ensaio de morte celular, o que sugere um efeito de inibição da divisão celular (citostático). Por outro lado, a concentração celular foi menor com o IC50 da DG, que aumentou a morte celular, indicando um efeito citotóxico.

Estudos experimentais *in vitro* demonstraram que a DG pode afetar o ciclo celular em células tumorais, embora as fases específicas do ciclo celular afetadas possam variar de acordo

com a linhagem ou origem tecidual das células estudadas (LIAO et al., 2020; MOALIC et al., 2001; CORBIERE et al., 2004). Nas células NCI-H460, observamos um aumento no número de células com o dobro do conteúdo de DNA, que é uma característica das células nas fases G2/M do ciclo celular. No entanto, a análise de citometria de fluxo não permitiu concluir que a DG induzisse parada de ciclo de forma legítima em G2/M, já que também foi observada uma frequência maior de células binucleadas, que possuem o dobro do conteúdo de DNA e podem estar presentes em diferentes fases do ciclo celular (FUJIWARA et al., 2005). Esse efeito de multinucleação também foi observado em células de leucemia mieloide crônica K562 tratadas com DG (LIU et al., 2004), mas os mecanismos exatos de como a DG produz esse efeito ainda não são conhecidos.

Na literatura científica, foi relatada que as células binucleadas podem ser formadas devido à regressão do sulco de clivagem e à fusão das células-filhas decorrente da falha na citocinese (SHI; KING et al., 2005; NORMAND; KING, 2010). Em nossos experimentos, observamos que as células-filhas se fundiram em um momento após a formação do sulco de clivagem, sugerindo que a origem das células binucleadas em células NCI-H460 é a falha na citocinese.

O estudo de Kouranti et al. (2006) demonstrou que a inibição da proteína RAB35, responsável por regular o tráfego de membranas endocíticas, resulta no acúmulo de moléculas reguladoras da citocinese Septin2 e PtdIns(4,5)P2 (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) em vacúolos endocíticos, o que leva à falha na citocinese. De forma similar, observamos uma redução na expressão do gene *RAB35* e a presença de vacúolos citoplasmáticos em células tratadas com DG, sugerindo que esses vacúolos são originados a partir do processo endocítico e contribuem para a falha na citocinese. Além disso, a RAB35 hidrolisa, por meio da fosfatase OCRL (*inositol polyphosphate-5-phosphatase*), a PtdIns(4,5)P2, que afeta a degradação da F-actina na ponte intercelular da citocinese, regulando a abscisão (DAMBOURNET et al., 2011). A inibição da expressão da RAB35 ou da OCRL pode resultar em atraso ou inibição da abscisão, como descrito por Dambournet et al. (2011). Nossos resultados demonstram uma redução na expressão dos genes *RAB35* e *OCRL* nas células tratadas com DG, o que sugere um prejuízo na execução da abscisão. Futuros estudos que avaliem o tempo necessário para a abscisão após a formação do sulco de clivagem podem contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos moleculares da DG na abscisão das células NCI-H460.

As proteínas AURORA B e SURVIVINA são subunidades do complexo passageiro dos cromossomos (CPC), juntamente com as proteínas BOREALIN e INCENP (CARMENA et al.,

2012). A AURORA B regula a abscisão, direcionando a cadeia leve regulatória da miosina não-muscular do tipo II bifosforilada (2P-MRLC) à zona intermediária da célula na citocinese (KONDO et al., 2013). Segundo o estudo de Kondo et al. 2013, quando a atividade da AURORA B foi inibida pelo composto Hesperadin, a frequência de eventos de regressão do sulco de clivagem aumentou significativamente em comparação com as células não tratadas. Além disso, a inibição da expressão da SURVIVINA por oligonucleotídeo anti-sentido também resultou em regressão do sulco de clivagem em células HeLa (CHEN et al., 2000). A Survivna pode regular a montagem dos filamentos da miosina não muscular do tipo II (NMIIB), que formam o anel contrátil de actomiosina, necessário à citocinese, evitando a falha na citocinese, como descrito no estudo de Babkoff et al. (2019). Assim, nossos dados de expressão sugerem que a DG inibe o término da citocinese por meio da regulação negativa dos genes *BIRC5* e *AURKB*, que expressam as proteínas SURVIVINA e AURORA B, respectivamente.

Reporta-se na literatura que as células multinucleadas, formadas por defeitos na citocinese, podem ser mais vulneráveis a sofrerem morte celular (MCKENZIE; D'AVINO et al., 2016; CHIRCOP et al., 2017). No entanto, em nosso estudo, descobrimos que DG não causou morte celular em doses que induziram a formação de células multinucleadas. Isso sugere que a morte celular não foi causada pela presença de múltiplos núcleos nas células NCI-H460 durante o tempo estudado de 24 h.

