

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

KATIUSKA TUTTIS RODRIGUES

**Avaliação dos efeitos da associação entre sulforafano e vitamina D  
sobre a citotoxicidade, genotoxicidade, migração celular e modulação  
da expressão gênica em células humanas tumorais de próstata  
(DU145 e PC-3)**

Ribeirão Preto

2022

KATIUSKA TUTTIS RODRIGUES

**Avaliação dos efeitos da associação entre sulforafano e vitamina D  
sobre a citotoxicidade, genotoxicidade, migração celular e modulação  
da expressão gênica em células humanas tumorais de próstata  
(DU145 e PC-3)**

**Versão Corrigida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Area de concentração: Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lusânia Maria Greggi Antunes

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rodrigues, Kátiuska Tuttis

Avaliação dos efeitos da associação entre sulforafano e vitamina D sobre a citotoxicidade, genotoxicidade, migração celular e modulação da expressão gênica em células humanas tumorais de próstata (DU145 e PC-3). Ribeirão Preto, 2022.

95 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Antunes, Lusânia Maria Greggi.

1. Calcitriol.
2. Nutrigenômica.
3. Potencialização.
4. Quimioprevenção.

## Folha de aprovação

Katiuska Tuttis Rodrigues

Avaliação dos efeitos da associação entre sulforafano e vitamina D sobre a citotoxicidade, genotoxicidade, migração celular e modulação da expressão gênica em células humanas tumorais de próstata (DU145 e PC-3)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Area de concentração: Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lusânia Maria Greggi Antunes

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

## **Normalização Adotada**

Este documento foi elaborado de acordo com:

Universidade de São Paulo. Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica.  
Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT). São  
Paulo, 2020.

## **Apoio e Suporte Financeiro**

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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo Nº 2017/24576-0.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo Nº 302479/2019-8.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lusânia Maria Greggi Antunes, por me receber em seu grupo de pesquisa, me orientar, aconselhar e dividir seus conhecimentos científicos e suas vivências, possibilitando e estimulando meu desenvolvimento profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos e momentos de confraternização com nosso grupo.

À minha colega de laboratório, amiga e parceira para todas as horas, Ana Rita Thomazela Machado. Por toda ajuda e colaboração desde o início, por sua amizade e companheirismo, por ter compartilhado a bancada e os dias comigo durante esses anos e se tornar minha segunda família enquanto estive em Ribeirão Preto. Obrigada por tudo.

Aos amigos do Laboratório de Nutrigenômica, Patrick Wellington da Silva dos Santos, Diego Luís Ribeiro, Rone Aparecido De Grandis, Tainá Keiller Leão, Alexandre Ferro Aissa, Lívia Cristina Hernandez, Caroline Andolfato Sanchez e Mariane Minussi Baptistella, e às técnicas Regislaine Valéria Burim e Joana D'arc Castania Darin, que sempre me ajudaram, compartilharam seu tempo e seus conhecimentos, suas alegrias e frustrações.

Ao meu namorado Alan Pércles Rodrigues Lorenzetti por sempre se dispor a me ajudar, conceder apoio psicológico e emocional, e me acompanhar durante essa jornada.

À minha família, em especial aos meus pais Celso Tuttis Rodrigues e Ivone Yaeko Tuttis Rodrigues, por me incentivarem a estudar e proporcionar o suporte necessário para que eu pudesse continuar minha formação acadêmica. Obrigada pelo apoio, carinho e compreensão.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética (FMRP-USP), à secretária Susie Nalon e ao coordenador Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder.

## Resumo

RODRIGUES, K. T. **Avaliação dos efeitos da associação entre sulforafano e vitamina D sobre a citotoxicidade, genotoxicidade, migração celular e modulação da expressão gênica em células humanas tumorais de próstata (DU145 e PC-3)**. 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Atualmente, o câncer de próstata é o segundo mais incidente em homens no Brasil. Apesar das terapias disponíveis, não existe um tratamento que seja eficiente para os casos de câncer em estágio avançado ou metastático. Sulforafano e vitamina D separados têm apresentado atividade anticâncer promissora em estudos *in vitro* e *in vivo*, no entanto, quando utilizados em testes clínicos seus efeitos têm sido limitados devido à baixa biodisponibilidade. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da associação de sulforafano e vitamina D sobre a viabilidade celular, citotoxicidade, indução de apoptose e danos no DNA, estresse oxidativo e autofagia, atividade clonogênica e migratória, modulação do ciclo celular, expressão de genes e proteínas em células humanas tumorais de próstata obtidas de metástases (DU145 e PC-3), a fim de verificar um possível efeito sinérgico entre eles. Em células DU145 após 72 horas de tratamento, vitamina D diminuiu a viabilidade celular em ensaio de vermelho neutro e sulforafano diminuiu a viabilidade celular em ensaio de MTT e vermelho neutro. Em células PC-3, vitamina D e sulforafano diminuíram a viabilidade celular em ensaio de MTT e vermelho neutro. O tratamento associado (sulforafano + vitamina D) diminuiu a viabilidade celular quando comparado aos tratamentos isolados após 24 horas, mas não houve alteração após 72 horas. Sulforafano induziu citotoxicidade e sua associação com vitamina D potencializou o efeito citotóxico do sulforafano em ambas as linhagens. Sulforafano induziu morte por apoptose e parada do ciclo celular em DU145 (fase S e G2) e PC-3 (fase G2). Vitamina D e sulforafano inibiram a atividade clonogênica em PC-3, mas somente sulforafano diminuiu a capacidade de formar colônias em células DU145. Após o tratamento associado, não foi observada qualquer diferença na indução de apoptose, modulação do ciclo celular ou capacidade clonogênica quando comparadas aos tratamentos isolados. Não houve alteração na migração celular em nenhuma das concentrações testadas, tanto em tratamento isolado como associado nas duas linhagens. Após o tratamento isolado, vitamina D e sulforafano não induziram formação de espécies reativas e danos no DNA. Entretanto, o tratamento associado foi genotóxico em DU145 e induziu estresse oxidativo em DU145 (3 e 24 horas) e PC-3 (3 horas). Sulforafano aumentou a autofagia e a associação do sulforafano com a vitamina D potencializou seu efeito autofágico em ambas as linhagens. Após o tratamento associado em células DU145, a expressão dos genes *MAPK1*, *CCNB1*, *CDK1* e *CTNNB1* aumentou. As proteínas BAX, CASP8, CASP3, NRF2 e JNK foram mais expressas, e BCL2 menos expressa em relação ao controle. Em células PC-3 foi observado aumento da expressão dos genes *MAPK1* e *CCNB1* e das proteínas BAX e NRF2, e diminuição da expressão do gene *TNF* e das proteínas BCL2, CASP8 e JNK. Após a predição das interações entre alvos, sulforafano e vitamina D, foi apresentada a via MAPK como possível via de sinalização responsável pelos efeitos encontrados com o tratamento associado. Esses resultados demonstram que a associação de sulforafano e vitamina D tem potencial para uso na terapia do câncer de próstata.

**Palavras-chave:** Calcitriol. Nutrigenômica. Potencialização. Quimioprevenção.



## Abstract

RODRIGUES, K. T. **Evaluation of the effects of the association between sulforaphane and vitamin D on cytotoxicity, genotoxicity, cell migration and modulation of gene expression in human prostate tumor cells (DU145 e PC-3).** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Currently, prostate cancer is the second most incident in men in Brazil. Despite the available therapies, there is no treatment that is efficient for cases of advanced or metastatic cancer. Separated sulforaphane and vitamin D have shown promising anticancer activity in *in vitro* and *in vivo* studies, however, when used in clinical trials, their effects have been limited due to low bioavailability. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of the association of sulforaphane and vitamin D on cell viability, cytotoxicity, induction of apoptosis and DNA damage, oxidative stress and autophagy, clonogenic and migratory activity, cell cycle modulation, expression of genes and proteins in human prostate tumor cells obtained from metastases (DU145 and PC-3), in order to verify a possible synergistic effect between them. In DU145 cells after 72 hours of treatment, vitamin D decreased cell viability in neutral red assay and sulforaphane decreased cell viability in MTT and neutral red assay. In PC-3 cells, vitamin D and sulforaphane decreased cell viability in MTT and neutral red assay. The associated treatment (sulforaphane + vitamin D) decreased cell viability when compared to isolated treatments after 24 hours, but there was no change after 72 hours. Sulforaphane induced cytotoxicity and its association with vitamin D potentiated the cytotoxic effect of sulforaphane on both cell lines. Sulforaphane induced cell death by apoptosis and cell cycle arrest in DU145 (S and G2 phase) and PC-3 (G2 phase). Vitamin D and sulforaphane inhibited clonogenic activity in PC-3, but only sulforaphane decreased the ability to form colonies in DU145 cells. After the associated treatment, no difference was observed in the induction of apoptosis, cell cycle modulation or clonogenic capacity when compared to the isolated treatments. There was no change in cell migration at any of the concentrations tested, either in isolated or associated treatment in the two cell lines. Vitamin D and sulforaphane did not induce formation of reactive species and DNA damage. However, the associated treatment was genotoxic in DU145 and induced oxidative stress in DU145 (3 and 24 hours) and PC-3 (3 hours). Sulforaphane increased the autophagy and its association with vitamin D potentiated this effect in both cell lines. After the associated treatment in DU145 cells, the expression of *MAPK1*, *CCNB1*, *CDK1* and *CTNNB1* genes was increased. The proteins BAX, CASP8, CASP3, NRF2 and JNK were more expressed, and BCL2 less expressed in relation to the control. In PC-3 cells, there was an increase in the expression of the *MAPK1* and *CCNB1* genes and of the BAX and NRF2 proteins, and a decrease in the expression of the *TNF* gene and of the BCL2, CASP8 and JNK proteins. After predicting the interactions between targets, sulforaphane and vitamin D, the MAPK pathway was presented as a possible signaling pathway responsible for the effects found with the associated treatment. These results demonstrate that the association of sulforaphane and vitamin D has potential for use in prostate cancer therapy.

**Keywords:** Calcitriol. Nutrigenomics. Potentiation. Chemoprevention.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema da conversão da glucorafanina em sulforafano por ação da enzima mirosinase ou da microbiota intestinal. ....	19
<b>Figura 2.</b> Esquema representando a síntese de calcitriol a partir da vitamina D3. ....	21
<b>Figura 3.</b> Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D .....	28
<b>Figura 4.</b> Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D em associação em protocolo de tratamento simultâneo .....	29
<b>Figura 5.</b> Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D em associação em protocolo de pré-tratamento .....	29
<b>Figura 6.</b> Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D em associação em protocolo de pós-tratamento .....	29
<b>Figura 7.</b> Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) tratadas com vitamina D e sulforafano por 72 horas .....	37
<b>Figura 8.</b> Resultados dos ensaios de vermelho neutro em células DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) tratadas com vitamina D e sulforafano por 72 horas .....	38
<b>Figura 9.</b> Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A) e PC-3 (B) tratadas com sulforafano associado à vitamina D por 72 horas em protocolo de tratamento simultâneo .....	39
<b>Figura 10.</b> Resultados dos ensaios de MTT em DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) tratadas com sulforafano associado à vitamina D por 96 horas em protocolo de pré e pós tratamento .....	40
<b>Figura 11.</b> Resultados dos ensaios de MTT em células HaCaT tratadas com sulforafano e vitamina D isolados (A) ou associados (B) por 72 horas em protocolo de tratamento simultâneo .....	41
<b>Figura 12.</b> Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células DU145 após 72 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D .....	42
<b>Figura 13.</b> Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células PC-3 após 72 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D .....	42
<b>Figura 14.</b> Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células DU145 após 72 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D .....	43
<b>Figura 15.</b> Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células PC-3 após 72 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D .....	44
<b>Figura 16.</b> Caracterização do perfil de morte de células DU145 após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo .....	45
<b>Figura 17.</b> Caracterização do perfil de morte de células PC-3 após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo .....	46

<b>Figura 18.</b> Análise da proliferação de células DU145 e PC-3 após tratamento de 72 horas com sulforafano e/ou vitamina D por ensaio clonogênico .....	47
<b>Figura 19.</b> Análise de migração de células DU145 e PC-3 após tratamento de 48 horas com sulforafano e/ou vitamina D por ensaio de <i>wound healing</i> .....	48
<b>Figura 20.</b> Análise da distribuição de células DU145 entre as fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo .....	49
<b>Figura 21.</b> Análise da distribuição de células PC-3 entre as fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo .....	50
<b>Figura 22.</b> Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A) e PC-3 (B) tratadas com vitamina D e sulforafano por 24 horas .....	51
<b>Figura 23.</b> Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A) e PC-3 (B) tratadas com sulforafano associado à vitamina D por 24 horas em protocolo de tratamento simultâneo .....	52
<b>Figura 24.</b> Análise da produção de espécies reativas em células DU145 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano e vitamina D utilizando o marcador CM-H <sub>2</sub> DCFDA .....	53
<b>Figura 25.</b> Análise da produção de espécies reativas em células PC-3 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano e vitamina D utilizando o marcador CM-H <sub>2</sub> DCFDA .....	54
<b>Figura 26.</b> Análise da produção de espécies reativas em células DU145 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano associado à vitamina D utilizando o marcador CM-H <sub>2</sub> DCFDA .....	55
<b>Figura 27.</b> Análise da produção de espécies reativas em células PC-3 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano associado à vitamina D utilizando o marcador CM-H <sub>2</sub> DCFDA .....	56
<b>Figura 28.</b> Resultados da indução de autofagia em células DU145 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D .....	57
<b>Figura 29.</b> Resultados da indução de autofagia em células PC-3 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D .....	58
<b>Figura 30.</b> Resultados da indução de autofagia em células DU145 após 24 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D .....	59
<b>Figura 31.</b> Resultados da indução de autofagia em células PC-3 após 24 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D .....	60
<b>Figura 32.</b> Resultados do dano no DNA por ensaio cometa em células DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) após tratamento de 24 horas com sulforafano e/ou vitamina D ...	61
<b>Figura 33.</b> Resultado da análise de predição de proteínas alteradas por sulforafano e calcitriol utilizando o ChemDIS .....	62
<b>Figura 34.</b> Resultado da análise de expressão gênica de células DU145 após tratamento com sulforafano e vitamina D por RT-qPCR. ....	63
<b>Figura 35.</b> Resultado da análise de expressão gênica de células PC-3 após tratamento com sulforafano e vitamina D por RT-qPCR. ....	64

<b>Figura 36.</b> Resultado da análise de expressão de proteínas de células DU145 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D por western blot.....	65
<b>Figura 37.</b> Resultado da análise de expressão de proteínas de células PC-3 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D por western blot.....	66
<b>Figura 38.</b> Rede de interações preditas entre sulforafano, vitamina D, genes e proteínas analisadas no presente estudo utilizando a base de dados STITCH. ....	67

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>14</b>
1.1. Câncer de próstata	14
1.2. Substâncias bioativas da dieta no tratamento do câncer	15
1.3. Sulforafano	18
1.4. Vitamina D	21
<b>2. Objetivos</b>	<b>25</b>
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>26</b>
3.1. Agentes químicos e reagentes	26
3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo	26
3.3. Seleção das concentrações de sulforafano e vitamina D	27
3.4. Ensaio de viabilidade celular	27
3.5. Tratamentos das culturas celulares com sulforafano e vitamina D isolados	28
3.6. Tratamentos das culturas celulares com sulforafano e vitamina D associados	28
3.7. Ensaio por LIVE/DEAD	30
3.8. Estresse oxidativo	30
3.9. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo	31
3.10. Ensaio clonogênico	31
3.11. Ensaio de <i>wound healing</i>	31
3.12. Ciclo celular por citometria de fluxo	32
3.13. Ensaio de autofagia	32
3.14. Ensaio cometa	33
3.15. Extração de RNA e RT-qPCR	34
3.16. Extração de proteínas e western blot	34
3.17. Predição de alvos e de interações	35
3.18. Análises estatísticas	36
<b>4. Resultados</b>	<b>36</b>
4.1. Avaliação da viabilidade celular com sulforafano e vitamina D isolados	36
4.2. Avaliação da viabilidade celular com sulforafano e vitamina D associados	38
4.3. Avaliação da viabilidade de células HaCaT com sulforafano e/ou vitamina D	40
4.4. Investigação da indução de morte celular utilizando o kit Live/Dead	41

4.5. Investigação da indução de apoptose por citometria de fluxo.....	44
4.6. Avaliação da proliferação celular por meio do ensaio clonogênico .....	46
4.7. Análise da capacidade de migração ( <i>wound healing</i> ).....	47
4.8. Investigação do efeito de sulforafano e/ou vitamina D sobre o ciclo celular ...	48
4.9. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por 24 horas .....	50
4.10. Avaliação do estresse oxidativo por meio do marcador CM-H <sub>2</sub> DCFDA .....	52
4.11. Investigação da indução de autofagia .....	56
4.12. Avaliar o dano no DNA por ensaio cometa .....	60
4.13. Predição de proteínas alteradas por sulforafano e calcitriol.....	61
4.14. Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	62
4.15. Análise da expressão de proteínas por western blot.....	64
4.16. Análise da rede de interação entre os compostos e genes/proteínas estudadas .....	66
<b>5. Discussão .....</b>	<b>68</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>81</b>
<b>Referências .....</b>	<b>83</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer de próstata

O câncer de próstata é o segundo com maior incidência entre os homens, ficando atrás apenas dos casos de câncer de pele não melanoma. Possui estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 de 65.840 novos casos, representando 29,2% de todos os casos de câncer no Brasil (INCA, 2019). A taxa deste câncer é ainda maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento, devido a ampla implementação do teste do PSA (antígeno prostático específico), permitindo a detecção precoce da doença nesses países (SUNG *et al.*, 2021). Nos Estados Unidos foram estimados 268.490 casos novos, que poderão resultar em mais de 34 mil mortes no país (SIEGEL *et al.*, 2022). Em todo o mundo foram estimados 1.414.259 novos casos de câncer de próstata e 375.304 mortes decorrentes da doença em 2020 (SUNG *et al.*, 2021). Outro dado preocupante é o aumento da incidência de câncer de próstata em pacientes entre as idades de 15 e 40 anos, com crescimento constante de 2% ao ano desde 1990 (BLEYER; SPREAFICO; BARR, 2020).

Os cuidados com os pacientes com câncer de próstata são um grande desafio global de assistência à saúde, agravado pelo envelhecimento da população e pelo aumento da frequência do diagnóstico. As prioridades consideradas durante a terapia são: minimizar o excesso de tratamento, ou seja, o tratamento desnecessário em pacientes com a doença, mas com ausência de dor, e melhorar os resultados para pacientes com doença agressiva (SARTOR; DE BONO, 2018).

Em pacientes com câncer localizado na próstata e em tecidos adjacentes, a cirurgia ou a radioterapia podem ser utilizadas de forma eficaz na maioria dos casos, entretanto, em casos de câncer em estágio avançado ou metastático, a terapia padrão tem sido a privação de andrógenos. Infelizmente, esta opção perde a eficácia ao longo do tempo, levando à resistência das células tumorais a esta terapia e gerando proliferação celular mesmo com a falta de andrógenos, progredindo em câncer de próstata resistente à castração (CRPC) (KALLIFATIDIS; HOY; LOKESHWAR, 2016).

Os taxanos como docetaxel e cabazitaxel, são os quimioterápicos mais utilizados atualmente para o tratamento do CRPC. No entanto, quase todos os pacientes com CRPC eventualmente desenvolvem resistência aos taxanos, e as opções terapêuticas para esses pacientes continuam limitadas (PORRAS; FONT; AYLES, 2021). Apesar do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, a sobrevivência de pacientes submetidos a estes tratamentos só tem sido estendida por

4 a 6 meses em relação aos pacientes tratados com placebo (KALLIFATIDIS; HOY; LOKESHWAR, 2016).

As principais desvantagens da quimioterapia são a recorrência do câncer, resistência aos medicamentos e efeitos tóxicos em tecidos não direcionados que podem restringir o uso de medicamentos anticâncer e, assim, prejudicar a qualidade de vida do paciente. Para superar os problemas da terapia atual, tem se buscado por novos agentes anticâncer promissores com melhor eficácia e menos efeitos adversos (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

A quimioprevenção do câncer pode ser descrita como uso de compostos sintéticos e naturais para retardar ou suprimir a progressão do câncer (GEORGE; CHANDRAN; ABRAHAMSE, 2021). Esses compostos têm sido investigados quanto ao seu potencial contra o câncer de próstata. Embora alguns quimiopreventivos naturais possam apresentar efeitos tóxicos, muitos têm baixa toxicidade e alta tolerabilidade. Com isso, uma das estratégias para a quimioprevenção do câncer tem sido a utilização de substâncias de ocorrência natural que possuem atividades anticâncer e estão presentes em vegetais, frutas, ervas, produtos fermentados ou outra fonte alimentar. Estudos pré-clínicos sugerem que muitos produtos naturais e agentes dietéticos previnem ou retardam o desenvolvimento, progressão e/ou recorrência do câncer (CHHABRA *et al.*, 2018).

O câncer de próstata constitui um candidato ideal para intervenções quimiopreventivas, devido à sua alta incidência, variabilidade clínica, heterogeneidade molecular, período de latência longo, lesões pré-malignas identificáveis, ferramentas de detecção precoce e disponibilidade de um biomarcador, o PSA (antígeno prostático específico) (MOKBEL; WAZIR; MOKBEL, 2019).