A DG é reconhecida por induzir morte celular por apoptose (SETHI et al., 2018), porém nosso estudo mostrou que a DG não causou a externalização da fosfatidilserina. Em vez disso, evidenciamos características morfológicas condizentes com a necrose, tais como a tumefação celular e o rompimento da membrana plasmática. Nossos resultados de expressão sugerem ser a necroptose a morte causada pela DG nas células NCI-H460, pois identificamos um aumento na expressão dos genes *RIPK3* e *MLKL*, que expressam as proteínas reguladoras da necroptose RIPK3 e MLKL. Durante a necroptose, as proteínas RIPK1 (*receptor interacting protein kinase*-1) e RIPK3 formam um complexo de proteínas conhecido como necrossoma. Por meio da RIPK3, a proteína MLKL é fosforilada, o que a faz se polimerizar e se dirigir à membrana plasmática, induzindo a necroptose (SEO et al., 2021). A proteína RIPK3 ainda participa da via de ativação da necroptose estimulando o metabolismo celular aeróbico e a produção de EROs intracelular por meio da ativação de enzimas mitocondriais (ZHANG et al., 2009; YANG et al., 2018). Em nosso estudo, observamos um aumento nos níveis de EROs intracelulares nas células NCI-H460 tratadas com DG, sugerindo que esse pode ser um mecanismo pelo qual a DG induz a necroptose. A proteína TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor associated factor*-2) tem o papel de inibir a necroptose, competindo com a RIPK3 pela ligação com a MLKL (PETERSEN

et al., 2015). A diminuição da expressão do gene *TRAF2* induzida pela DG pode ter contribuído para a necroptose, reduzindo a inibição dessa via de morte. Além disso, outra alteração molecular causada pela DG envolveu o aumento na expressão do gene *HSPA5*, que expressa a chaperona HSP70 (*Heat shock protein* 70). De acordo com Johnston et al. (2020), a HSP70 pode promover a polimerização da MLKL durante a necroptose.

Em cultura celular 3D, observamos que o tratamento com DG inibiu a proliferação celular dos esferoides, reduzindo significativamente o volume após 24 h de tratamento. No entanto, notamos que após 48 horas de tratamento, os volumes dos esferoides foram superiores ao controle. Isso pode ser explicado pelo fato de que as células dos esferoides tratados estavam menos coesas, o que resultou em uma morfologia menos compacta. Esse mesmo efeito foi observado em outros estudos que usaram nanopartículas de prata de Fe_3O_4 e DG em células de astrocitoma humano (D384) e carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A), respectivamente (DE SIMONE et al., 2018; DA SILVA et al., 2022). Em nosso estudo, notamos ainda uma maior presença de células mortas na zona de células viáveis nos esferoides tratados por 24 h. As células viáveis nos esferoides mantêm a sua estrutura compacta, por meio das interações intercelulares (SMYREK et al., 2019; LIN et al., 2006). Assim, a morte celular causada pela DG pode ser uma das causas da menor coesão entre as células. O espessamento da zona clara e a redução da zona escura nos esferoides tratados, pode ser o resultado da menor compactação das células na zona escura, composta por células mortas, devido a perda da integridade das interações célula-célula na zona de células viáveis dos esferoides. Isso explica uma maior presença de células mortas na zona clara de células nos esferoides tratados com a DG.