## **1.2. Substâncias bioativas da dieta no tratamento do câncer**

Estudos epidemiológicos têm demonstrado o impacto do hábito alimentar na promoção da saúde e nas doenças (CALVANI; PASHA; FAVRE, 2020). Nesse sentido, a quimioprevenção do câncer utilizando nutracêuticos como uma opção viável e não tóxica vem sendo amplamente estudada (REED; RAINA; AGARWAL, 2018). Os nutracêuticos são constituintes ou derivados de alimentos, como vitaminas, aminoácidos e minerais que conferem benefícios à saúde além do seu valor nutricional. Podem ser divididos em nutrientes (carboidratos, proteínas, gorduras) e



não nutrientes (prebióticos, probióticos, fitoquímicos, reguladores enzimáticos) (CALVANI; PASHA; FAVRE, 2020).

Apesar do crescente interesse público nos nutracêuticos, a falta de uma definição universalmente aceita e de estruturas regulatórias tem sido um desafio nessa área. A regulamentação dos nutracêuticos é muito variada pelo mundo e em alguns países eles não são regulamentados. Isso se deve em grande parte às diferenças na legislação de vendas, marketing, segurança e eficácia desses produtos em diferentes regiões do mundo, além da influência cultural no seu uso (CHOPRA *et al.*, 2022).

No Brasil, a ANVISA não reconhece o termo nutracêutico, mas regulamenta as substâncias bioativas como nutrientes ou não nutrientes consumidos normalmente como componentes de um alimento, e que possuem ação metabólica ou fisiológica específica no organismo humano. Os nutracêuticos são classificados pela ANVISA como suplementos alimentares para pessoas saudáveis (ANVISA, 2018).

Ainda que não regulamentados, muitos estudos têm demonstrado a eficácia clínica e o potencial terapêutico dos nutracêuticos como agentes anticâncer. Em estudo epidemiológico com 100 pacientes, a concentração média de genisteína plasmática dos pacientes sem a doença foi significativamente maior do que em pacientes com câncer de próstata, sugerindo uma correlação entre as concentrações plasmáticas de genisteína e o risco de câncer (WU *et al.*, 2015). Em um ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo utilizando suplementação alimentar contendo, chá verde, romã, brócolis e cúrcuma em pacientes com câncer de próstata, o aumento médio no PSA do grupo com suplemento foi de 14,7%, enquanto as concentrações do grupo placebo subiram 78,5% (THOMAS *et al.*, 2014). Em pacientes com câncer de próstata não-metastático, foi observada diminuição das concentrações de PSA após intervenções nutricionais de três semanas com licopeno sozinho ou associado com selênio e ômega-3 (PAUR *et al.*, 2017).

As espécies reativas de oxigênio desempenham papéis importantes na homeostase dos tecidos, desde a regulação da sinalização e diferenciação até a promoção de danos celulares e morte. Por essa razão, seus níveis são rigidamente regulados pelas defesas antioxidantes celulares, prevenindo contra danos às células (HARRIS; DENICOLA, 2020).

Muitas substâncias naturais possuem capacidade antioxidante, no entanto, algumas delas provocam um aumento na formação de radicais livres, resultando em

morte de células tumorais. A genisteína, principal isoflavona encontrada na soja; o fenetil isotiocianato (PEITC) derivado de glucosinolatos presentes em vegetais da família Cruciferae, incluindo brócolis; o resveratrol extraído das uvas; a epigallocatequina-3-galato (EGCG) produzida a partir do chá verde; e a curcumina, derivada da *Curcuma longa*, são alguns exemplos dessas substâncias (CHIKARA *et al.*, 2018).

Os compostos naturais ainda podem apresentar efeitos anticâncer por meio da regulação de muitas vias de sinalização celular importantes, incluindo Akt, NF-κB e de receptores de andrógenos (AR), que são críticas para o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Portanto, as substâncias ativas da dieta com estas características poderiam ser utilizadas como agentes quimiopreventivos para a prevenção e tratamento do câncer (LI *et al.*, 2014).

O processo da carcinogênese é mediado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Este processo pode estar relacionado com alterações na transcrição, modificação da cromatina, expressão de oncogenes, erros no reparo do DNA e falhas na divisão celular (MATEO *et al.*, 2017). Alterações epigenéticas são comuns no câncer de próstata e, juntamente com as alterações genéticas, elas possuem um papel crítico na iniciação e progressão da doença. A epigenética consiste em diferentes mecanismos moleculares que alteram a função e regulação de genes durante o desenvolvimento e diferenciação sem afetar a sequência de DNA. Existe uma série de processos epigenéticos que podem atuar independentemente ou em conjunto para modular a regulação de genes e formar o epigenoma, como a metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas, incorporação de variantes de histonas e expressão de RNAs não-codificantes (VALDÉS-MORA; CLARK, 2015).

As histonas comumente sofrem modificações covalentes, como metilação, acetilação, ubiquitinação e sumoilação, que alteram a estrutura ou a função da cromatina. No entanto, a metilação e a acetilação de histonas são as modificações mais estudadas. A acetilação (ou desacetilação) envolve a adição (ou remoção) de um grupo acetil nos resíduos de lisina de histonas, estando geralmente ligada à ativação (ou inativação) de genes. Já a adição (ou remoção) de grupos metil à aminoácidos de proteínas histonas resulta no silenciamento ou ativação transcricional, dependendo da lisina a ser modificada, sendo conhecido este processo como metilação (ou desmetilação) de histonas (KGATLE *et al.*, 2016). Além disso, as terapias futuras, principalmente para os tumores sólidos mais comuns como os da

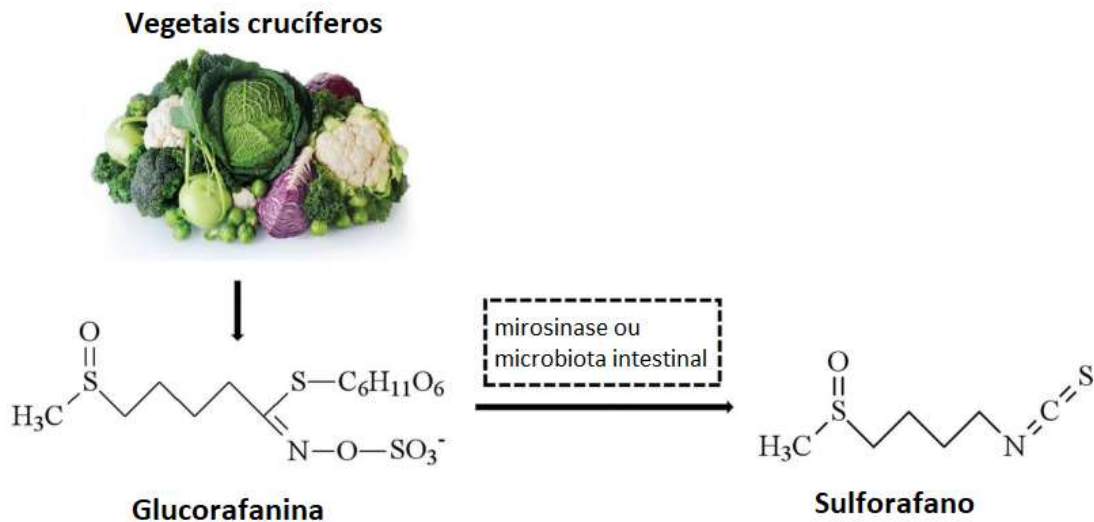
próstata, poderão ser estabelecidas a partir da associação de diferentes agentes da terapia epigenética. Entre as possíveis associações, as mais exploradas são as que inibem simultaneamente a metilação do DNA e a desacetilação de histonas, propondo a reativação de genes silenciados em células de câncer, como genes supressores tumorais e de reparo de DNA (JONES; ISSA; BAYLIN, 2016).

Sendo assim, outra alternativa estudada para a terapia do câncer de próstata tem sido a utilização de inibidores epigenéticos que atingem DNA metiltransferases (DNMT) e histonas desacetilases (HDAC), pois diversas mudanças nos padrões de metilação do DNA podem ser detectadas em pacientes antes mesmo que a doença se torne invasiva. Desta forma, compostos da dieta como, vitamina E, vegetais crucíferos, soja, peixes e vitamina D, possuem potencial anticâncer, pois podem induzir modificações epigenéticas que modulam a expressão de genes (LABBÉ *et al.*, 2015), e atingir diferentes vias de sinalização que estão desreguladas neste tipo de câncer (KALLIFATIDIS; HOY; LOKESHWAR, 2016), constituindo uma opção como terapia alternativa contra o câncer devido à sua segurança e eficácia. E embora muitos nutrientes tragam benefícios individualmente, existe a possibilidade de um efeito ainda maior quando utilizados em conjunto (SINGH; SHUKLA, 2015).

### **1.3. Sulforafano**

A família Brassica de vegetais crucíferos constitui uma rica fonte de glucosinolatos. A glucorafanina é o glucosinolato prevalente no brócolis e o precursor do sulforafano. Quando as células do brócolis são danificadas por ação mecânica como a mastigação, a glucorafanina é liberada e entra em contato com a mirosinase (enzima glicosidase encontrada nesses vegetais), sendo convertida em sulforafano por hidrólise. A microbiota intestinal também desempenha um papel semelhante à mirosinase, degradando a glucorafanina em sulforafano (Figura 1) (WEI *et al.*, 2022).

**Figura 1.** Esquema da conversão da glucorafanina em sulforafano por ação da enzima mirosinase ou da microbiota intestinal.



**Fonte:** Modificado de Wei *et al.* (2022).

O sulforafano tem se mostrado um potencial agente quimiopreventivo, e é considerado uma substância pleiotrópica capaz de atuar sobre diversos marcadores do câncer, como regulação do crescimento celular, morte por apoptose, angiogênese e metástase. Embora não estejam completamente compreendidos, muitos de seus mecanismos da atividade anticâncer, apresentados nas etapas de iniciação, promoção e progressão do câncer, estão relacionados com a resposta adaptativa ao estresse, modulação de enzimas de fase I e II, crescimento proativo, sobrevivência, sinalização pró-inflamatória e modulação epigenética (ABBAOUI *et al.*, 2018; RUSSO *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado que o sulforafano é um ativador significativo do fator de transcrição Nrf2 (fator nuclear eritróide tipo 2). O Nrf2 é o principal regulador de cerca de 500 transcritos que controlam a homeostase celular mediante efeitos distintos e interconectados (RUSSO *et al.*, 2018). Em estudos pré-clínicos sulforafano: i) promoveu o processo de detoxificação de carcinógenos transportados pelo ar por ativação da via do Nrf2 e de enzimas de fase II; ii) demonstrou efeitos anti-inflamatórios contra a inflamação pulmonar aguda (ZHANG *et al.*, 2018), iii) apresentou indução de apoptose, inibição do crescimento e parada do ciclo celular em linhagens celulares de câncer de bexiga (ABBAOUI *et al.*, 2018), iv) protegeu células HUVEC (célula endotelial da veia umbilical humana) de danos induzidos por

angiotensina II, diminuindo o estresse oxidativo e a lesão mitocondrial (ZHANG; XU; JIANG, 2020).

A modulação epigenética causada pelo sulforafano parece estar relacionada com a regulação da atividade de histonas desacetilases (HDAC) e DNA metiltransferases (DNMT), produzindo efeitos citotóxicos específicos às células tumorais (KAUFMAN-SZYMCZYK *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2013). O tratamento com sulforafano foi capaz de reduzir a atividade de histonas desacetilases em células de câncer de próstata *in vitro* (CLARKE *et al.*, 2011; HO; CLARKE; DASHWOOD, 2009; MYZAK *et al.*, 2006) e *in vivo* (MYZAK *et al.*, 2007), com consequente aumento da acetilação global de histonas, parada do ciclo celular e apoptose. Em células tumorais de próstata (TRAMP C1), sulforafano inibiu a expressão de proteínas DNMT1 e DNMT3, HDAC 1, 4, 5 e 7, aumentando os níveis de histonas-3 acetiladas (ZHANG *et al.*, 2013). Hsu *et al.* (2011) observaram o aumento da expressão de ciclina D2, responsável por regular o ciclo celular, associado à diminuição da metilação de seu promotor e diminuição de proteínas DNMTs em células tumorais de próstata, LNCaP.

No câncer de próstata, os receptores de andrógenos (AR) possuem função na síntese de PSA, na regulação do metabolismo lipídico e na promoção do crescimento celular (FUJITA; NONOMURA, 2018). A histona desacetilase-6 (HDAC6) regula a hipersensibilidade dos AR em células tumorais de próstata, e sua inibição desestabiliza os AR (GIBBS *et al.*, 2009). Em células tumorais de próstata (LNCaP e PC-3), sulforafano diminuiu os níveis de HDAC6 resultando em indução de autofagia e morte celular por apoptose (CLARKE *et al.*, 2011).

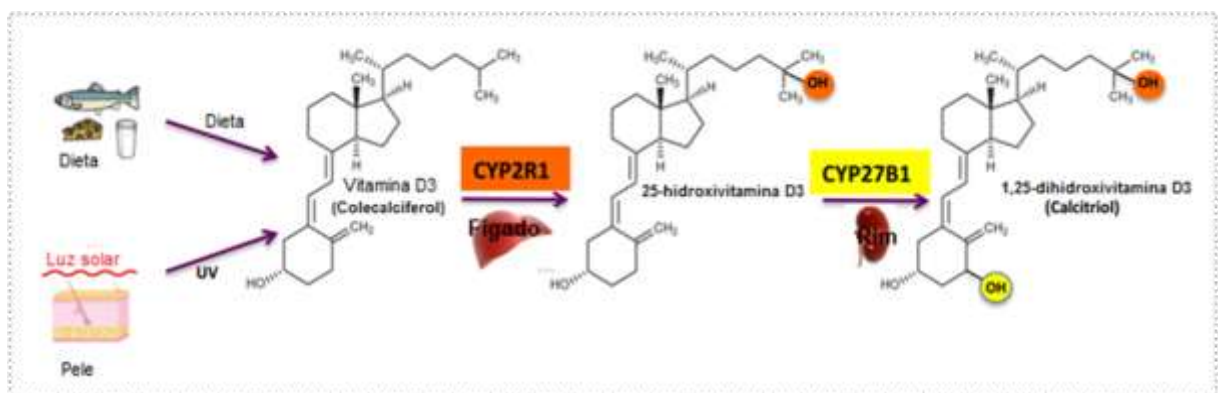
Em uma das revisões epidemiológicas mais abrangentes, foram avaliadas as evidências do efeito do consumo de vegetais crucíferos na incidência do câncer de próstata, não encontrando resultados conclusivos (KRISTAL; LAMPE, 2002). Porém, um risco menor de câncer de próstata foi observado com o aumento da ingestão de vegetais, como brócolis, em uma coorte de homens previamente expostos ao amianto na Austrália Ocidental. O tratamento de 20 pacientes com câncer de próstata com extratos ricos em sulforafano (200  $\mu\text{mol}$ ) por 20 semanas não resultou em um declínio significativo nos níveis de PSA. Em outro estudo, homens com recorrência bioquímica após prostatectomia radical mostraram resultados promissores após a ingestão diária por 6 meses de sulforafano livre estabilizado (340  $\mu\text{mol}$ ) em um suplemento dietético comercial (PALLIYAGURU *et al.*, 2018).

Embora as propriedades quimiopreventivas do sulforafano tenham sido amplamente investigadas e extensivamente relatadas, a dificuldade na administração de uma dose que pode conferir significância terapêutica limita seu potencial para uso clínico. Além disso, o consumo estimado necessário para observar os benefícios no combate ao desenvolvimento e progressão do câncer tem se mostrado irreal em uma dieta normal. Portanto, o uso de uma associação de compostos anticâncer que afetem diferentes vias funcionais pode apresentar atividade aditiva ou sinérgica, aumentando sua relevância na quimioprevenção do câncer (KAMAL *et al.*, 2020; TORTORELLA *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2020).

#### 1.4. Vitamina D

A vitamina D é geralmente encontrada em duas formas, vitamina D2 e vitamina D3. A vitamina D2 (ergocalciferol) é obtida de plantas, cogumelos e leveduras, enquanto a vitamina D3 (colecalfiferol), é sintetizada na pele após exposição à radiação ultravioleta B, está disponível em alimentos de origem animal e apresenta maior eficácia para uso na suplementação (BALACHANDAR *et al.*, 2021). A vitamina D3 é convertida em 25-hidroxivitamina D3 pelo fígado, para depois ser hidroxilada à calcitriol (forma ativa) por enzimas citocromo P450 (CYP27B1), principalmente nos rins (Figura 2). Os níveis de calcitriol são regulados adicionalmente pela enzima CYP24A1, que inicia a inativação do calcitriol por intermédio da 24-hidroxilase (FELDMAN *et al.*, 2014; TRUMP; ARAGON-CHING, 2018).

**Figura 2.** Esquema representando a síntese de calcitriol a partir da vitamina D3.



Fonte: Modificado de Feldman *et al.* (2014).

A vitamina D tem função na mineralização de ossos, uma vez que participa da regulação da homeostase de cálcio e fosfato. E ainda, parece regular múltiplas vias de sinalização envolvidas na proliferação, apoptose, diferenciação, inflamação, invasão, angiogênese e metástase, possuindo potencial para afetar o crescimento e desenvolvimento do câncer (FELDMAN *et al.*, 2014).

Estudos prévios sugerem que o baixo nível de vitamina D justifica as taxas elevadas de alguns tipos de câncer em populações que vivem em latitudes mais altas, ademais, outros estudos demonstraram que a vitamina D possui muitas ações anticâncer, incluindo anti-inflamação, anti-angiogênese e pró-apoptose (MONDUL *et al.*, 2017).

Dentre os mecanismos de ação já descritos para a vitamina D estão: parada do ciclo celular com aumento do número de células em G0/G1 e modulação de inibidores de quinase dependente de ciclina (CDK), como p21 e p27; indução de apoptose com clivagem de PARP (Poli (ADP-ribose) polimerase), ligação à anexina e aumento da relação BAX/BCL-2; supressão de moléculas sinalizadoras pró-proliferativas, como P-MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno fosforilada), ERK (quinase regulada por sinal extracelular), AKT fosforilada (P-AKT), AKT e MAPK/ERK quinase (MEKK); e modulação da expressão de fatores de crescimento associados ao tumor (TRUMP; ARAGON-CHING, 2018).

Os principais efeitos epigenéticos da vitamina D estão ligados à modificação de histonas, especialmente acetilação. Contudo, muitos estudos têm sugerido que a vitamina D pode afetar a metilação do DNA. Em células tumorais de próstata (LNCaP), o tratamento com vitamina D reduziu a expressão e atividade de DNA metiltransferases DNMT1 e DNMT3B, diminuindo a metilação do DNA (LAI *et al.*, 2020). A vitamina D pode inibir a expressão de diversas histonas desmetilases e induzir a expressão de outras. Em células tumorais de mama (MDA-MB-453), o tratamento com vitamina D regulou a expressão do gene *p21*, tanto por acetilação, como por metilação de histonas (FETAHU; HÖBAUS; KÁLLAY, 2014). Em linhagens celulares de câncer de rim (786-O e ACHN), a vitamina D inibiu a proliferação, induziu apoptose e senescência. Tais efeitos foram observados devido a ativação da histona desmetilase JMJD3 pela vitamina D que aumentou a expressão de p16INK4A (supressor tumoral) e a senescência celular (SHEN *et al.*, 2017).

A ação primária da vitamina D é a ativação ou supressão da expressão de genes por meio de sua ligação ao receptor de vitamina D (VDR). O VDR é encontrado

principalmente no núcleo e a ligação à vitamina D promove sua associação ao receptor retinóide X (RXR), o dímero VDR/RXR interage com histonas acetiltransferases, induzindo ativação transcricional. A ativação do VDR pela vitamina D leva à mudança na expressão de mais de 1000 genes em vários tecidos humanos. Além disso, altos níveis de expressão de VDR estão associados com a redução do risco de câncer de próstata (FLEET *et al.*, 2012; ZMIJEWSKI; CARLBERG, 2020).

A expressão de VDR foi relatada em três linhagens celulares de carcinoma da próstata humano, LNCaP, PC-3 e DU145, bem como na cultura primária de células estromais e epiteliais derivadas de tecidos normais e malignos da próstata. Muitos estudos pré-clínicos têm demonstrado que a exposição às altas concentrações de vitamina D pode resultar na inibição do crescimento de células de câncer de próstata *in vitro* e no retardo ou desaceleração do crescimento tumoral em modelos animais. Esses estudos revelaram que a concentração de calcitriol a 10 nM (4,2 ng/mL) está associada à atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo* (BEN-ELTRIKI; DEB; GUNS, 2016).

Apesar de alguns autores apontarem que existem poucas evidências sobre o potencial benefício da vitamina D na prevenção do câncer, incluindo mama e próstata, com observação de aumento do risco para um limitado grupo de pacientes com câncer de próstata submetidos à altas doses de vitamina D (entre 1.600 e 3.000 UI diárias) (ALBANES, 2015; GAO *et al.*, 2018), outros trabalhos têm apresentado que a vitamina D sérica é menor em pacientes com câncer de próstata, e que sua deficiência grave está associada à estágios mais avançados da doença (MURPHY *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2017).