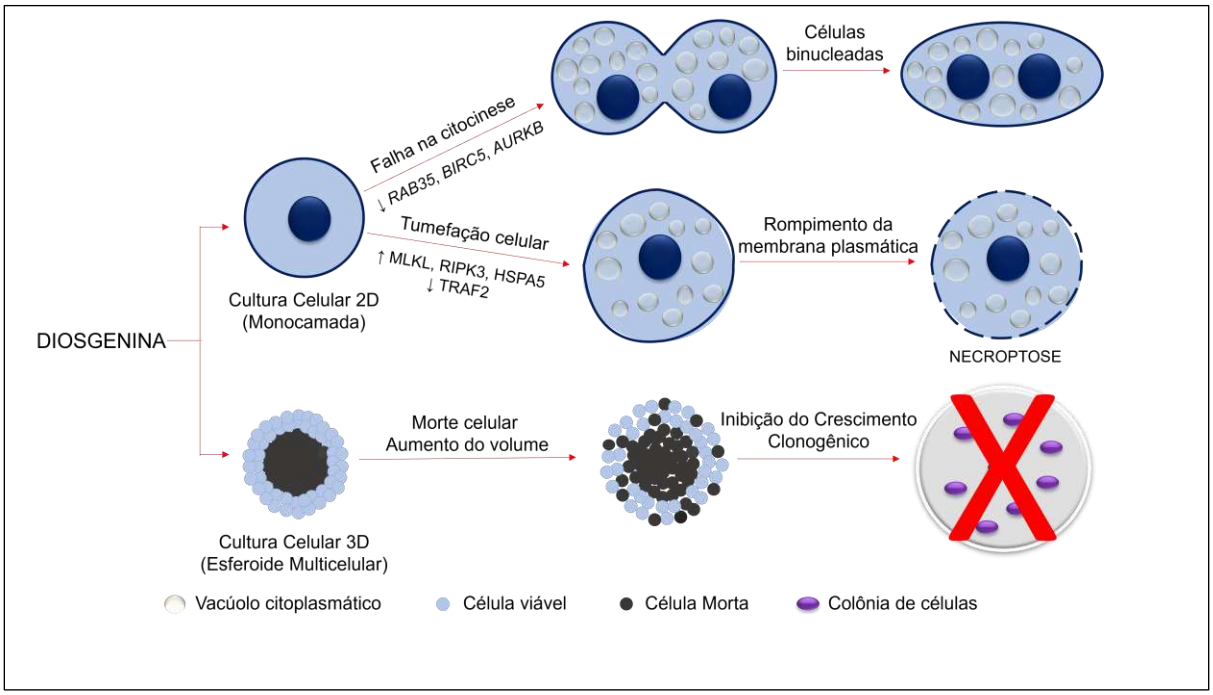
No desagregado de células dos esferoides tratados por 72 h com 2x IC50 também observamos a presença de células viáveis, o que sugere que as interações célula-célula e/ou célula-matriz extracelular foram comprometidas pela DG. Apesar desse efeito levantar uma preocupação quanto ao potencial efeito da DG na metástase, dado que o desprendimento de células viáveis de um tumor sólido primário é um evento necessário à metástase (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017), nossos dados também sugerem que a DG pode reduzir o potencial proliferativo das células dos esferoides. A DG reduziu tanto a recuperação da proliferação celular como também a capacidade de células individuais de se reproduzem e formarem colônias. Esse último resultado, demonstra a capacidade da DG em inibir o crescimento clonogênico das células, que é uma característica necessária à iniciação de tumores em locais secundários (LI et al., 2019).

O nosso estudo fornece as primeiras evidências *in vitro* da atividade antimitótica da DG em células tumorais de pulmão por meio da regulação da citocinese. Entretanto, as consequências da multinucleação não estão claras em nosso estudo, uma vez que células multinucleadas frequentemente possuem centrossomos supranumerários, apresentando maior probabilidade de se tornarem aneuploides e cromossomicamente instáveis, o que pode contribuir com a evolução tumoral (FUJIWARA et al., 2005). Estudos mostram que as células com centromossos supranumerários podem ser alvo de inibidores do agrupamento dos centrossomos, de maneira a reduzir a viabilidade dessas células (KWON et al., 2008). Em adição, as células poliploides podem ser seletivamente eliminadas por compostos antioxidantes (ROH; MEER; ABDULKADIR, 2012). Assim, estudos futuros podem revelar um promissor efeito anticâncer da DG em associação com compostos inibidores do agrupamento dos centrossomos ou compostos antioxidantes. Nosso estudo também sugere um promissor efeito da DG em induzir a necroptose como uma modalidade de morte celular alternativa à apoptose, que pode ser útil para superar a resistência à apoptose (KOREN; FUCHS, 2021). Por fim, nosso estudo apresenta evidências da atividade antiproliferativa da DG em esferoides multicelulares, fornecendo dados mais realistas da atividade anticâncer dessa sapogenina em tumores sólidos *in vivo*.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, a inibição da proliferação celular pela DG foi acompanhada da fusão das células-filhas, produção de células multinucleadas e inibição de genes de controle do tráfego de membranas (*RAB35*) e do CPC (*AURKB* e *BIRC5*), o que sugere uma inibição da citocinese nas células NCI-H460 pela DG. Nossos resultados também sugeriram que a DG induz morte por necroptose, pois interferiu na expressão de genes que regulam esse processo de morte (*RIPK3*, *MLKL*, *HSPA5* e *TRAF2*) e causou um aumento na produção de EROs intracelular. Ademais, a DG inibiu a proliferação nos esferoides multicelulares ao induzir morte celular, inibir a recuperação da proliferação celular e inibir o crescimento clonogênico das células. Portanto, de acordo com os nossos achados, a DG pode ser considerado um promissor fármaco no câncer de pulmão, particularmente devido as suas atividades antimitótica e de indução de morte não apoptótica.