Embora os resultados descritos na literatura sejam conflitantes, sabe-se que agentes únicos geralmente têm efeito limitado na terapia clínica do câncer. Desta forma, as terapias associadas à vitamina D estão sendo exploradas para aumentar sua eficácia antitumoral (TRUMP; ARAGON-CHING, 2018). A administração de vitamina D juntamente com sulforafano diminuiu a incidência e o tamanho dos tumores encontrados no intestino de camundongos, diminuindo a atividade de histona desacetilase e aumentando a indução de autofagia (LI *et al.*, 2019). Sulforafano e vitamina D separados têm apresentado efeitos anticâncer promissores, no entanto, ambos os compostos demonstram baixa biodisponibilidade em ensaios clínicos, destacando a necessidade de novas estratégias que permitam o aumento de seus efeitos em doses clinicamente relevantes. Portanto, a hipótese do presente estudo é que a associação da vitamina D ao sulforafano poderá atuar de maneira sinérgica na



indução da citotoxicidade e genotoxicidade, inibindo a migração de células tumorais de próstata, modulando a expressão de genes e proteínas envolvidas nesses processos.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da associação entre sulforafano e vitamina D sobre a viabilidade celular, integridade do DNA, migração celular e modulação da expressão de genes e proteínas em linhagens de células humanas tumorais de próstata (DU145 e PC-3).

### **2.2. Objetivos específicos**

Analisar os efeitos da associação entre sulforafano e vitamina D em células humanas por meio dos seguintes parâmetros:

- viabilidade celular (MTT e vermelho neutro);
- análise de morte celular utilizando o kit LIVE/DEAD;
- mecanismo de morte celular (ensaio de apoptose por citometria de fluxo);
- proliferação celular (ensaio clonogênico);
- indução de autofagia (marcação com fluorocromos);
- modulação do ciclo celular (citometria de fluxo);
- genotoxicidade (ensaio cometa);
- atividade oxidante (estresse oxidativo – marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA);
- migração celular (*wound healing*);
- modulação da expressão de genes relacionados com a modificação da cromatina, proliferação, morte, ciclo e migração celular (RT-qPCR);
- modulação da expressão de proteínas relacionadas com a morte celular e resposta ao estresse oxidativo (*western blot*).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Agentes químicos e reagentes

Sulforafano (CAS 4478-93-7), calcitriol (vitamina D na forma ativa, CAS 32222-06-3), azul de tripan (CAS 72-57-1), dimetilsulfóxido (DMSO, CAS 67-68-5), Triton X-100 (CAS 9036-19-5), metanossulfonato de metila (MMS, CAS 66-27-3), peróxido de hidrogênio (CAS 7722-84-1), vermelho neutro (CAS 553-24-2), metanol (CAS 67-56-1) e etanol (CAS 64-17-5) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, CAS 298-93-1) foi adquirido da Invitrogen (Waltham, MA, EUA). O meio de cultura RPMI 1640, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), mix de antibióticos (penicilina/estreptomicina/neomicina), soro bovino fetal e TrypLE™ Express foram adquiridos da Gibco (Grand Island, NY, EUA). O corante Giemsa foi obtido da Merck (Rockville, MD, EUA). O cloridrato de doxorubicina 50 mg/10 mL foi obtido da Eurofarma (São Paulo, SP, Brasil) e a cisplatina 10 mg/10 mL foi obtida da Libbs (São Paulo, SP, Brasil).

#### 3.2. Linhagens celulares e condições de cultivo

As linhagens utilizadas foram: PC-3 (adenocarcinoma de próstata metastático em osso – CRL-1435, p53 *null*) e DU145 (células de adenocarcinoma de próstata metastático em cérebro – HTB-81, p53 mutante) provenientes da *American Type Culture Collection*, ATCC. HaCaT (queratinócitos de pele normal transformados espontaneamente – BCRJ-0341) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para a linhagem PC-3 foi empregado meio RPMI 1640, e para DU145 e HaCaT foi utilizado meio DMEM. Os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de mix de antibióticos. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa. Em todos os ensaios foram incluídos os grupos controle negativo (PBS – tampão fosfato salino), solvente do sulforafano (DMSO 0,2%), solvente da vitamina D (etanol - EtOH 0,2%) e positivo (cisplatina 10 µM, MMS 150 µM, doxorubicina 1µM ou peróxido de hidrogênio 1mM). Os procedimentos de cultura de células foram realizados em capelas de fluxo laminar da Classe II e tipo 1A do modelo Bioprotector VSFL-09 (VecoFlow Ltda – Campinas, SP, Brasil), de acordo com os procedimentos para manutenção de linhagens celulares propostos por Bal-Price e Coecke (2011). Para os experimentos foram usadas células entre a terceira e oitava passagem após o descongelamento.

### 3.3. Seleção das concentrações de sulforafano e vitamina D

As concentrações utilizadas para os ensaios de viabilidade celular foram selecionadas a partir de dados descritos na literatura e considerando a concentração plasmática máxima encontrada (Tabelas 1 e 2). Desta maneira, as concentrações escolhidas para o sulforafano foram 1, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ , devido à concentração plasmática de 7,3  $\mu\text{M}$  de sulforafano observada após a ingestão de brócolis com alto teor de glucosinolatos (GASPER *et al.*, 2005). As concentrações de vitamina D selecionadas foram 2, 4, 8, 16 e 32 nM, de acordo com a concentração plasmática de aproximadamente 26,8 nM de calcitriol em pacientes tratados com 125  $\mu\text{g}$ /semana via intravenosa (MUINDI *et al.*, 2009).

**Tabela 1.** Concentração plasmática e toxicidade de calcitriol em humanos administrado via oral ou intravenosa

Dose de calcitriol	Concentração plasmática	Toxicidade	Referências
0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2,5 ng/mL	-	Beer <i>et al.</i> (2001)
165 $\mu\text{g}$ - dose única	6,25 ng/mL	-	Beer <i>et al.</i> (2005)
45 $\mu\text{g}/\text{semana}$	-	DLT = 60 $\mu\text{g}$ ; MTD = 45 $\mu\text{g}$	Beer <i>et al.</i> (2007)
10 $\mu\text{g}$ – DA	321 pg/mL	MTD = 8 $\mu\text{g}$	Smith <i>et al.</i> (1999)
125 $\mu\text{g}/\text{semana}$	11,17 $\pm$ 2,62 ng/mL	MTD = 125 $\mu\text{g}/\text{semana}$	Muindi <i>et al.</i> (2009)

DA: dias alternados; MTD: Máxima dose tolerada; DLT: toxicidade dose-limitante.

**Tabela 2.** Concentração plasmática de sulforafano em humanos após ingestão

Dose de sulforafano	Concentração plasmática	Referências
200 $\mu\text{mol}$ diariamente	36,7 ng/mL	Alumkal <i>et al.</i> (2015)
0,32 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ diariamente	10 ng/mL	Hanlon <i>et al.</i> (2009)
200 $\mu\text{mol}$ dose única	2 $\mu\text{M}$	Atwell <i>et al.</i> (2015)
345,8 $\pm$ 38,65 $\mu\text{M}$	7,3 $\pm$ 2,92 $\mu\text{M}$	Gasper <i>et al.</i> (2005)

### 3.4. Ensaios de viabilidade celular

Para os ensaios de viabilidade (MTT e vermelho neutro) as células foram tratadas com diferentes concentrações de sulforafano e/ou vitamina D. As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços a um volume de 100  $\mu\text{L}$ , com densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço e incubadas por 24 h, em seguida foram realizados os tratamentos descritos abaixo.

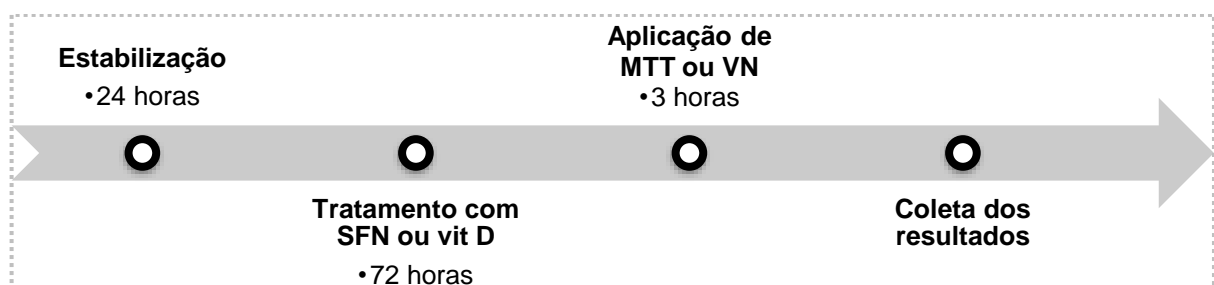
O ensaio do MTT foi desenvolvido como proposto por Mosmann (1983). Decorrido o período de tratamento, as células foram incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) por 3 horas a 37°C. Após a retirada da solução de MTT foram adicionados 200 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Biotek ELX800, Winooski, VT, EUA) a 570 nm.

O ensaio do vermelho neutro foi realizado segundo Repetto, Peso e Zurita (2008). Após o período de tratamento a solução de vermelho neutro (40 µg/mL) foi adicionada e as culturas foram incubadas por 3 horas a 37°C. Para leitura em espectrofotômetro (iMark Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 540 nm foi adicionado 0,2 mL da solução de ácido acético em etanol (1% ácido acético em etanol 50%). Os resultados dos ensaios de MTT e vermelho neutro estão apresentados como percentual de células viáveis em relação ao controle negativo (considerado como 100% de viabilidade).

### 3.5. Tratamentos das culturas celulares com sulforafano e vitamina D isolados

Para avaliação dos efeitos sobre a viabilidade celular de sulforafano e vitamina D utilizando os ensaios de MTT e vermelho neutro, as células DU145 e PC-3 foram tratadas com sulforafano (1, 2, 4, 8 e 16 µM) ou vitamina D (2, 4, 8, 16 e 32 nM) por 72 horas como ilustrado na Figura 3.

**Figura 3.** Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D



SFN = sulforafano; Vit D = vitamina D; VN = vermelho neutro.

### 3.6. Tratamentos das culturas celulares com sulforafano e vitamina D associados

A partir dos resultados de viabilidade celular das substâncias isoladas, concentrações de ambas foram selecionadas para avaliação dos possíveis efeitos da associação de sulforafano com a vitamina D. Para isto foram realizados os protocolos

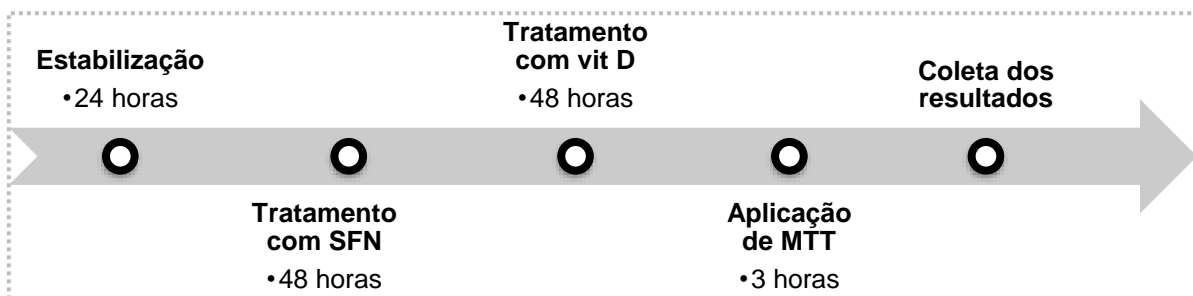
de tratamento simultâneo (Figura 4), pré-tratamento (Figura 5) e pós-tratamento (Figura 6) ilustrados abaixo.

**Figura 4.** Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D em associação em protocolo de tratamento simultâneo



SFN = sulforafano; Vit D = vitamina D.

**Figura 5.** Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D em associação em protocolo de pré-tratamento



SFN = sulforafano; Vit D = vitamina D.

**Figura 6.** Esquema de tratamento das linhagens celulares para avaliação da citotoxicidade de sulforafano e vitamina D em associação em protocolo de pós-tratamento



SFN = sulforafano; Vit D = vitamina D.

A partir dos resultados de viabilidade celular das substâncias isoladas e em associação, foram selecionadas as menores concentrações de sulforafano (2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) e vitamina D (16 nM) que apresentaram diminuição da viabilidade para serem

investigadas nos próximos ensaios. A avaliação dos possíveis efeitos da associação de sulforafano com a vitamina D foi realizada utilizando-se somente o protocolo de tratamento simultâneo.

### **3.7. Ensaio por LIVE/DEAD**

A análise da citotoxicidade foi realizada utilizando-se o kit LIVE/DEAD™ (Thermo Scientific; Canoga Park, CA, EUA) para as linhagens DU145 e PC-3 tratadas com sulforafano e/ou vitamina D.

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

A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de placas Synergy 2 (BioTek®; Winooski, VT, EUA) com filtros de Excitação/Emissão de 485/530 e 530/645 para a calceína e EthD-1, respectivamente. Os valores de fluorescência do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular. As imagens foram capturadas utilizando o Microscópio de Fluorescência Leica DMI 6000B (Leica; Wetzlar, Hessen, Alemanha).

### **3.8. Estresse oxidativo**

Para avaliação da atividade oxidante foi utilizado o marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Life Technologies, Eugene, OR, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. As células DU145 e PC-3 ( $5 \times 10^3$ /poço) foram semeadas em placas pretas de 96 poços com fundo transparente, estabilizadas por 24 horas e tratadas com sulforafano e/ou vitamina D por 2, 3, 4 ou 24 horas. Os grupos controle negativo (PBS), controle de solvente (0,2% DMSO + 0,2% EtOH), e controle positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM - agente indutor de espécies reativas) também foram incluídos. Após a exposição das culturas ao marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado como controle positivo por 20 min. As leituras das fluorescências foram realizadas em espectrômetro de fluorescência Synergy 2 (BioTek; Winooski, Vermont, EUA) utilizando filtro de excitação e emissão de 450 e 520 nm, respectivamente. Os

valores de fluorescência do controle negativo foram considerados como 100% de espécies reativas.

### 3.9. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

O ensaio para análise de apoptose foi realizado utilizando o kit Annexin V-FITC/PI (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). As células foram semeadas em placas de cultura de 12 poços ( $5 \times 10^4$  por poço), estabilizadas por 24 horas e tratadas por 72 horas com sulforafano e/ou vitamina D. As amostras foram preparadas segundo o protocolo proposto pelo fabricante e submetidas ao citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Foram analisados 10.000 eventos no software BD FACSDiva 8.0.1 (Becton Dickinson) e os resultados estão apresentados como porcentagem de apoptose.

### 3.10. Ensaio clonogênico

Para avaliação da proliferação celular por ensaio clonogênico, foram semeadas  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de cultura de 24 poços. As células foram estabilizadas por 24 horas, tratadas com sulforafano e/ou vitamina D por 72 horas, tripsinizadas e semeadas novamente em placas de cultura de 6 poços (150 células por poço). Após 10 dias de incubação à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as colônias de células que se formaram foram fixadas em metanol:ácido acético:água (1:1:8 v/v) por 30 minutos e coradas com Giemsa:tampão fosfato (1:20 v/v) por 25 minutos. Os resultados estão expressos em fração de sobrevivência e foram calculados de acordo com Franken *et al.* (2006).

$$\text{Eficiência de plaqueamento (EP)} = \frac{\text{nº de colônias formadas}}{\text{nº de células semeadas}} \times 100\%$$

$$\text{Fração de sobrevivência} = \frac{\text{nº de colônias formadas após tratamento}}{\text{nº de células semeadas} \times \text{EP do controle}}$$

### 3.11. Ensaio de *wound healing*

O ensaio de migração celular foi realizado segundo protocolo de Rodriguez, Wu e Guan (2005). Foram semeadas  $1 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços. A estabilização foi realizada com 24 horas de meio completo, seguidas de mais 24 horas com meio mínimo. Após este período, uma ponteira foi utilizada para criar as feridas na monocamada de células. O tratamento com sulforafano e/ou vitamina D foi de 48



horas em meio mínimo. Nos tempos 0, 24 e 48h de tratamento foram realizadas as imagens das feridas com o microscópio invertido Primovert (Carl Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha) e câmera AxioCam MRm (Carl Zeiss). As imagens foram analisadas com auxílio do software Image J (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, EUA). Os resultados estão apresentados como porcentagem de fechamento de ferida, sendo o tempo de 0h considerado como 0% de fechamento.

### **3.12. Ciclo celular por citometria de fluxo**

A modulação do ciclo celular foi avaliada utilizando-se marcação do DNA das células com iodeto de propídio e análise por citometria de fluxo seguindo o método proposto por Pozarowski e Darzynkiewicz (2004). Foram semeadas  $5 \times 10^4$  células por poço em placas de 12 poços. Após a estabilização por 24 horas e tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por 72 horas, as amostras foram fixadas em etanol 70% e armazenadas em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ . No dia da análise as amostras foram centrifugadas, o etanol 70% foi retirado e o pellet foi resuspenso em solução de coloração (triton X-100 0,1% (v/v), PI  $2\mu\text{g}/\text{mL}$ , RNase  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ , em tampão fosfato salino) por 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os 10.000 eventos adquiridos foram analisados com o software ModFit LT 5.0.9. Os dados estão apresentados como porcentagem de distribuição de células entre as fases do ciclo celular.

### **3.13. Ensaio de autofagia**

O ensaio foi conduzido de acordo com as especificações do kit utilizado para detecção de vacúolos autofágicos (*Autophagy Assay Kit* - ab13948, Abcam, Cambridge, Reino Unido). As células PC-3 e DU145 ( $1 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em placa de 96 poços, estabilizadas por 24 horas e tratadas por 24 horas com sulforafano e/ou vitamina D. Foram incluídos os grupos controle negativo (PBS), controle de solvente (0,2% DMSO + 0,2% EtOH), e controle positivo (cloroquina  $100\mu\text{M}$ ). As leituras das fluorescências foram realizadas em espectrofotômetro Synergy H1 (BioTek®; Winooski, VT, EUA) com filtros de Excitação/Emissão de 463/534 (verde) e 350/461 (azul). O fluoróforo verde marca vesículas autofágicas que contém a proteína LC3, o fluoróforo azul marca o núcleo das células. Os valores de fluorescência estão expressos como razão de autofagia (razão dos valores de fluorescência verde pela

azul) (TUSSKORN *et al.*, 2019). As imagens foram realizadas utilizando o Microscópio de Fluorescência Leica DMI 6000B (Leica; Wetzlar, Hessen, Alemanha).

### 3.14. Ensaio cometa

Para verificar se houve dano no DNA de células tratadas com sulforafano e/ou vitamina D por 24 horas, foi realizado o ensaio cometa seguindo o protocolo de Tice *et al.* (2000). Em placas de 24 poços, as células ( $5 \times 10^4$ /poço) foram semeadas, estabilizadas por 24 horas e tratadas. A viabilidade das amostras foi testada por exclusão por Azul de Tripán em contador de células automático Countess (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Todas as amostras apresentaram viabilidade celular maior que 70%.

Para o preparo das lâminas foram adicionados às amostras 150  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e uma alíquota de 60  $\mu$ L da suspensão de cada amostra foi aplicada sobre as lâminas previamente cobertas com agarose normal 1,5%. As lâminas foram mantidas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO, pH 13) *overnight* a 4°C, lavadas e acomodadas em cuba de eletroforese com solução alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos em banho de gelo. A eletroforese foi realizada em solução alcalina por 20 minutos com voltagem (0,87 V/cm) e amperagem (300 mA) constantes. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol absoluto por 5 minutos.

As lâminas foram coradas com GelRed™ 1:10.000 (v/v) (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil) por 3 minutos, e analisadas em microscópio de fluorescência AxioStar Plus (Zeiss) com câmera acoplada, utilizando filtro de 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm em objetiva de 20x. Para cada tratamento foram analisados 300 nucleoides com auxílio do software Comet Assay IV™ (Instem plc, Stone, ST, Inglaterra). Os resultados estão apresentados como porcentagem de DNA na cauda do cometa (*Tail intensity*).

### 3.15. Extração de RNA e RT-qPCR

Para a extração de RNA, as linhagens celulares foram semeadas em frascos de 25cm<sup>2</sup> ventilados para cultura celular (5×10<sup>5</sup> células por frasco). As células foram tratadas com 0,2% DMSO + 0,2% EtOH, sulforafano e/ou vitamina D por 24 horas.

O RNA foi extraído com o kit PureLink RNA Mini (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante e reversamente transcrito usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription. Para a remoção do DNA, as amostras foram tratadas com DNase I (1 U/μL). A PCR quantitativa foi realizada com Power SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix em um sistema Step One Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), utilizando KiCqStart<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Primers pré-desenhados para análise de expressão gênica (Sigma-Aldrich) (Tabela 3). A quantificação da expressão relativa de cada gene foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) usando os genes *ACTB* e *GAPDH* como referência para a normalização.