RESUMO GRÁFICO



REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer A-Z:** Lung Cancer. 2022. Disponível em: https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html. Acesso em: 10 out. 2022.

BABKOFF, Aryeh et al. A direct interaction between survivin and myosin II is required for cytokinesis. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 14, p. jcs233130, 2019.

BAXEVANOS, Panagiotis; MOUNTZIOS, Giannis. Novel chemotherapy regimens for advanced lung cancer: have we reached a plateau?. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 8, 2018.

BHUVANALAKSHMI, G. et al. Breast cancer stem-like cells are inhibited by diosgenin, a steroidal saponin, by the attenuation of the Wnt β-catenin signaling via the Wnt antagonist secreted frizzled related protein-4. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 124, 2017.

CARMENA, Mar et al. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 12, p. 789-803, 2012.

CHAUDHARY, Spandan A. et al. Validation of a method for diosgenin extraction from fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.). **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 17, n. 4, p. 377-385, 2018.

CHEN, Jun et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. **Neoplasia**, v. 2, n. 3, p. 235-241, 2000.

CHIRCOP, Megan et al. Inhibition of Dynamin by Dynole 34-2 Induces Cell Death following Cytokinesis Failure in Cancer CellsDynoles Are Anticancer Compounds. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1553-1562, 2011.

CHOUDHARI, Amit S. et al. Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1614, 2020.

COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

CORBIERE, Cecile et al. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. **International journal of oncology**, v. 22, n. 4, p. 899-905, 2003.

CRUZ, Marina Sampaio et al. Diosgenin induces genotoxic and mutagenic effects on HepG2 cells. **Food and chemical toxicology**, v. 120, p. 98-103, 2018.

CUI, Hongmei et al. Recent advances in elucidating paclitaxel resistance mechanisms in non-small cell lung cancer and strategies to overcome drug resistance. **Current medicinal chemistry**, v. 27, n. 39, p. 6573-6595, 2020.

DA SILVA, Matheus Felipe et al. Diosgenin increases BBC3 expression in HepG2/C3A cells and alters cell communication in a 3D spheroid model. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 879, p. 503512, 2022.

DAMBOURNET, Daphné et al. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. **Nature cell biology**, v. 13, n. 8, p. 981-988, 2011.

DE SIMONE, Uliana 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.

DONG, Mengxue et al. Diosgenin promotes antitumor immunity and PD-1 antibody efficacy against melanoma by regulating intestinal microbiota. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 10, p. 1039, 2018.

DUMA, Narjust; SANTANA-DAVILA, Rafael; MOLINA, Julian R. Non–small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2019. p. 1623-1640.

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.

EL GAAFARY, Menna et al. Acovenoside A induces mitotic catastrophe followed by apoptosis in non-small-cell lung cancer cells. **Journal of natural products**, v. 80, n. 12, p. 3203-3210, 2017.

FENECH, Michael et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.

FERLAY, Jacques et al. **Global Cancer Observatory:** Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020a. Disponívem em: https://gco.iarc.fr/today. Acesso em: 13 out. 2022.

FERLAY, Jacques et al. **Global Cancer Observatory:** Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020b. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow. Acesso em: 13 out. 2022.

FUJIWARA, Takeshi et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1043-1047, 2005.

HAN, Qinrui et al. Resibufogenin suppresses colorectal cancer growth and metastasis through RIP3-mediated necroptosis. **Journal of translational medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2018.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HUANG, Huaming et al. Diosgenin inhibits the epithelial-mesenchymal transition initiation in osteosarcoma cells via the p38MAPK signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 18, n. 4, p. 4278-4287, 2019.

JAHFAR, M. et al. Assay of steroidal sapogenin in Costus speciosus rhizomes. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 1382, 2008.

KAWAMURA, Eiko et al. Identification of novel small molecule inhibitors of centrosome clustering in cancer cells. **Oncotarget**, v. 4, n. 10, p. 1763-1776, 2013.

KARNA, P. et al. A novel microtubule-modulating noscapinoid triggers apoptosis by inducing spindle multipolarity via centrosome amplification and declustering. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 4, p. 632-644, 2011.

KIM, Dae Sung et al. Diosgenin induces apoptosis in HepG2 cells through generation of reactive oxygen species and mitochondrial pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

KLIMASZEWSKA-WIŚNIEWSKA, Anna et al. Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton. **Acta histochemica**, v. 119, n. 2, p. 99-112, 2017.

KONDO, Tomo et al. Aurora B but not rho/MLCK signaling is required for localization of diphosphorylated myosin II regulatory light chain to the midzone in cytokinesis. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70965, 2013.

KOREN, Elle; FUCHS, Yaron. Modes of Regulated Cell Death in CancerModes of Regulated Cell Death in Cancer. **Cancer discovery**, v. 11, n. 2, p. 245-265, 2021.

KOURANTI, Ilektra et al. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. **Current biology**, v. 16, n. 17, p. 1719-1725, 2006.

KWON, Mijung et al. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. **Genes & development**, v. 22, n. 16, p. 2189-2203, 2008.

LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017.

LEE, S. H. et al. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. **Cell death & differentiation**, v. 20, n.1, p. 64-76, 2013.

LI, Feng et al. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. **Cancer letters**, v. 292, n. 2, p. 197-207, 2010.

LI, Jinhua et al. The phytochemical scoulerine inhibits aurora kinase activity to induce mitotic and cytokinetic defects. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 8, p. 2312-2320, 2021a.

LI, Joey H. et al. IQGAP1 maintains pancreatic ductal adenocarcinoma clonogenic growth and metastasis. **Pancreas**, v. 48, n. 1, p. 94, 2019.

LI, Si-Yang et al. Diosgenin exerts anti-tumor effects through inactivation of cAMP/PKA/CREB signaling pathway in colorectal cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 908, p. 174370, 2021b.

LIAO, Wen-Ling et al. Induction of G2/M phase arrest by diosgenin via activation of Chk1 kinase and Cdc25C regulatory pathways to promote apoptosis in human breast cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 172, 2019.

LIN, Chueh-Yu et al. Tanshinone IIA shows higher antiproliferative activities than sinapic acid in 4 cancer cell lines and simultaneously induces apoptosis and necroptosis in human lung cancer A549 cells. **Natural Product Communications**, v. 16, n. 10, p. 1934578X211050521, 2021.

LIN, Ruei-Zeng et al. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β1-integrin. **Cell and tissue research**, v. 324, n. 3, p. 411-422, 2006.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LU, Zongliang et al. Ophiopogonin D′, a natural product from radix ophiopogonis, induces in vitro and in vivo RIPK1-dependent and caspase-independent apoptotic death in androgen-independent human prostate cancer cells. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 432, 2018.

MAO, Xiao-Mei et al. Diosgenin suppresses cholangiocarcinoma cells via inducing cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 9093, 2019.

MCKENZIE, Callum; D'AVINO, Pier Paolo. Investigating cytokinesis failure as a strategy in cancer therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 52, p. 87323, 2016.

MOALIC, Sandra et al. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. **FEBS letters**, v. 506, n. 3, p. 225-230, 2001.

NEOPHYTOU, Christiana M. et al. Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4363, 2021.

NORMAND, Guillaume; KING, Randall W. Understanding cytokinesis failure. **Polyploidization and cancer**, p. 27-55, 2010.

O'BRIEN, John et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

PETERSEN, S. L. et al. TRAF2 is a biologically important necroptosis suppressor. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 11, p. 1846-1857, 2015.

PICCININI, Filippo. 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, Filippo; TESEI, Anna; BEVILACQUA, Alessandro. Single-image based methods used for non-invasive volume estimation of cancer spheroids: a practical assessing approach based on entry-level equipment. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 135, p. 51-60, 2016.

SETHI, Gautam et al. Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: a comprehensive and critical review. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 645, 2018.

SEMWAL, Prabhakar et al. Diosgenin: An Updated Pharmacological Review and Therapeutic Perspectives. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.

SEO, Jinho et al. Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 6, p. 1007-1017, 2021.

SHI, Qinghua; KING, Randall W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1038-1042, 2005.

SMYREK, I. et al. E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. **Biology Open**, v. 8, n. 1, p. bio037051, 2019.

SNYDER, Annelise G. et al. Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. **Science immunology**, v. 4, n. 36, p. eaaw2004, 2019.

SUN, Wen et al. Inhibition of lung cancer by 2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone through induction of necroptosis by targeting receptor-interacting protein 1. **Antioxidants & redox signaling**, v. 31, n. 2, p. 93-108, 2019.

ROH, Meejeon; VAN DER MEER, Riet; ABDULKADIR, Sarki A. Tumorigenic polyploid cells contain elevated ROS and ARE selectively targeted by antioxidant treatment. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 2, p. 801-812, 2012.

TRAVIS, William D. et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. **Journal of thoracic oncology**, v. 10, n. 9, p. 1243-1260, 2015.

WANG, Qing et al. Diosgenin promotes cisplatin-induced apoptosis through oxidative DNA damage in A549 non-small cell lung cells. **Cell Biology International**, v. 46, n. 10, p. 1571-1576, 2022.