**Tabela 3.** Primes utilizados para a análise da expressão gênica por RT-qPCR.

Primers ID	Símbolo	Gene ID	Ref Seq ID	Primers ID	Símbolo	Gene ID	Ref Seq ID
H_ACTB_1	ACTB	60	NM_0011101	H_GAPDH_1	GAPDH	2597	NM_002046
H_AKT1_1	AKT1	207	NM_005163	H_HAT1_1	HAT1	8520	NM_003642
H_BAX_1	BAX	581	NM_004324	H_HDAC1_1	HDAC1	3065	NM_004964
H_CASP8_2	CASP8	841	NM_001080124	H_HPRT1_1	HPRT1	3251	NM_000194
H_CCNB1_2	CCNB1	891	NM_031966	H_MAPK1_1	MAPK1	5594	NM_002745
H_CDH1_1	CDH1	999	NM_004360	H_MMP9_1	MMP9	4318	NM_004994
H_CDK1_1	CDK1	983	NM_001170406	H_MYC_1	MYC	4609	NM_002467
H_CTNNB1_2	CTNNB1	1499	NM_001904	H_RELA_1	RELA	5970	NM_021975
H_DNMT1_1	DNMT1	1786	NM_001130823	H_TNF_3	TNF	7124	NM_000594

### 3.16. Extração de proteínas e western blot

Para a extração de proteínas, as linhagens celulares foram semeadas em frascos de 75cm<sup>2</sup> ventilados para cultura celular (2×10<sup>6</sup> células por frasco). As células foram tratadas com 0,2% DMSO + 0,2% EtOH, sulforafano e/ou vitamina D por 24 horas. Após o tratamento, as proteínas foram extraídas com RIPA buffer + 1% protease + 0,1% de fosfatase. A quantificação das proteínas foi feita por meio do kit

Pierce™ BCA Protein Assay da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

Em seguida, foi adicionado *Laemmli sample buffer 2x* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) às amostras (1:1) e submetidas a 95 °C por 5 min. As proteínas presentes nas amostras foram determinadas realizando eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, California, EUA). A ligação não específica foi bloqueada incubando a membrana com leite desnatado a 5% em TBS-T (tampão tris salino com Tween 20 a 0,1%) durante 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4 °C com os anticorpos primários, lavada com TBS-T, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com HRP por 1 hora em temperatura ambiente (Tabela 4). A membrana foi lavada novamente com TBS-T, e os anticorpos secundários foram detectados usando ECL (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA). As bandas de proteína foram visualizadas usando o sistema ChemiDoc™ (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) e a quantificação das bandas foi realizada com o auxílio do software ImageJ 1.53 (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EUA).

**Tabela 4.** Anticorpos utilizados para a análise da expressão de proteínas por western blot.

Anticorpo	Hospedeiro	Marca	CAT number
Anti-β-Actina	Coelho	Cell Signaling Technology	8457S
Anti-Bax	Coelho	Cell Signaling Technology	2772S
Anti-Bcl-2	Coelho	Cell Signaling Technology	2876S
Anti-Caspase-3	Coelho	ABclonal	A2156
Anti-Caspase-8	Coelho	ABclonal	A0215
Anti-Nrf2	Coelho	ABclonal	a1244
Anti-fosfo-JNK1/2	Coelho	ABclonal	ap0473
Anti-IgG de coelho conjugado com HRP	Cabra	ABclonal	AS014

### 3.17. Predição de alvos e de interações

A análise da predição de genes e proteínas alvos modulados por sulforafano e vitamina D foi realizada utilizando o sistema de inferência ChemDIS. Esse sistema identifica potenciais interações entre misturas de compostos, analisando proteínas-alvo, funções (ontologia genética), vias e doenças (ontologia de doenças) comum

entre eles (TUNG, 2015). Os parâmetros usados foram sulforafano e calcitriol como compostos de entrada, score  $\geq 0,7$  e versão do banco de dados v5.0.

A predição das interações de sulforafano e vitamina D com seus alvos e das interações entre os alvos, foi analisada com o auxílio da base de dados STITCH v5.0. O STITCH integra informações sobre interações de vias metabólicas, estruturas cristalinas, experimentos de ligação e relações composto-alvo. E as informações inferidas de efeitos fenotípicos, mineração de texto e similaridade de estrutura química são usadas para prever relações entre substâncias químicas (SZKLARCZYK *et al.*, 2016). Para a análise das interações foram adicionados 21 termos na busca (sulforafano, calcitriol, MAPK1, MAPK8, CASP3, CASP8, AKT1, TNF, BCL2, BAX, NFE2L2, CTNNB1, MYC, RELA, CCNB1, CDK1, MMP9, CDH1, HDAC1, HAT1, DNMT1) e *Homo sapiens* como organismo selecionado.

### **3.18. Análises estatísticas**

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado nos resultados obtidos para verificar a distribuição normal dos dados. Para análise dos resultados dos tratamentos isolados com sulforafano ou vitamina D, foi empregado o teste de Análise de Variância (*one-way* ANOVA) seguido do teste de Tukey ou Dunnett.

A análise estatística dos tratamentos associados foi realizada levando-se em consideração a comparação entre três tratamentos (sulforafano ou vitamina D isolados e sua associação), sem comparações intergrupos, sendo aplicado *two-way* ANOVA seguido de Tukey, onde as letras diferentes indicam diferença estatística dentro de um mesmo grupo.

As análises de expressão gênica, de expressão de proteínas e dos controles positivos foram realizadas por teste *t* de Student ou testes *t* múltiplos. Para cada ensaio foram realizados três experimentos independentes e a diferença significativa das médias foi considerada quando  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 8 versão 8.0.1 (2018).

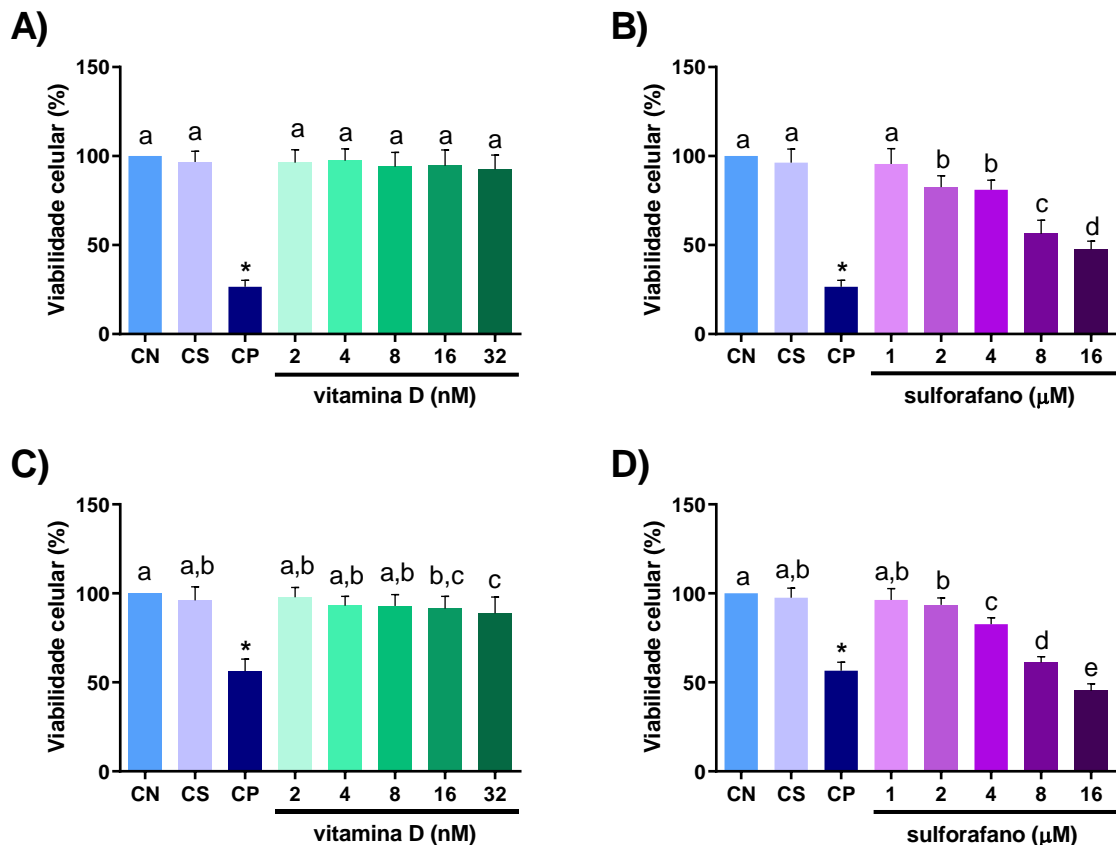
## **4. Resultados**

### **4.1. Avaliação da viabilidade celular com sulforafano e vitamina D isolados**

No ensaio do MTT, a vitamina D não alterou a viabilidade celular da linhagem DU145 (Figura 7.A), porém, em linhagem PC-3 houve uma diminuição significativa da viabilidade após o tratamento com vitamina D nas concentrações de 16 e 32 nM

(Figura 7.C). O sulforafano reduziu a viabilidade das duas linhagens a partir da concentração de 2  $\mu\text{M}$  (Figuras 7.B e 7.D).

**Figura 7.** Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) tratadas com vitamina D e sulforafano por 72 horas

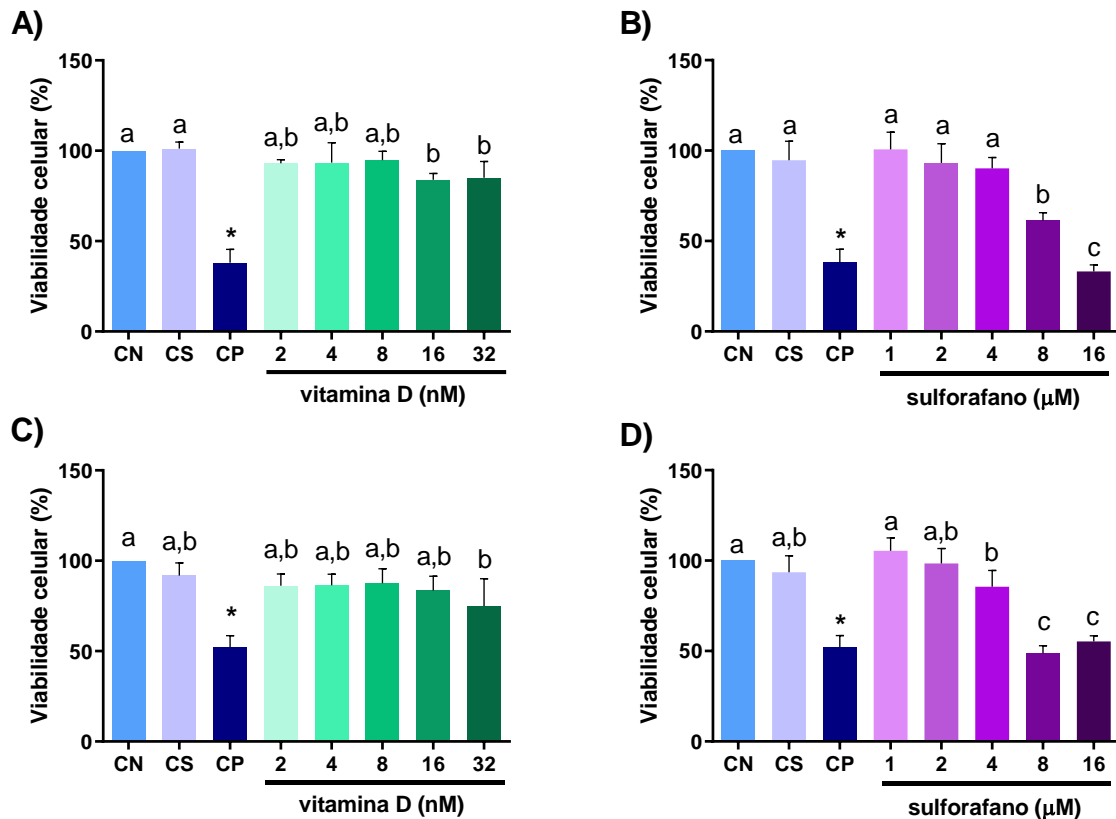


Porcentagem da viabilidade de células DU145 (A) e PC-3 (C) após o tratamento com vitamina D (2, 4, 8, 16 e 32 nM) por 72 horas. Porcentagem da viabilidade de células DU145 (B) e PC-3 (D) após o tratamento com sulforafano (1, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. CN = controle negativo (PBS); CS = controle de solvente (EtOH 0,2% ou DMSO 0,2%); CP = controle positivo (cisplatina 10 $\mu\text{M}$ ). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Valores que não possuem a mesma letra diferem significativamente entre si (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). \* Valores diferem significativamente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ).

No ensaio do vermelho neutro a vitamina D diminuiu significativamente a viabilidade da linhagem DU145 em concentrações de 16 e 32 nM (Figura 8.A), já em linhagem PC-3 a viabilidade celular foi reduzida somente na concentração de 32 nM (Figura 8.C). O sulforafano diminuiu a viabilidade de células DU145 em concentrações de 8 e 16  $\mu\text{M}$  (Figura 8.B) e de células PC-3 a partir de 4  $\mu\text{M}$  (Figura 8.D).

Os solventes, EtOH e DMSO (0,2%), não alteraram a viabilidade das células, enquanto a cisplatina 10  $\mu\text{M}$  (controle positivo) reduziu a viabilidade das duas linhagens em ambos os ensaios.

**Figura 8.** Resultados dos ensaios de vermelho neutro em células DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) tratadas com vitamina D e sulforafano por 72 horas



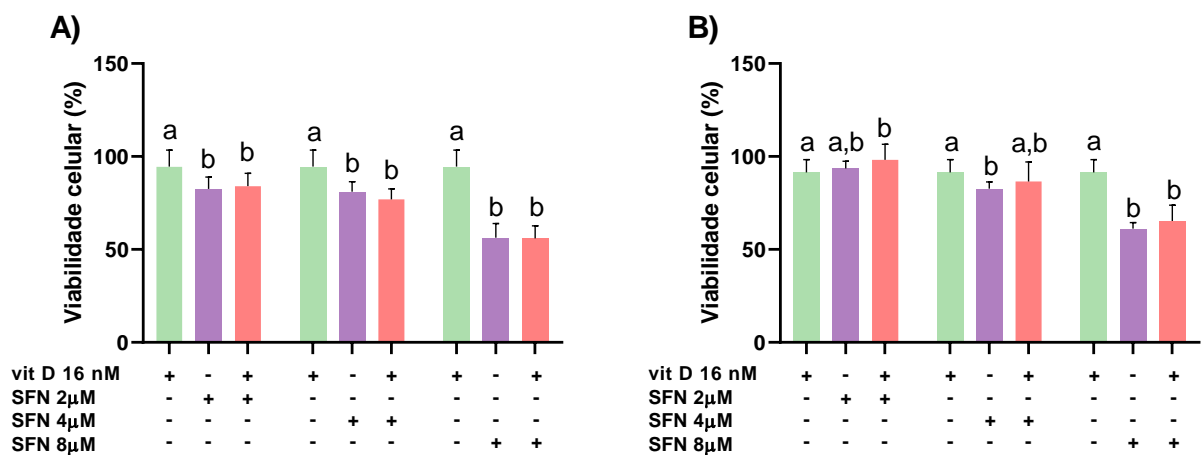
Porcentagem da viabilidade de células DU145 (A) e PC-3 (C) após o tratamento com vitamina D (2, 4, 8, 16 e 32 nM) por 72 horas. Porcentagem da viabilidade de células DU145 (B) e PC-3 (D) após o tratamento com sulforafano (1, 2, 4, 8 e 16  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. CN = controle negativo (PBS); CS = controle de solvente (EtOH 0,2% ou DMSO 0,2%); CP = controle positivo (cisplatina 10 $\mu\text{M}$ ). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Valores que não possuem a mesma letra diferem significativamente entre si (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). \* Valores diferem significativamente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Avaliação da viabilidade celular com sulforafano e vitamina D associados

De acordo com os resultados dos ensaios de viabilidade celular de sulforafano e vitamina D descritos acima foram selecionadas três concentrações de sulforafano (2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) a serem associadas à vitamina D (16 nM) para avaliar os possíveis efeitos dessa associação em três protocolos de tratamento distintos: simultâneo, pré e pós-tratamento.

Em todos os protocolos de tratamento a associação dos compostos não apresentou resposta diferente daquela apresentada por sulforafano quando avaliado individualmente, logo, não foi observado efeito sinérgico ou de potencialização na redução da viabilidade celular com a associação de sulforafano e vitamina D (Figuras 9 e 10).

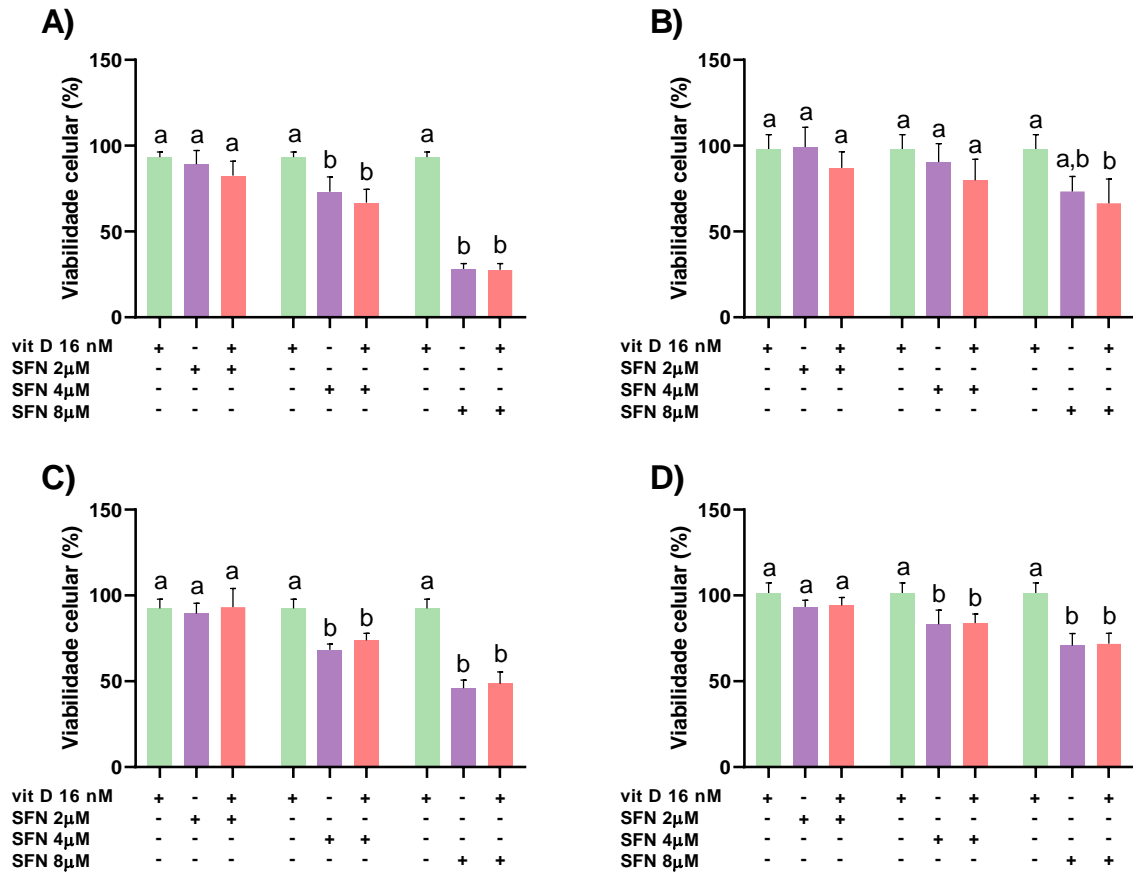
**Figura 9.** Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A) e PC-3 (B) tratadas com sulforafano associado à vitamina D por 72 horas em protocolo de tratamento simultâneo



Porcentagem da viabilidade de células DU145 (A) e PC-3 (B) após o tratamento simultâneo com sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) e vitamina D (16 nM) por 72 horas. Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D.



**Figura 10.** Resultados dos ensaios de MTT em DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) tratadas com sulforafano associado à vitamina D por 96 horas em protocolo de pré e pós tratamento



Porcentagem da viabilidade de células DU145 (A) e PC-3 (C) após o pré-tratamento de 48 horas com sulforafano (2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) seguido de tratamento com vitamina D (16 nM) por 48 horas. Porcentagem da viabilidade de células DU145 (B) e PC-3 (D) após o tratamento de 48 horas vitamina D (16 nM) seguido de pós-tratamento com sulforafano (2, 4 ou 8  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way ANOVA-Tukey*,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D.

A partir dos resultados das associações foi selecionado o protocolo de tratamento simultâneo para os próximos ensaios, a fim de avaliar os efeitos das concentrações de 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$  de sulforafano em associação com vitamina D (16 nM).