XU, Liang et al. Synthesis and potent cytotoxic activity of a novel diosgenin derivative and its phytosomes against lung cancer cells. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1933-1942, 2019.

YAN, Ziqi et al. The phytochemical, corynoline, diminishes Aurora kinase B activity to induce mitotic defect and polyploidy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 147, p. 112645, 2022.

YANG, Zhentao et al. RIP3 targets pyruvate dehydrogenase complex to increase aerobic respiration in TNF-induced necroptosis. **Nature cell biology**, v. 20, n. 2, p. 186-197, 2018.

YI, Tao et al. Comparative analysis of diosgenin in Dioscorea species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS. **BMC biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2014.

YU, Hong et al. Diosgenin increased DDX3 expression in hepatocellular carcinoma. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 11, p. 3590, 2018.

YUHAS, John M. et al. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. **Cancer research**, v. 37, n. 10, p. 3639-3643, 1977.

ZANETTI, Thalita Alves et al. Response of HepG2/C3A cells supplemented with sodium selenite to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 209-215, 2018.

ZANONI, Michele. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, v. 6, n. 19103, p. 1-11, 2016.

ZHANG, Duan-Wu et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. **Science**, v. 325, n. 5938, p. 332-336, 2009.

ZHANG, Jin et al. Diosgenin inhibits the expression of NEDD4 in prostate cancer cells. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 6, p. 3461, 2019.

ZHANG, Min et al. The roles of ROS and caspases in TRAIL-induced apoptosis and necroptosis in human pancreatic cancer cells. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0127386, 2015.

ZHANG, Ying; SHAO-HUI, Yang; XIU-LI, Guo. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 96, p. 659-666, 2017.

ZHANG, Yingying et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Cell research**, v. 28, n. 1, p. 9-21, 2018.

JOHNSTON, Andrea N. et al. Necroptosis-blocking compound NBC1 targets heat shock protein 70 to inhibit MLKL polymerization and necroptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 12, p. 6521-6530, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Material Suplementar – Tabela

Tabela S1 – Sequências iniciadora *forward* e *reverse* dos genes alvo utilizados na RT-qPCR.

Genes Alvo	Forward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'
APC	AAAGCGCCATGATATTGCACGGTC	TGTTTGCTGTGCTCACGTTTCCAG
ATM	ACCATTGTAGAGGTCCTTC	GTCTCATTAAGACACCGTTCAG
AURKB	ATTGGAGTGCTTTGCTATG	TTTAGGTCCACCTTGACG
BBC3	GTAAGATACTGTATATGCGCTG	TTTTCCACTGTTCCAATCTG
BCL2	GATTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTCCACAAAGGCATCC
BECN1	CAGTATCAGAGAGAATACAGTG	TGGAAGGTTGCATTAAAGAC
BIRC5	AGCCCTTTCTCAAGGACCAC	TGGCTCGTTCTCAGTGGGGCAGT
CASP8	GCAAAAGCACGGGAGAAAGT	TGCATCCAAGTGTGTTCCATTC
CCNB1	AGAGCATCTAAGATTGGAGAG	CCATGTCATAGTCCAACATAG
CDK1	ATGAGGTAGTAACACTCTGG	CCTATACTCCAAATGTCAACTG
CHEK1	GGTGAATATAGTGCTGCTATGTTGACA	TTGGATAAACAGGGAAGTGAACAC
EIF2AK3	CAAACCAGAGGTATTTGGGAAT	GAAAGGAACTGTTTCCATGCT T
ERN1	ACGGACGTCAAGTTTGATCC	TTGGTAGACGCAGACAGTGG
GADD153	AGCAGATGTGCTTTTCCAGAC	GTCCTCATACCAGGCTTCCA
GADD45G	CATTTTACGCTGATCCAGG	GGGTTCGAAATGAGGATG
GPX1	CTCCCCTTACAGTGCTTGTTCG	CGATGTCAATGGTCTGGAAG
H2AFX	AATCCAAGCACCTAGATACC	CAGAATTCCAGTTCAGAAGC
HSPA5	GTGGAATGACCCGTCTGTG	TGCCCACCTCCAATATCAAC
MLKL	GTGAAGAATGTGAAGACTGG	AAGATTTCATCCACAGAGGG
MTOR	GAAGTTTCCAGAGAAGATTCC	GTGATTCTGTAGTTGCCATC
NFKB1	GCAGCTCTTCTCAAAGCAGCA	GCTCAAAGTTCTCCACCAGGG
OCRL	TGGAACTTGGAATGTGAATG	TCCAATGCAGTAGATATCAGG
PRC1	ACTACACAGAAAGTCTGCTC	CTCTCAAACTCTAAGAAAAGCC
RAB35	TTCACGAAATCAACCAGAAC	CGAATTTGTAGGCATCTTCC
RIPK1	TGATAATACCACTAGTCTGACG	ACAGTTTTTCCAGTGCTTTC
RIPK3	AACTTTCAGAAACCAGATGC	GTTGTATATGTTAACGAGCGG
RPLP0	AGATGCAGCAGATCCGCAT	GTGGTGATACCTAAAGCCTG
SESN1	CAGATGCATGCTTTATTTGC	AATATTGTGGGTGGAAAACC
SOD1	CTAGCGACTTATGGCGAC	GAATGTTTATTGGGCGATC
SQSTM1	TCCGAGTGTGAATTTCCTG	AGCTGCCACACTCTCC
TNF	AGGCAGTCAGATCATCTTC	TTATCTCTCAGCTCCACG
TRAF2	GCCCCAAGTTCCCCTTAACT	GAATCTGCAAGGGACTCGAC