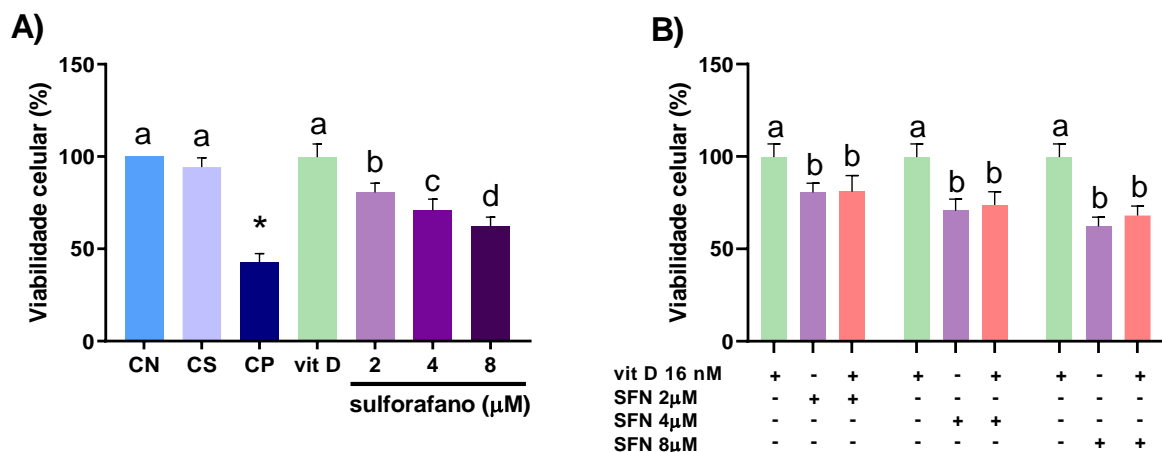
#### 4.3. Avaliação da viabilidade de células HaCaT com sulforafano e/ou vitamina D

Para comparar com os efeitos na viabilidade de células não tumorais, sulforafano e vitamina D isolados e associados também foram testados em linhagem humana não tumoral de pele (HaCaT) utilizando o ensaio do MTT.

Em células HaCaT, a vitamina D na concentração de 16 nM não alterou a viabilidade celular. Sulforafano diminuiu a viabilidade celular em todas as

concentrações testadas (2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) (Figura 11.A). Após a associação dos compostos em tratamento simultâneo por 72 horas, não foram observadas diferenças entre os tratamentos associados e tratamento somente com sulforafano (Figura 11.B), demonstrando que os resultados em células HaCaT foram semelhantes aos apresentados pelas células tumorais de próstata DU145 e PC-3, o que indica que não há um possível efeito seletivo dos compostos avaliados.

**Figura 11.** Resultados dos ensaios de MTT em células HaCaT tratadas com sulforafano e vitamina D isolados (A) ou associados (B) por 72 horas em protocolo de tratamento simultâneo

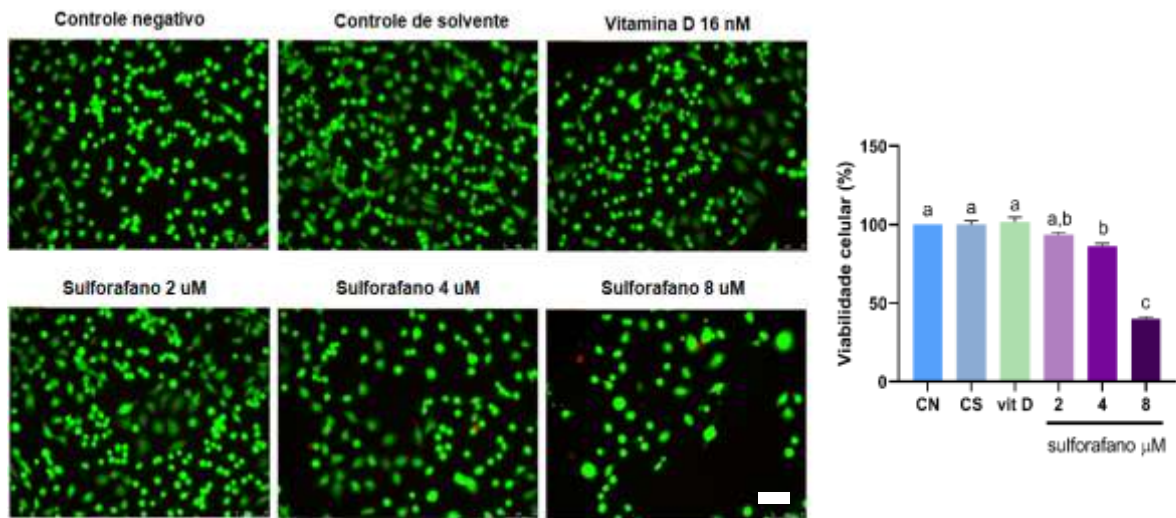


Porcentagem da viabilidade de células HaCaT (A) após o tratamento com vitamina D (16 nM) ou sulforafano (2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. CN = controle negativo (PBS); CS = controle de solvente (EtOH 0,2% + DMSO 0,2%); CP = controle positivo (cisplatina 10 $\mu\text{M}$ ). Valores que não possuem a mesma letra diferem significativamente entre si (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). \* Valores diferem significativamente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ). Porcentagem da viabilidade de células HaCaT (B) após o tratamento simultâneo com sulforafano (2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) e vitamina D (16 nM) por 72 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D.

#### 4.4. Investigação da indução de morte celular utilizando o kit Live/Dead

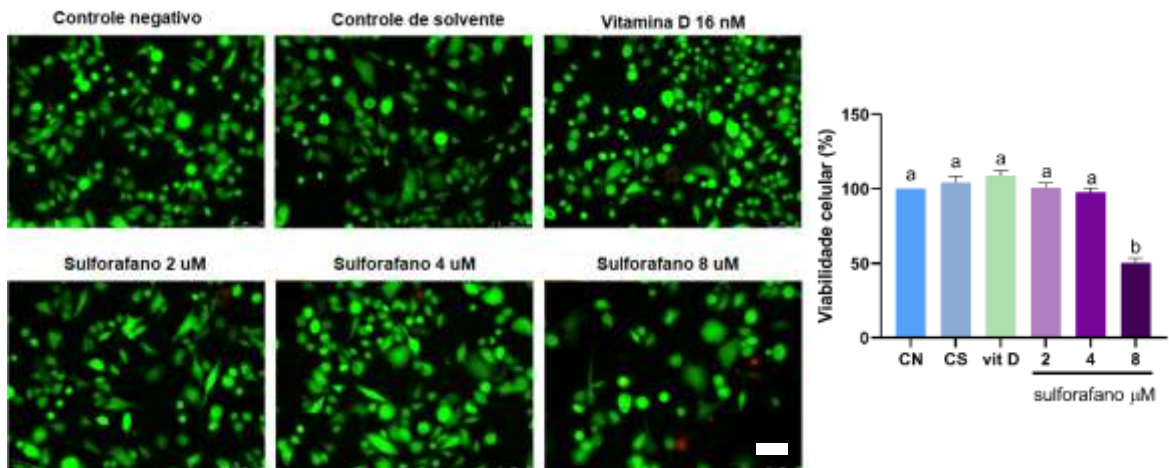
As análises dos resultados de viabilidade celular por LIVE/DEAD mostram que o sulforafano nas concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}$  diminuíram a viabilidade de células DU145 (Figura 12), enquanto somente a concentração de 8  $\mu\text{M}$  de sulforafano foi efetiva na diminuição da viabilidade de células PC-3 (Figura 13). O tratamento com vitamina D (16 nM) não reduziu a viabilidade celular em ambas as linhagens. Os dados dos controles de solvente foram iguais aos dos controles negativos.

**Figura 12.** Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células DU145 após 72 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D em células DU145 após 72 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D



As fotomicrografias mostram células viáveis com membrana intacta marcadas em verde e células mortas com membrana danificada marcadas em vermelho. Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). Vit D: vitamina D 16 nM; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Barra de escala = 75  $\mu$ m.

**Figura 13.** Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células PC-3 após 72 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D

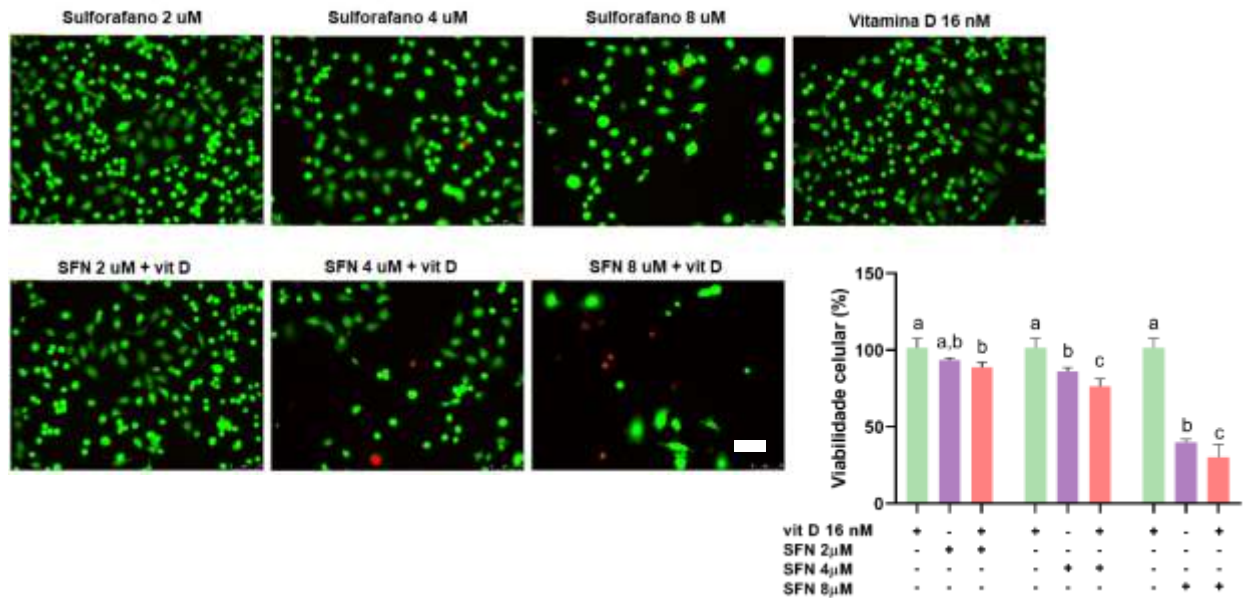


As fotomicrografias mostram células viáveis com membrana intacta marcadas em verde e células mortas com membrana danificada marcadas em vermelho. Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). Vit D: vitamina D 16 nM; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Barra de escala = 75  $\mu$ m.

A associação de vitamina D (16 nM) ao sulforafano (4 e 8  $\mu$ M) aumentou a indução de morte celular pelo sulforafano em células DU145 (Figura 14) e PC-3

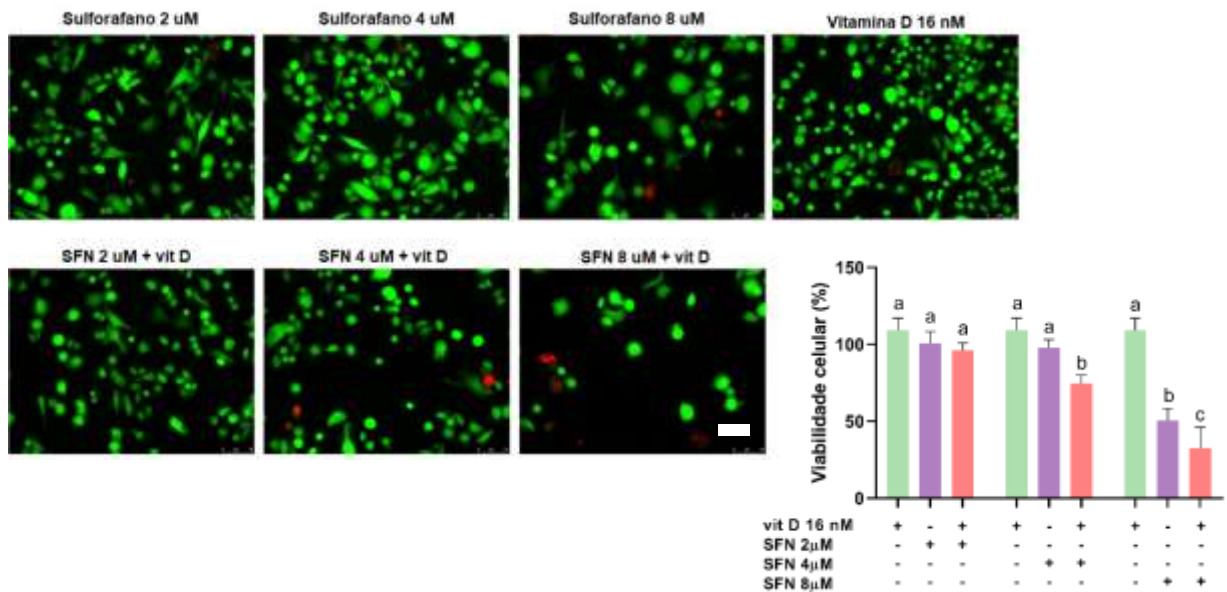
(Figura 15), quando comparado ao efeito do sulforafano avaliado individualmente ( $p < 0,05$ ).

**Figura 14.** Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células DU145 após 72 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D



As fotomicrografias mostram células viáveis com membrana intacta marcadas em verde e células mortas com membrana danificada marcadas em vermelho. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D 16 nM: vitamina D 16 nM. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Barra de escala = 75  $\mu$ m.

**Figura 15.** Resultados da análise de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD em células PC-3 após 72 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D



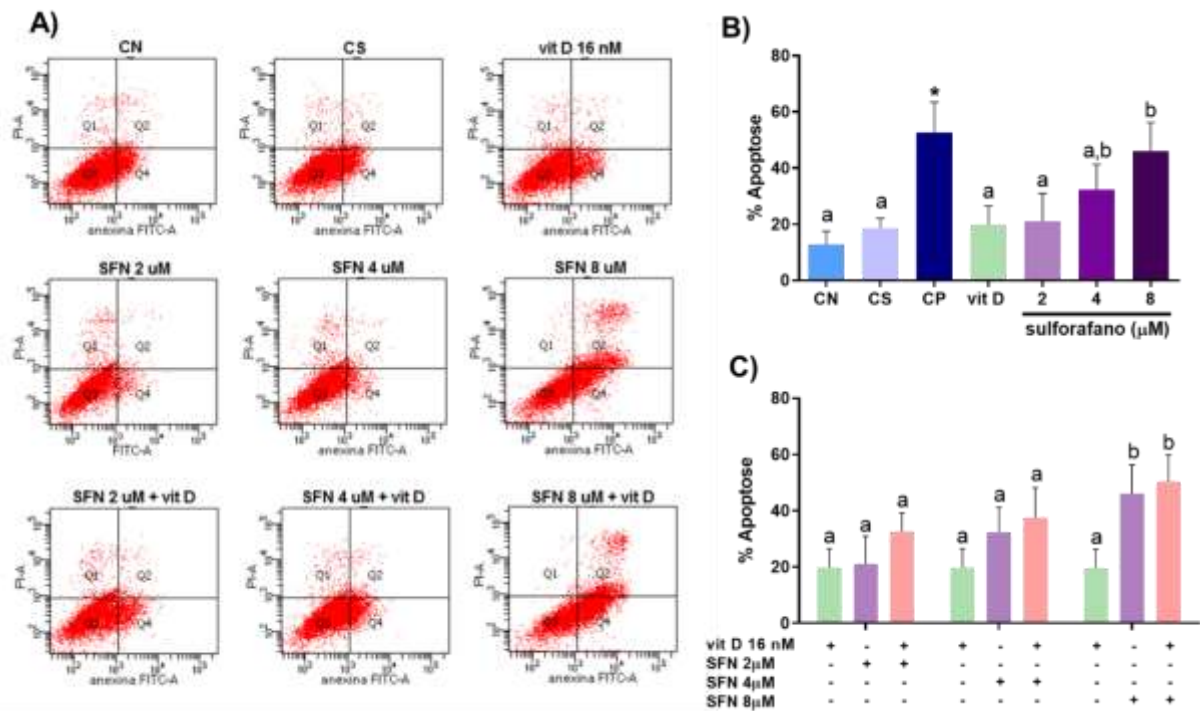
As fotomicrografias mostram células viáveis com membrana intacta marcadas em verde e células mortas com membrana danificada marcadas em vermelho. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D 16 nM: vitamina D 16 nM. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Barra de escala = 75  $\mu$ m.

#### 4.5. Investigação da indução de apoptose por citometria de fluxo

Os resultados de citometria de fluxo mostram que apenas o sulforafano na concentração de 8  $\mu$ M induziu morte por apoptose em células DU145 (Figura 16.B) e PC-3 (Figura 17.B). A associação de vitamina D (16 nM) ao sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) não demonstrou resposta diferente da apresentada por sulforafano quando testado sozinho em ambas as linhagens (Figuras 16.C e 17.C). Os dados do controle de solvente foram iguais ao controle negativo. O controle positivo aumentou a morte por apoptose nas duas linhagens testadas.

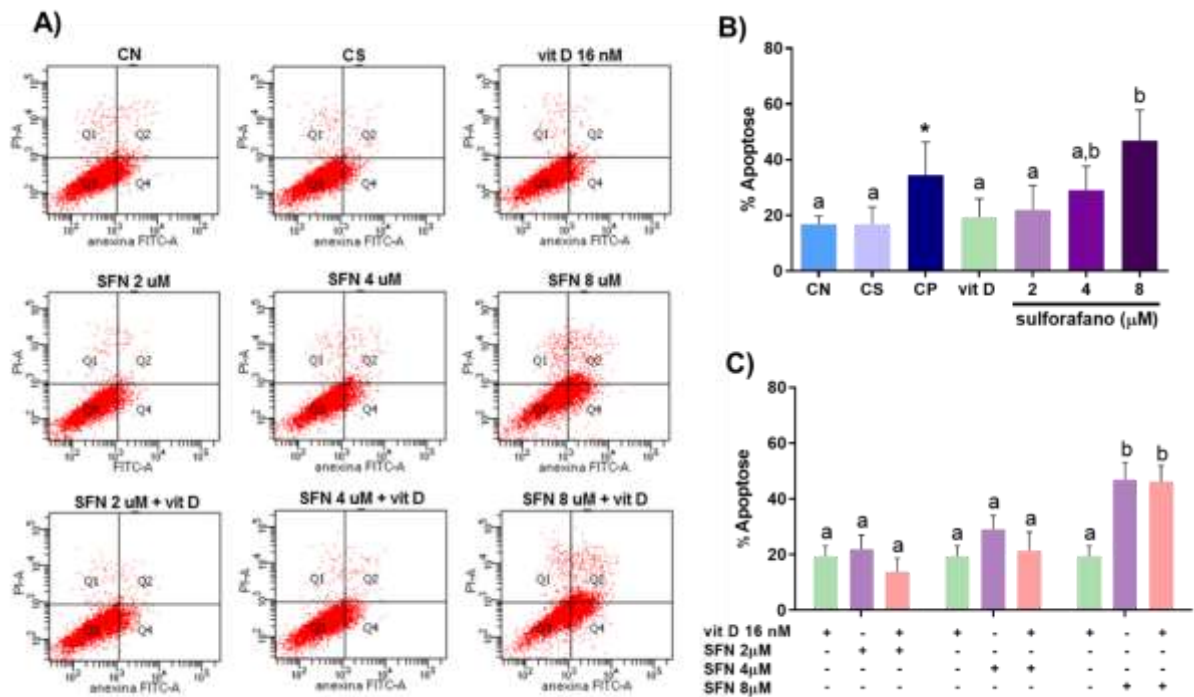


**Figura 16.** Caracterização do perfil de morte de células DU145 após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo



A: distribuição das células DU145 coradas com anexina V-FITC/PI. Q1: anexina -/PI +; Q2: anexina +/PI+; Q3: anexina -/PI -; Q4: anexina +/PI-. B: porcentagem de células DU145 apoptóticas (Q2 + Q4) em tratamento isolado. Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). \* Diferente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ). C: porcentagem de células DU145 apoptóticas (Q2 + Q4) em tratamento associado. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); CP: controle positivo (Doxorrubicina 1  $\mu$ M). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

**Figura 17.** Caracterização do perfil de morte de células PC-3 após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo

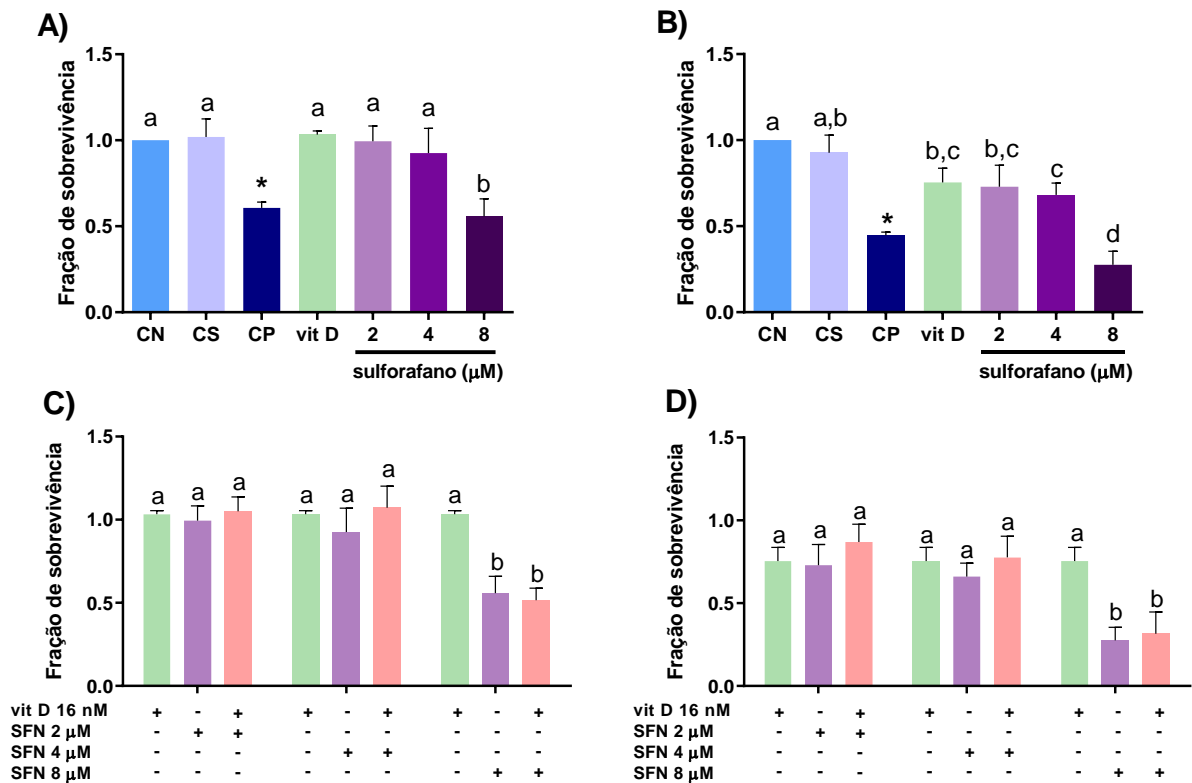


A: distribuição das células PC-3 coradas com anexina V-FITC/PI. Q1: anexina -/PI +; Q2: anexina +/PI+; Q3: anexina -/PI -; Q4: anexina +/PI-. B: porcentagem de células PC-3 apoptóticas (Q2 + Q4) em tratamento isolado. Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). \* Diferente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ). C: porcentagem de células PC-3 apoptóticas (Q2 + Q4) em tratamento associado. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); CP: controle positivo (Doxorrubicina 1 μM). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4.6. Avaliação da proliferação celular por meio do ensaio clonogênico

Em ensaio clonogênico, a concentração de 8 μM de sulforafano foi a única capaz de inibir a formação de colônias de células DU145 após 72 horas de tratamento e incubação por 10 dias sem tratamento (Figura 18.A). Enquanto em células PC-3, todos os tratamentos diminuíram a formação das colônias (Figura 18.B) Em tratamento associado com sulforafano (2, 4 e 8 μM) e vitamina D (16 nM), não foram observadas diferenças nas respostas das associações quando comparadas às respostas dos tratamentos de sulforafano isolado (Figuras 18.C e 18.D). O controle de solvente foi igual ao controle negativo, e o control positivo inibiu a formação de colônias em ambas as linhagens.

**Figura 18.** Análise da proliferação de células DU145 e PC-3 após tratamento de 72 horas com sulforafano e/ou vitamina D por ensaio clonogênico



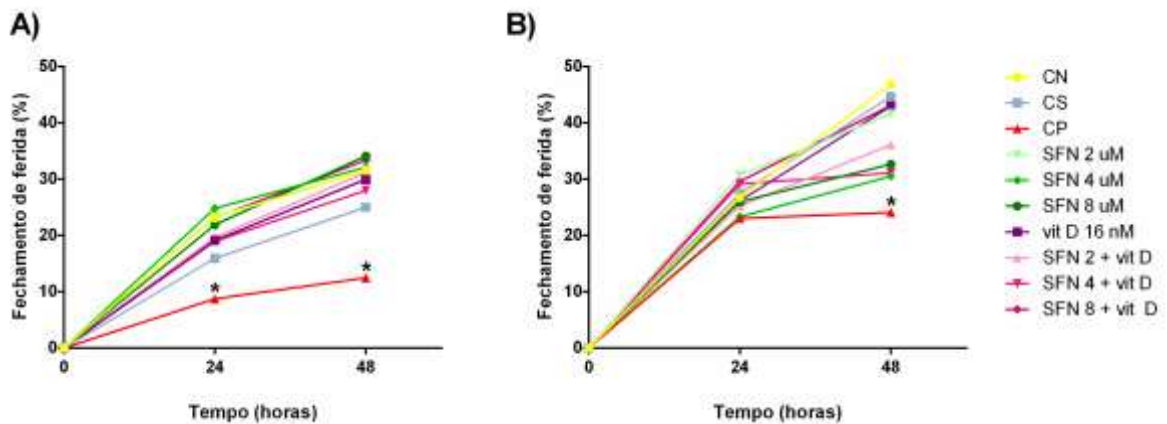
A e B: fração de sobrevivência de células DU145 (A) e PC-3 (B) após tratamento isolado. Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). \* Diferente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ). C e D: fração de sobrevivência de células DU145 (C) e PC-3 (D) após tratamento associado. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); CP: controle positivo (metanossulfonato de metila 150 μM). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4.7. Análise da capacidade de migração (*wound healing*)

A análise da migração celular foi realizada por meio no ensaio de *wound healing*. Neste ensaio não foi observada nenhuma alteração na atividade migratória de células DU145 (Figura 19.A) e PC-3 (Figura 19.B) tratadas com sulforafano (2, 4 e 8 μM) e vitamina D (16 nM), tanto isolados, como associados. Controle negativo e solvente apresentaram as mesmas respostas, enquanto o controle positivo diminuiu a migração de ambas as células.



**Figura 19.** Análise de migração de células DU145 e PC-3 após tratamento de 48 horas com sulforafano e/ou vitamina D por ensaio de *wound healing*

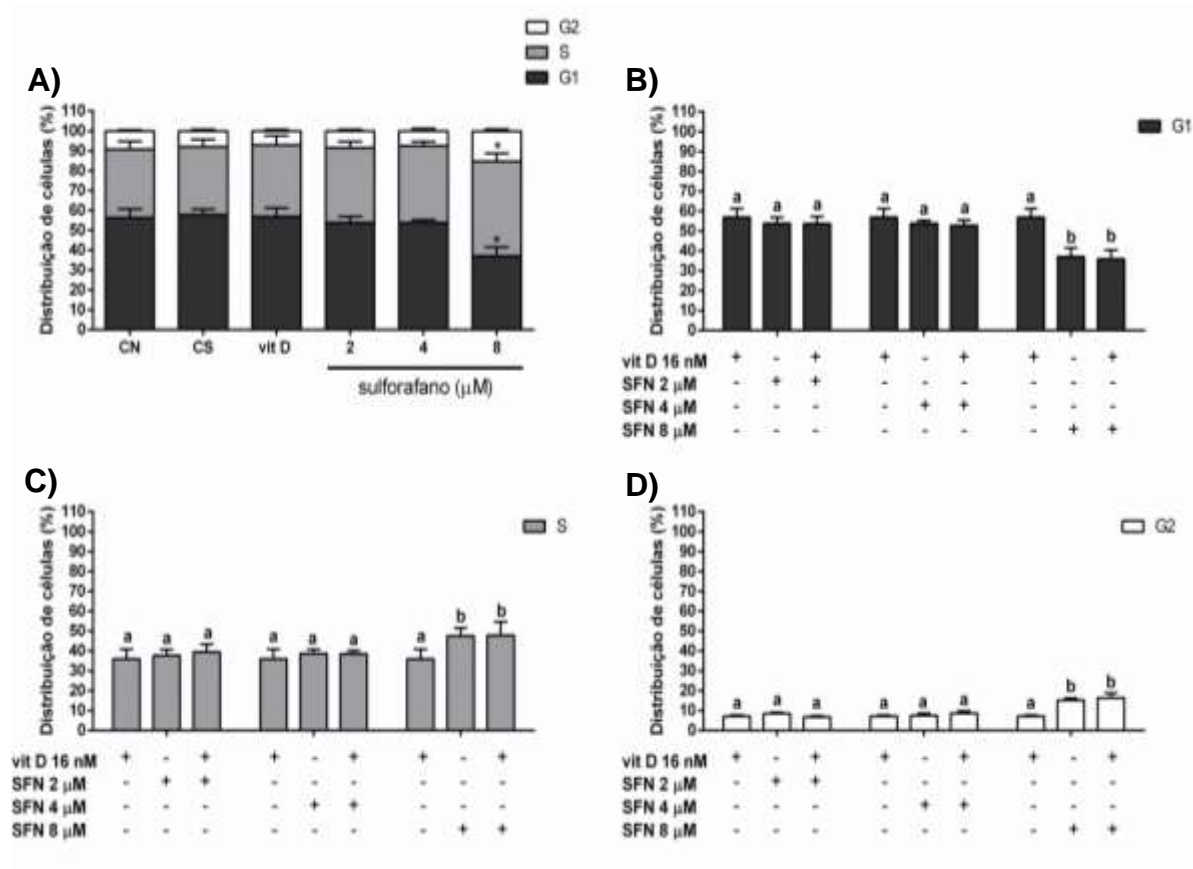


A: porcentagem de fechamento de ferida em DU145 após 48 horas de tratamento; B: porcentagem de fechamento de ferida em células PC-3 após 48 horas de tratamento. \* Diferente do controle negativo (*one-way* ANOVA-Dunnett,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); CP: controle positivo (cisplatina 10  $\mu$ M). Os dados estão expressos em média de três experimentos independentes.

#### 4.8. Investigação do efeito de sulforafano e/ou vitamina D sobre o ciclo celular

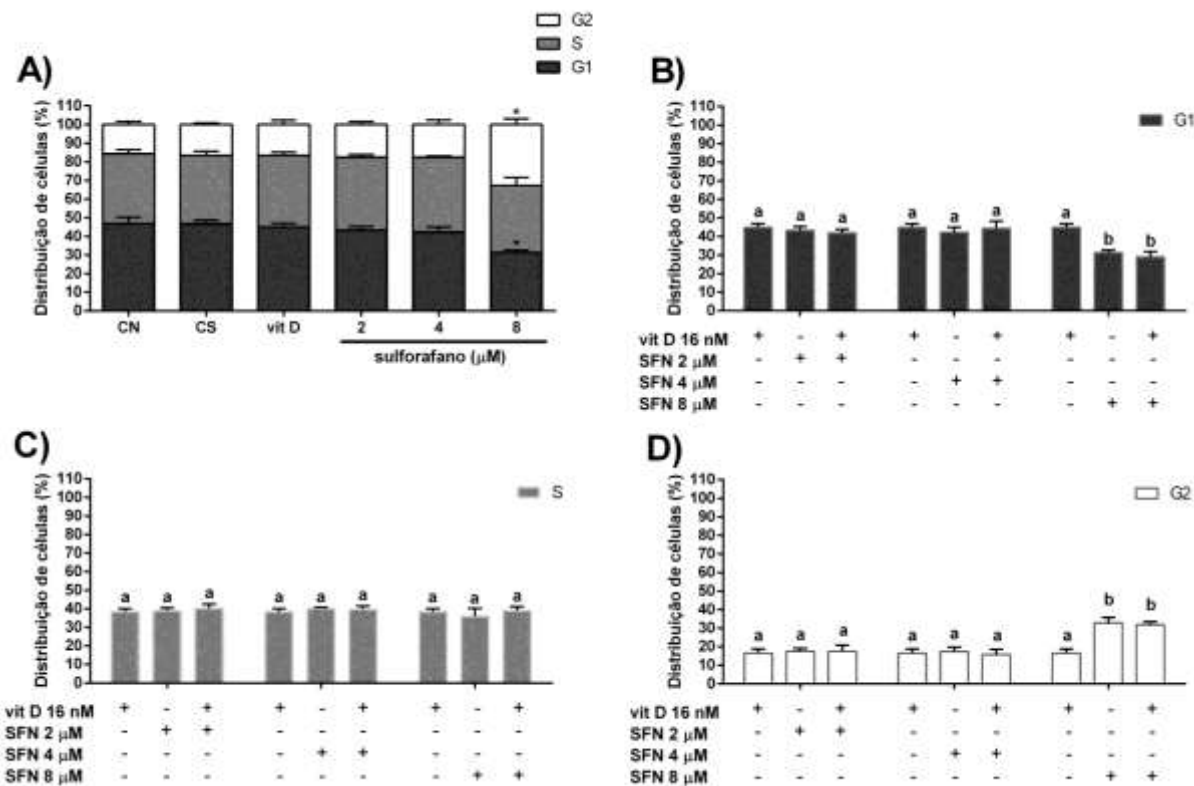
Em células DU145, o sulforafano (8  $\mu$ M) causou parada do ciclo celular em fases S e G2, com diminuição da população de células em fase G1 (Figura 20.A). Em células PC-3, o sulforafano (8  $\mu$ M) provocou parada do ciclo celular em fase G2, também com diminuição da população de células em fase G1 (Figura 21.A). Associando sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) à vitamina D (16 nM), não foi possível observar diferença no efeito sobre o ciclo de células DU145 e PC-3 quando comparado ao efeito de sulforafano isolado (Figuras 20.B,C,D e 21.B,C,D). A distribuição de células entre as fases do ciclo no controle de solvente foi igual à distribuição no controle negativo nas duas linhagens.

**Figura 20.** Análise da distribuição de células DU145 entre as fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo



A: distribuição de células DU145 entre as fases do ciclo celular após tratamento isolado e marcação do DNA com iodeto de propídio. \* Diferente do controle negativo (*two-way* ANOVA-Dunnnett,  $p < 0.05$ ). B, C e D: distribuição de células DU145 em fase G1 (B), S (C) e G2 (D) do ciclo celular após tratamento associado e marcação do DNA com iodeto de propídio. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

**Figura 21.** Análise da distribuição de células PC-3 entre as fases do ciclo celular após 72 horas de tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por citometria de fluxo



A: distribuição de células PC-3 entre as fases do ciclo celular após tratamento isolado e marcação do DNA com iodeto de propídio. \* Diferente do controle negativo (*two-way* ANOVA-Dunnett,  $p < 0.05$ ). B, C e D: distribuição de células PC-3 em fase G1 (B), S (C) e G2 (D) do ciclo celular após tratamento associado e marcação do DNA com iodeto de propídio. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4.9. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com sulforafano e/ou vitamina D por 24 horas

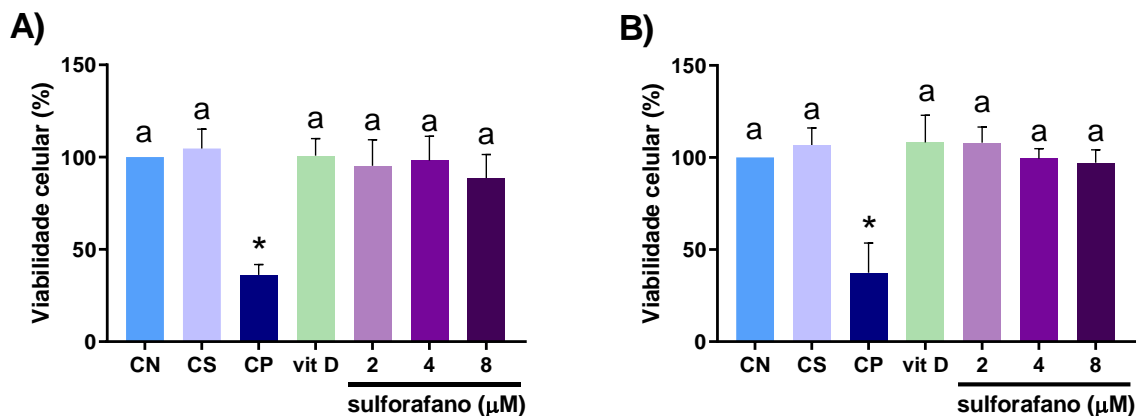
Nos próximos ensaios as células DU145 e PC-3 foram tratadas por até 24 horas com sulforafano e/ou vitamina D. Um tempo de tratamento menor é essencial no caso dos ensaios de estresse oxidativo, indução de autofagia e danos no DNA devido à cinética dos mecanismos de ação avaliados. As espécies reativas são instáveis e seu processo de inativação ocorre rapidamente. O processo de formação e degradação dos autofagossomos acontece de maneira rápida, além disso, o esgotamento dos nutrientes no meio de cultura pode induzir a autofagia, interferindo nos resultados observados. Os danos no DNA causados pela exposição aos compostos avaliados

podem ser reparados, portanto, um tempo de tratamento longo poderia ser responsável por resultados falso-negativos.

Para verificar e garantir a viabilidade de células DU145 e PC-3 após 24 horas de tratamento com vitamina D e sulforafano isolados ou associados, foi realizado ensaio de MTT.

Os resultados demonstraram que não houve diminuição da viabilidade celular nos tratamentos com vitamina D (16 nM) e sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) isolados em ambas as linhagens (Figura 22).

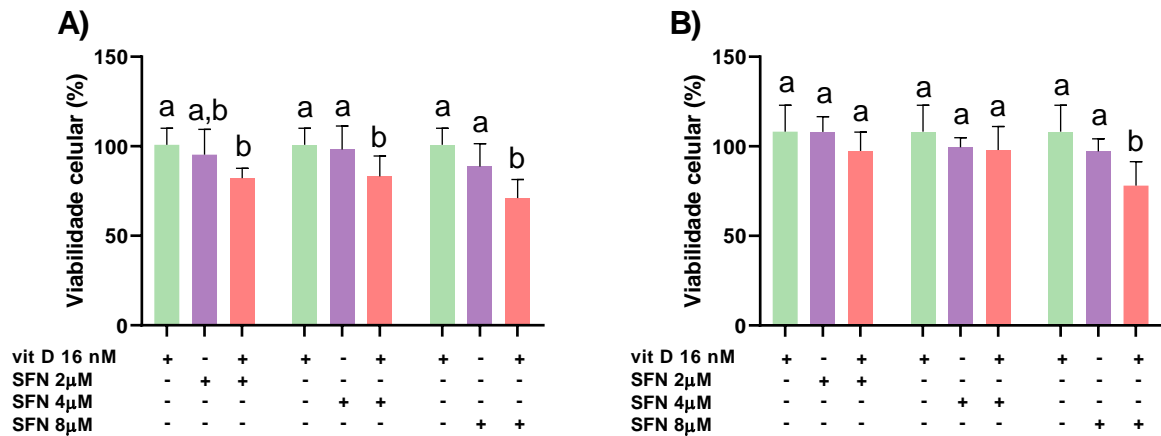
**Figura 22.** Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A) e PC-3 (B) tratadas com vitamina D e sulforafano por 24 horas



Porcentagem da viabilidade de células DU145 (A) e PC-3 (B) após o tratamento com vitamina D (16 nM) ou sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) por 24 horas. CN = controle negativo (PBS); CS = controle de solvente (EtOH 0,2% + DMSO 0,2%); CP = controle positivo (cisplatina 10 $\mu$ M). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Valores que não possuem a mesma letra diferem significativamente entre si (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). \* Valores diferem significativamente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ ).

Em células DU145, após 24 horas de tratamento simultâneo com vitamina D e sulforafano, foi observada diminuição da viabilidade celular em todas as associações testadas quando comparadas aos tratamentos isolados (Figura 23.A). Em células PC-3, somente a associação de 8  $\mu$ M de sulforafano e vitamina D (16 nM) diminuiu a viabilidade celular em relação aos tratamentos isolados (Figura 23.B).

**Figura 23.** Resultados dos ensaios de MTT em células DU145 (A) e PC-3 (B) tratadas com sulforafano associado à vitamina D por 24 horas em protocolo de tratamento simultâneo

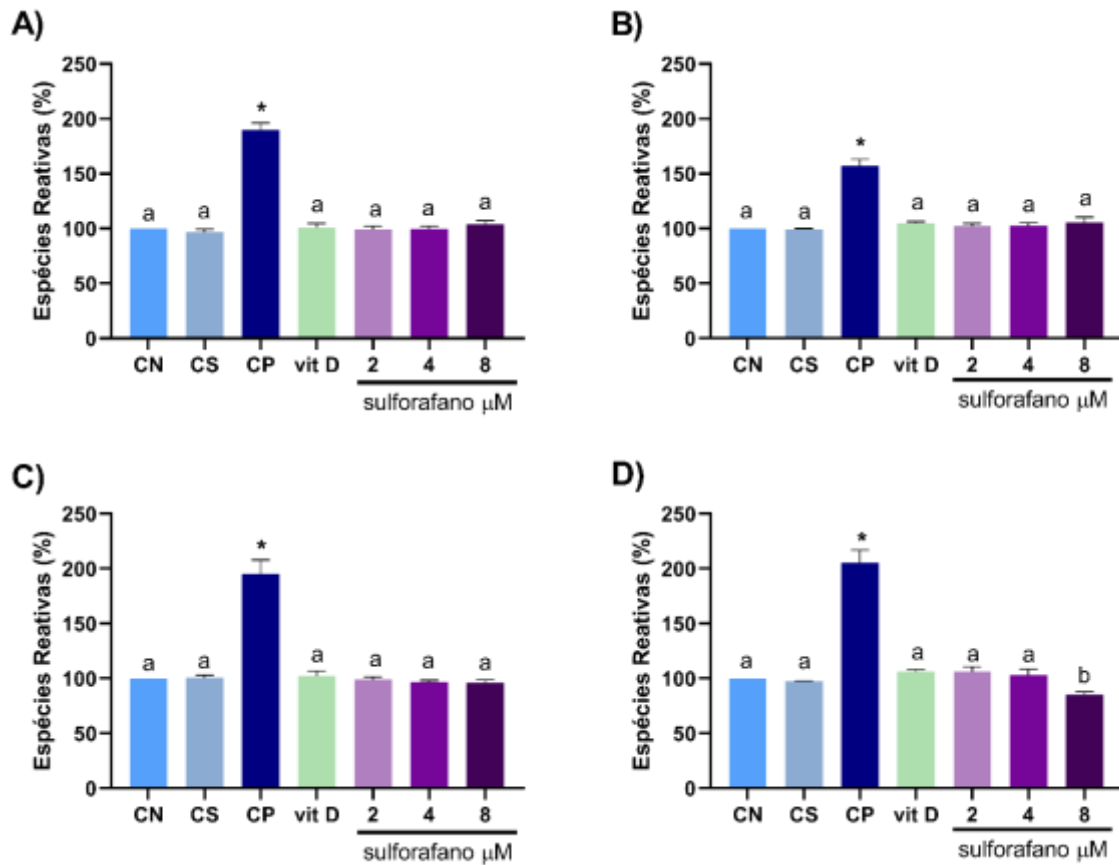


Porcentagem da viabilidade de células DU145 (A) e PC-3 (B) após o tratamento simultâneo com sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) e vitamina D (16 nM) por 24 horas. Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way ANOVA-Tukey*,  $p < 0,05$ ). SFN: sulforafano; vit D: vitamina D.