APÊNDICE B

Material Suplementar – Figuras

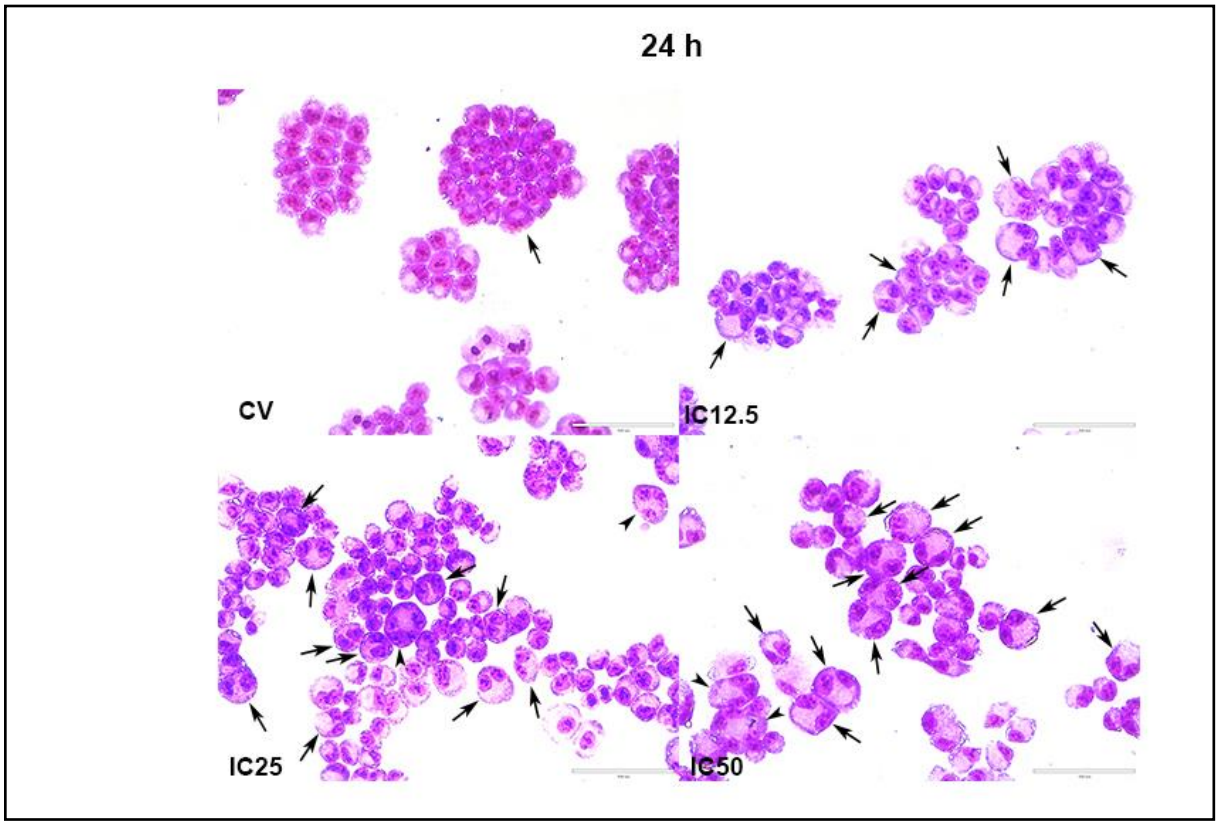


Figura S1 - DG aumenta o número de núcleos nas células NCI-H460. Fotomicrografias (aumento de 400x) de células após 24 h de tratamento com o IC12,5, IC25 e IC50 da DG com células binucleadas (setas pretas) e número maior que dois núcleos (ponta de seta preta).