#### 4.10. Avaliação do estresse oxidativo por meio do marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA

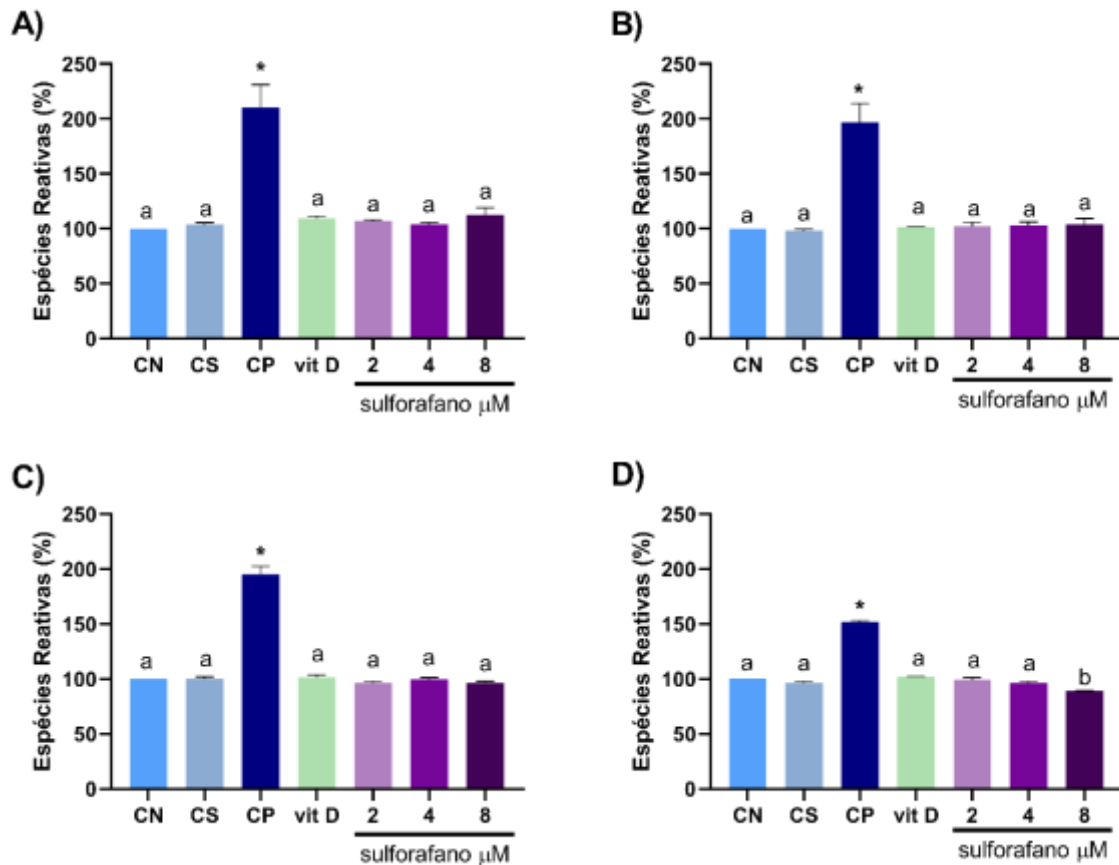
Os resultados mostram que a vitamina D (16 nM) e o sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) não induziram aumento de espécies reativas após tratamento por 2, 3, 4 e 24 horas em células DU145 (Figura 24) e PC-3 (Figura 25). A concentração de 8  $\mu$ M de sulforafano diminuiu a porcentagem de espécies reativas após 24 horas de tratamento quando comparada ao controle negativo em células DU145 (Figura 24.D) e PC-3 (Figura 25.D). A porcentagem de espécies reativas do controle de solvente não apresentou diferença entre a porcentagem observada para o controle negativo. O controle positivo foi significativamente diferente do controle negativo.

**Figura 24.** Análise da produção de espécies reativas em células DU145 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano e vitamina D utilizando o marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA



Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). \* Diferente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0.05$ ). Vit D: vitamina D 16 nM; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); CP: controle positivo (peróxido de hidrogênio 1mM). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

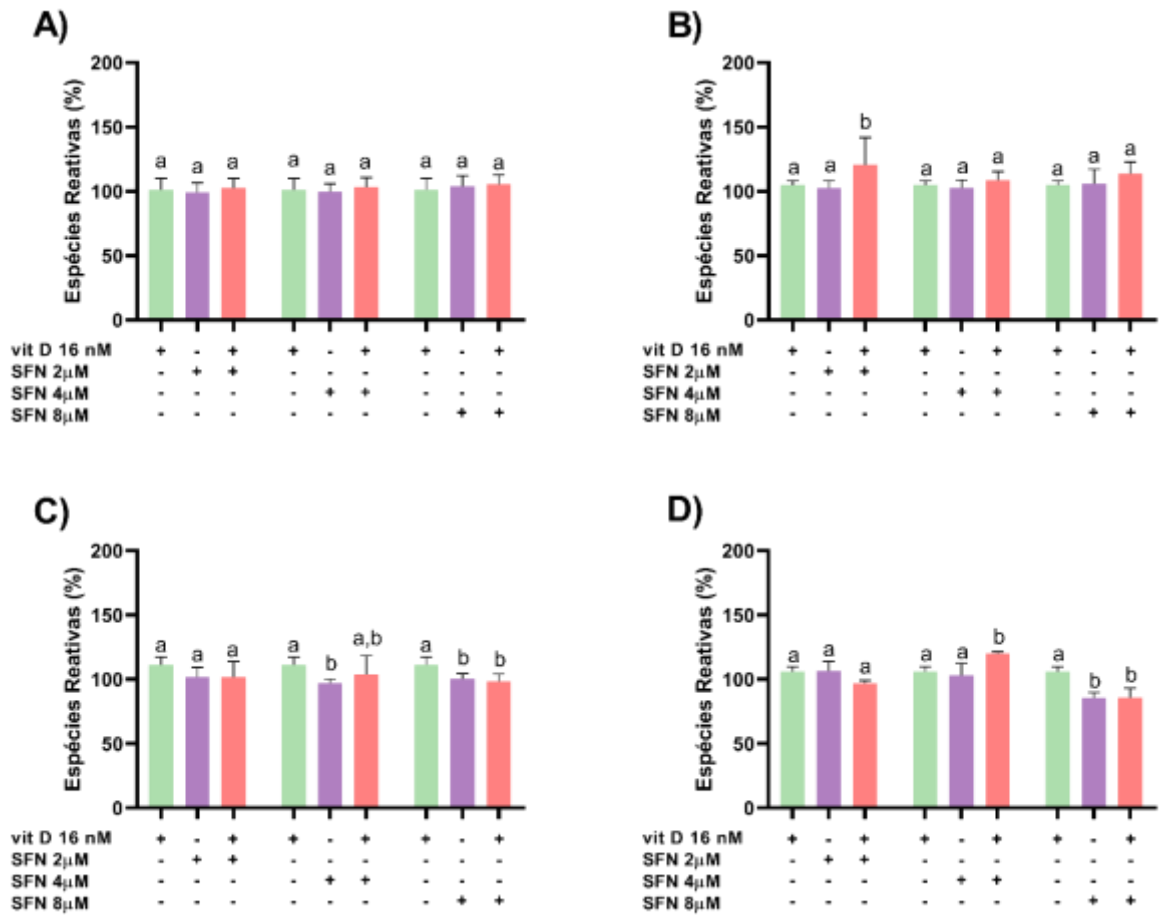
**Figura 25.** Análise da produção de espécies reativas em células PC-3 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano e vitamina D utilizando o marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA



Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). \* Diferente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0.05$ ). Vit D: vitamina D 16 nM; CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); CP: controle positivo (peróxido de hidrogênio 1mM). Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Em células DU145, a associação de vitamina D (16 nM) ao sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) não alterou a produção de espécies reativas após 2 e 4 horas de tratamento quando comparado ao sulforafano isolado. Após 3 horas de tratamento, a concentração de 2  $\mu$ M de sulforafano associada à vitamina D demonstrou indução de estresse oxidativo, bem como a concentração de 4  $\mu$ M de sulforafano associado à vitamina D após tratamento de 24 horas (Figura 26).

**Figura 26.** Análise da produção de espécies reativas em células DU145 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano associado à vitamina D utilizando o marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA

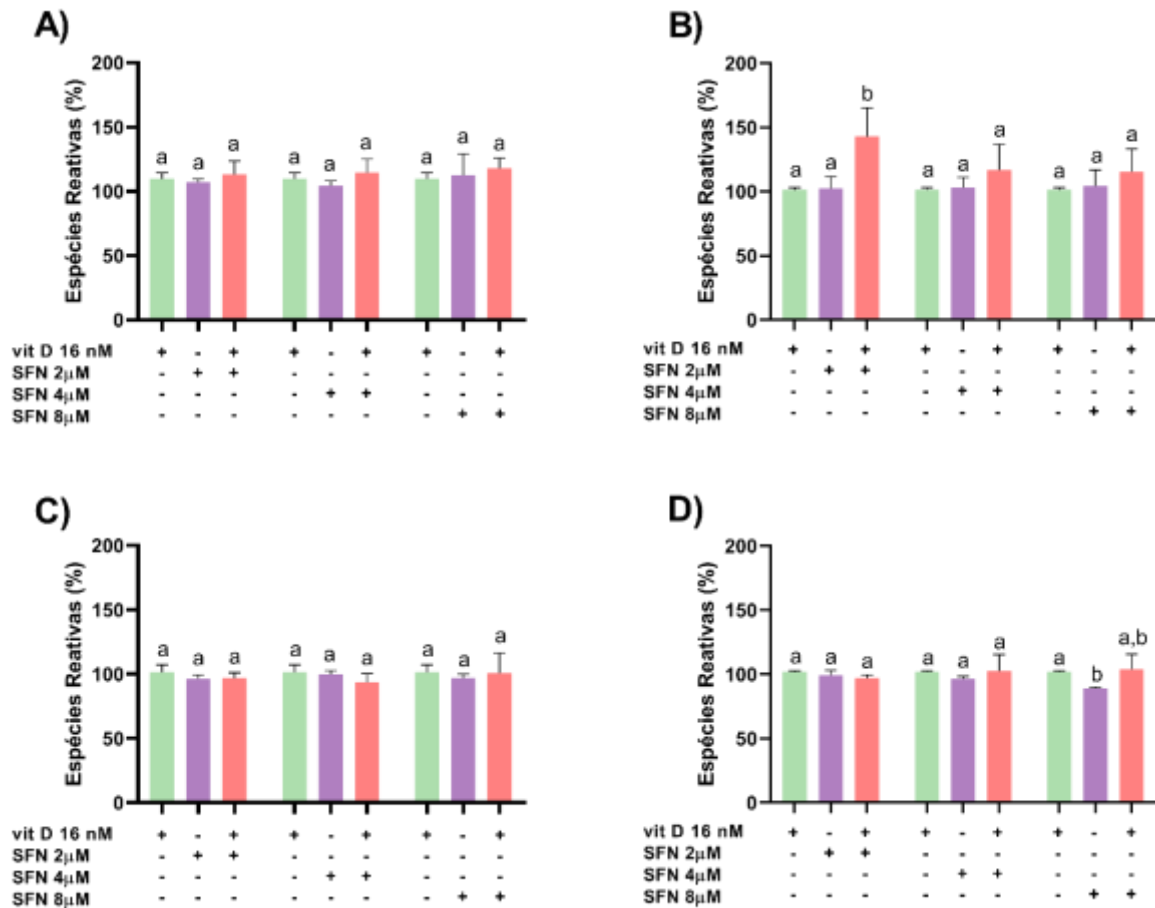


Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D 16 nM: vitamina D 16 nM. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Em células PC-3, não foi observado indução de estresse oxidativo após o tratamento associado de vitamina D (16 nM) e sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) por 2, 4 e 24 horas. Após tratamento associado de 3 horas, houve aumento de geração de espécies reativas quando associado a concentração de 2  $\mu$ M de sulforafano à vitamina D (Figura 27).



**Figura 27.** Análise da produção de espécies reativas em células PC-3 após tratamento de 2(A), 3(B), 4(C) e 24(D) horas com sulforafano associado à vitamina D utilizando o marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA

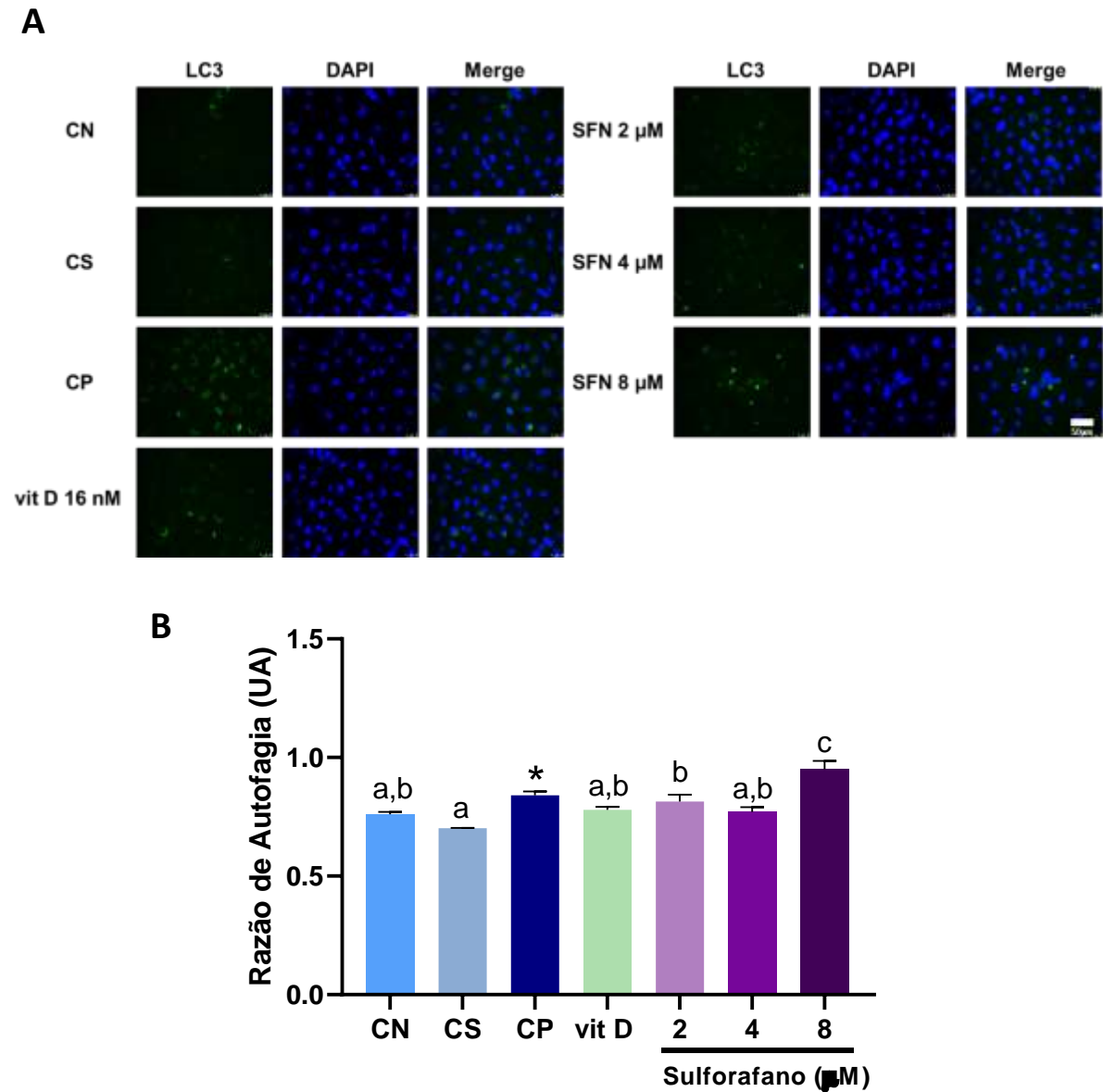


Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). SFN: sulforafano; vit D 16 nM: vitamina D 16 nM. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4.11. Investigação da indução de autofagia

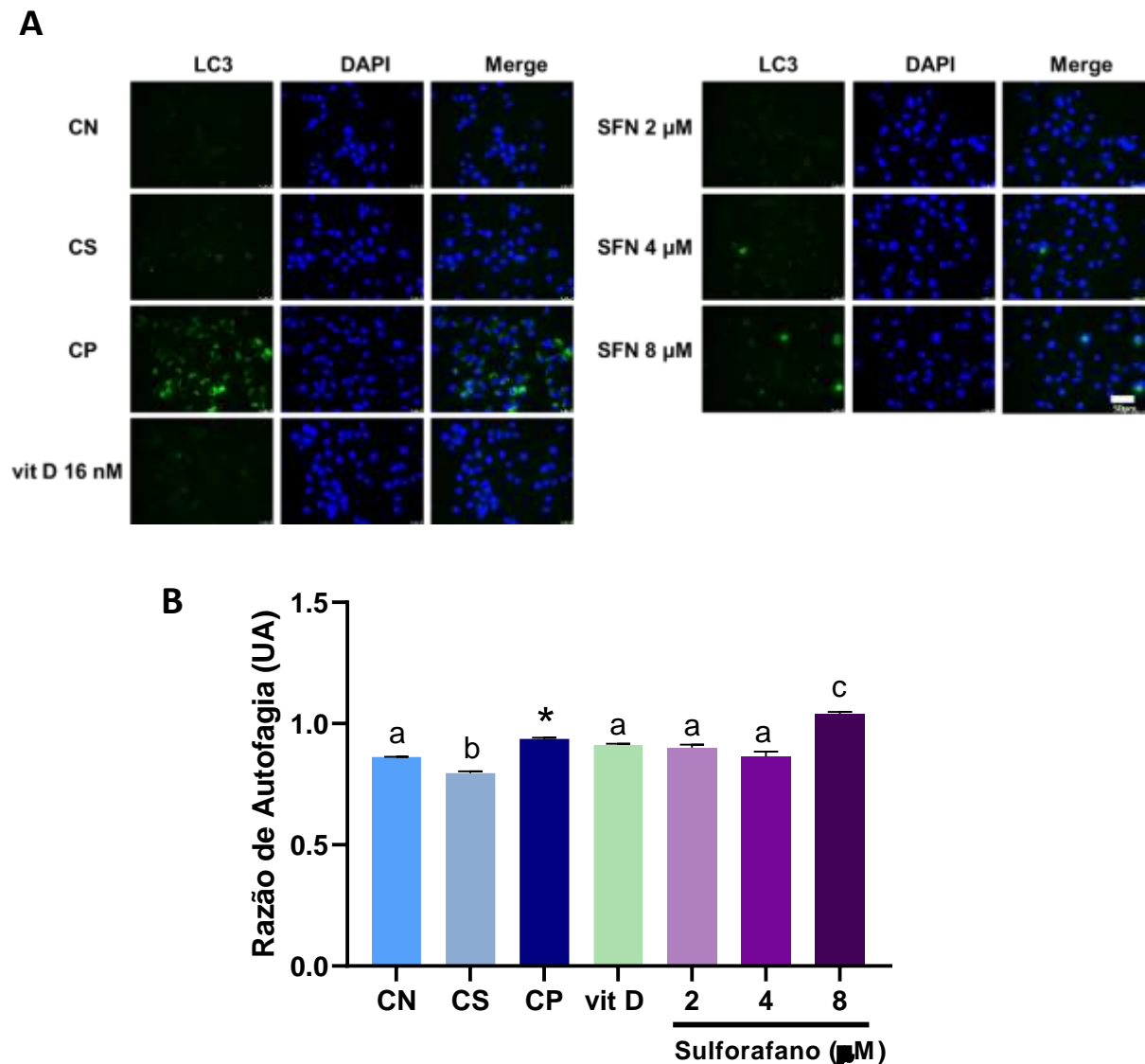
Os resultados do ensaio de autofagia mostram que sulforafano na concentração de 8  $\mu$ M induziu aumento de autofagia em células DU145 (Figura 28) e PC-3 (Figura 29) após 24 horas de tratamento. A vitamina D (16 nM) não induziu autofagia quando comparada ao controle negativo. O controle de solvente foi igual ao controle negativo em células DU145, no entanto, em células PC-3, o controle de solvente reduziu a autofagia em relação ao controle negativo. O controle positivo (cloroquina 100  $\mu$ M) foi diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ , teste t de Student).