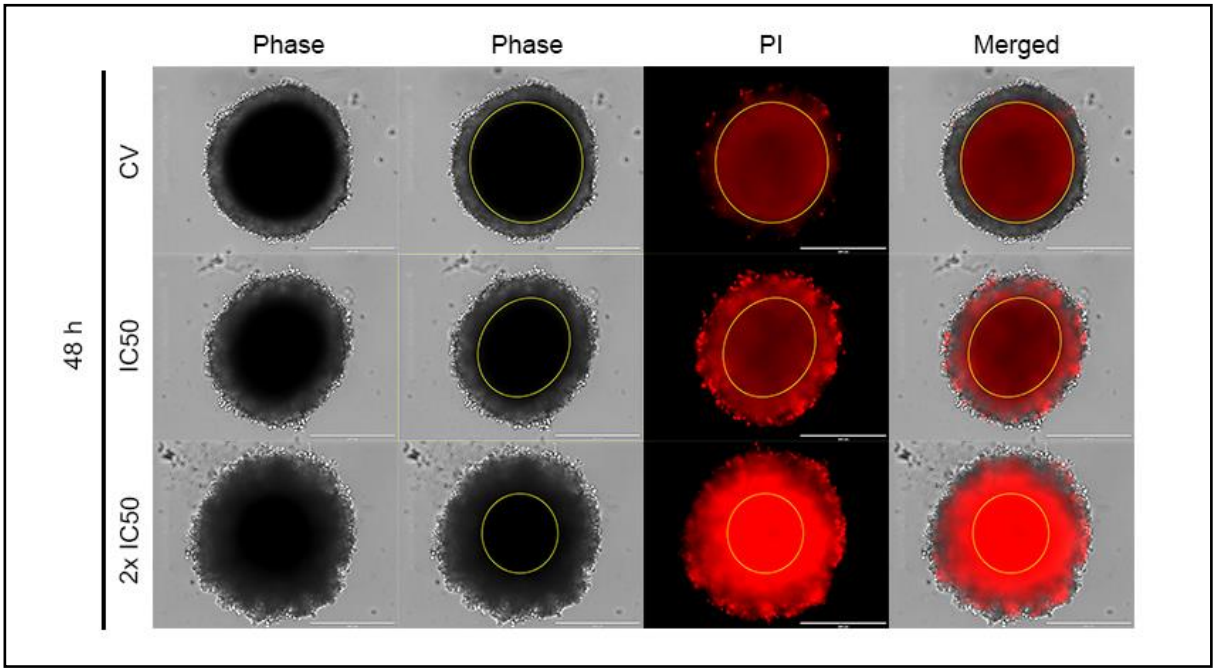


Figura S2 - DG induz aumento de células mortas na zona clara dos esferoides de células NCI-H460. Fotomicrografias (aumento de 100x) dos esferoides corados apenas com o PI após 48 h de tratamento com o IC50 e 2x IC50 da DG. O círculo amarelo delimita a zona escura dos esferoides.

APÊNDICE C

Material Suplementar – *Links* dos vídeos de *time lapse*

https://youtu.be/d49XEg_jUG0 - Link vídeo S1 A

https://youtu.be/NbOQtsOv5h8 - Link vídeo S1 B

https://youtu.be/jPROlm9iE-E - Link vídeo S1 C

https://youtu.be/TY3JxL_5Y18 - Link vídeo S1 D

https://youtu.be/osbCY59YzYg - Link vídeo S2 A

https://youtu.be/ZaggJX8w_3Q - Link vídeo S2 B

ANEXO

ANEXO A

Parecer de Defesa de Tese de Mestrado

Universidade Estadual de Londrina

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

202110650006

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DEFESA DE TESE DE MESTRADO

Discente: MATHEUS FELIPE DA SILVA

Título: Efeitos Antiproliferativos da Diosgenina em Células de Carcinoma de Pulmão (NCI-H460)

Data da Defesa: 16/02/2023, às 14:00 horas

Banca Examinadora

PRESIDENTE:
Dr. MÁRIO SÉRGIO MANTOVANI - UEL

TITULARES:

Drª. DAISY MARIA FAVARO SALVADORI - UNESP

Dr. PHELIPE OLIVEIRA FAVARON – UEL

PARECER	
APROVADO	REPROVADO
X	
X	
X	

Parecer Final: APROVADO

[redacted]
Dr. MÁRIO SÉRGIO MANTOVANI - UEL

[redacted]
Drª. DAISY MARIA FAVARO SALVADORI - UNESP

[redacted]
Dr. PHELIPE OLIVEIRA FAVARON – UEL