**Figura 28.** Resultados da indução de autofagia em células DU145 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D



Indução de autofagia após 24 horas de tratamento isolado em células DU145. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: análise da indução de autofagia em tratamento isolado com sulforafano (SFN: 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) e vitamina D (vit D: 16 nM). CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%), CP: controle positivo (cloroquina 100  $\mu\text{M}$ ). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). \*Diferente do controle negativo (teste t de Student,  $p < 0,05$ ). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

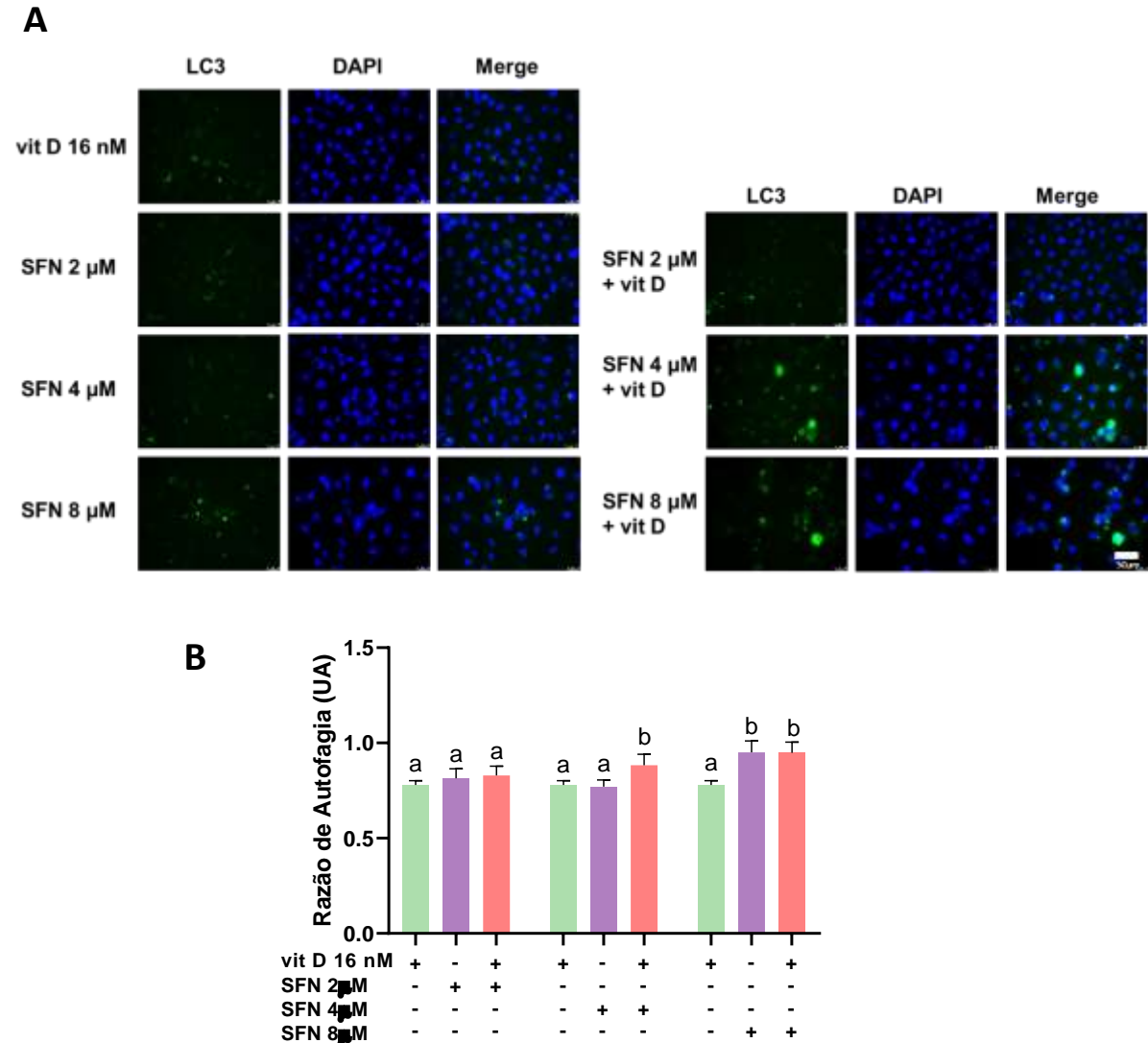
**Figura 29.** Resultados da indução de autofagia em células PC-3 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D



Indução de autofagia após 24 horas de tratamento isolado em células PC-3. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: análise da indução de autofagia em tratamento isolado com sulforafano (SFN: 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) e vitamina D (vit D: 16 nM). CN: controle negativo (PBS); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%), CP: controle positivo (cloroquina 100  $\mu\text{M}$ ). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). \*Diferente do controle negativo (teste t de Student,  $p < 0,05$ ). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

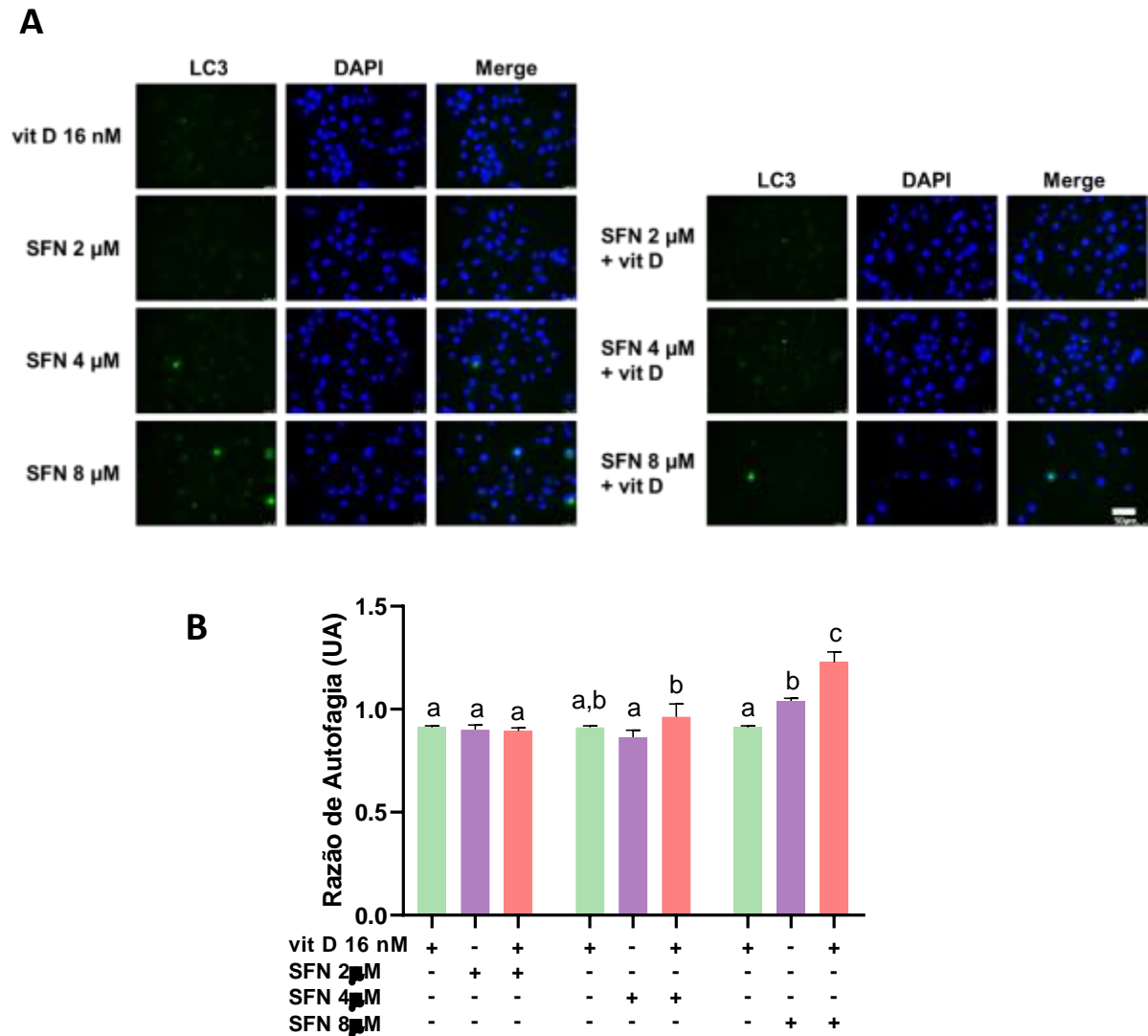
Após a associação de sulforafano (4  $\mu\text{M}$ ) e vitamina D (16 nM), houve um aumento na indução de autofagia em células DU145 quando comparado aos tratamentos com os compostos isolados (Figura 30). Em células PC-3, a associação de sulforafano (8  $\mu\text{M}$ ) e vitamina D (16 nM) foi diferente dos tratamentos isolados, demonstrando uma potencialização do efeito do sulforafano na indução de autofagia (Figura 31).

**Figura 30.** Resultados da indução de autofagia em células DU145 após 24 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D



Indução de autofagia após 24 horas de tratamento associado em células DU145. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: análise da indução de autofagia em tratamento associado com sulforafano (SFN: 2, 4 e 8 μM) e vitamina D (vit D: 16 nM). Média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way ANOVA-Tukey*,  $p < 0,05$ ). Barra de escala = 50 μm.

**Figura 31.** Resultados da indução de autofagia em células PC-3 após 24 horas de tratamento com sulforafano associado à vitamina D



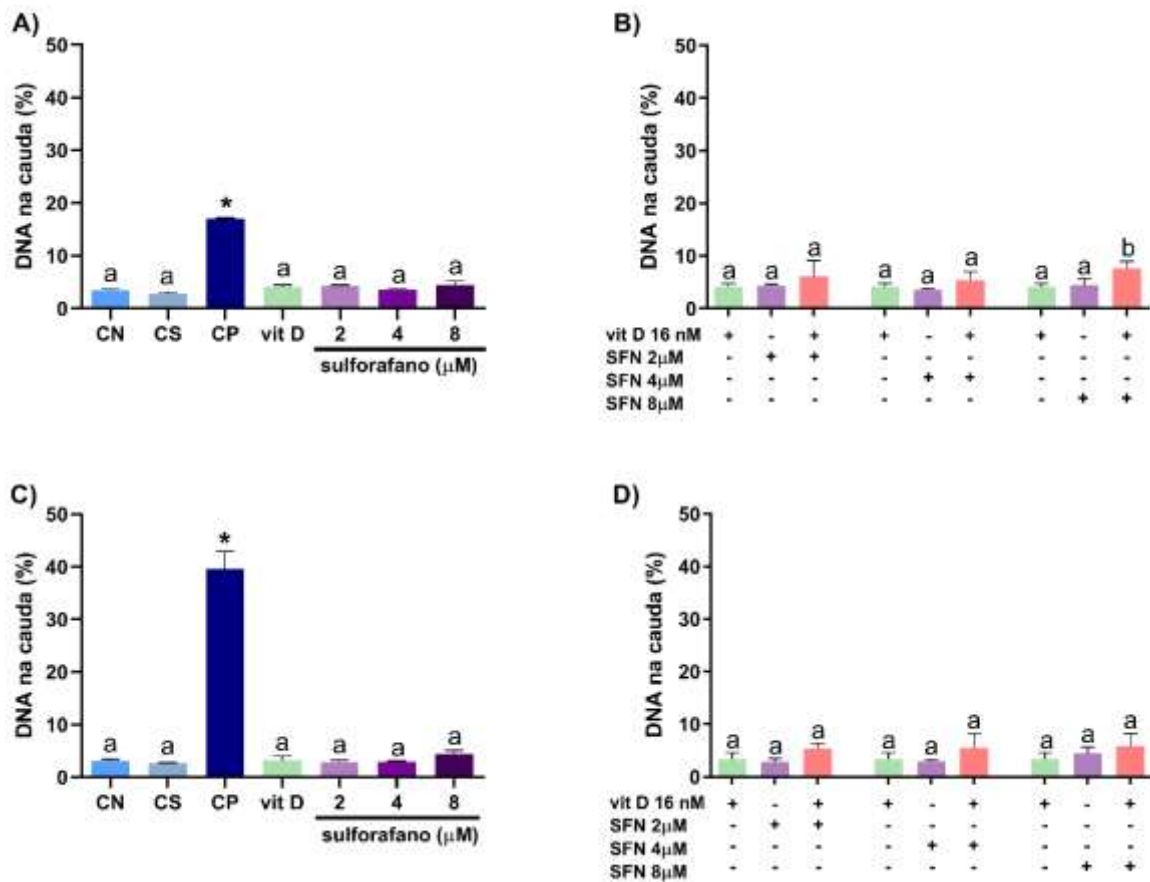
Indução de autofagia após 24 horas de tratamento associado em células DU145. A: fotomicrografia de autofagossomos marcados em verde e núcleos celulares marcados em azul. B: análise da indução de autofagia em tratamento associado com sulforafano (SFN: 2, 4 e 8 μM) e vitamina D (vit D: 16 nM). Média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0,05$ ). Barra de escala = 50 μm.

#### 4.12. Avaliar o dano no DNA por ensaio cometa

Nos resultados do ensaio cometa não foi observado aumento de danos no DNA de células DU145 (Figura 32.A) e PC-3 (Figura 32.C) tratadas com sulforafano (2, 4 ou 8 μM) e vitamina D (16 nM) em tratamento isolado. Os controles de solvente foram iguais aos controles negativos e o controle positivo foi significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ , teste t de student). Em células DU145, houve um aumento de danos no DNA de células tratadas com a associação de sulforafano (8 μM) e

vitamina D (16 nM) quando comparado aos tratamentos isolados (Figura 32.B). Em células PC-3 não houve efeito significativo de nenhum dos tratamentos associados em relação aos tratamentos isolados (Figura 32.D).

**Figura 32.** Resultados do dano no DNA por ensaio cometa em células DU145 (A e B) e PC-3 (C e D) após tratamento de 24 horas com sulforafano e/ou vitamina D



Porcentagem de DNA na cauda de células DU145 (A) e PC-3 (C) após tratamento com vitamina D ou sulforafano por 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (*one-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). \* Diferente do controle negativo (Teste *t* de Student,  $p < 0.05$ ). Porcentagem de células DU145 (B) e PC-3 (D) após tratamento com vitamina D associada ao sulforafano por 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro de um mesmo grupo (*two-way* ANOVA-Tukey,  $p < 0.05$ ). CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); CP: controle positivo (MMS 150  $\mu$ M); SFN: sulforafano; vit D 16 nM: vitamina D 16 nM. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

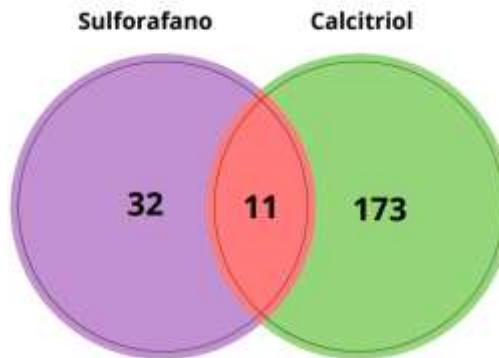
#### 4.13. Predição de proteínas alteradas por sulforafano e calcitriol

Utilizando o sistema de inferência ChemDIS, foi possível observar que sulforafano e calcitriol possuem 11 proteínas com interação predita em comum (Figura 33). Dessas, 6 (grifadas em amarelo) foram selecionadas para serem testadas na



análise de expressão gene/proteína após o tratamento com a associação dos compostos.

**Figura 33.** Resultado da análise de predição de proteínas alteradas por sulforafano e calcitriol utilizando o ChemDIS.



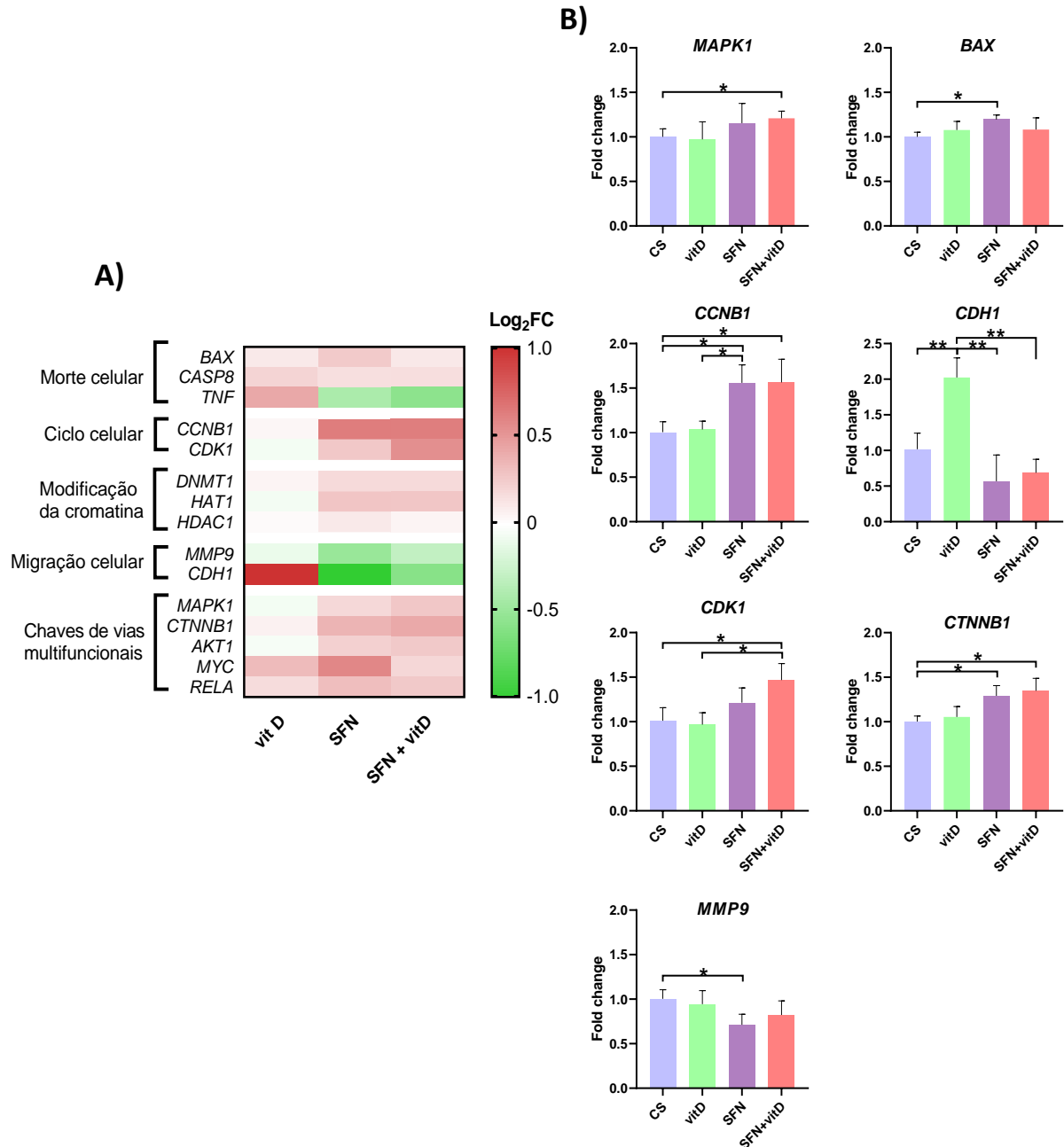
Protein	Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene name	Score 1	Score 2
ENSP00000311032	SCA-1	836	caspace 3	0.947	0.953
ENSP00000229794	RK	1432	mitogen-activated protein kinase 14	0.943	0.7
ENSP00000337915	NF-25	1576	cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4	0.824	0.959
ENSP00000398698	TNF	7124	tumor necrosis factor	0.818	0.868
ENSP00000361405	MMP9	4318	matrix metalloproteinase 9	0.8	0.824
ENSP00000282561	HLHS1	2697	gap junction protein alpha 1	0.8	0.8
ENSP00000270202	AKT1	207	AKT serine/threonine kinase 1	0.745	0.84
ENSP00000353483	MAPK8	5599	mitogen-activated protein kinase 8	0.743	0.733
ENSP00000263025	ERK-1	5595	mitogen-activated protein kinase 3	0.724	0.728
ENSP00000267163	pp110	5925	RB transcriptional corepressor 1	0.7	0.759
ENSP00000215832	p41	5594	mitogen-activated protein kinase 1	0.7	0.7

Fonte: ChemDIS (<https://cwtung.kmu.edu.tw/chemdis>)

#### 4.14. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Em células DU145, foram observados 7 genes com expressão alterada após os tratamentos isolados ou associados ( $p < 0,05$ ), *MAPK1*, *CCNB1*, *BAX*, *CDH1*, *CDK1*, *CTNNB1* e *MMP9*. *MAPK1* e *CDK1* foram mais expressos no tratamento associado. *CCNB1* e *CTNNB1* tiveram a expressão aumentada no tratamento com sulforafano e associado. *BAX* foi mais expresso e *MMP9* menos expresso no tratamento com sulforafano. O tratamento com vitamina D aumentou significativamente a expressão de *CDH1* (Figura 34).

**Figura 34.** Resultado da análise de expressão gênica de células DU145 após tratamento com sulforafano e vitamina D por RT-qPCR.



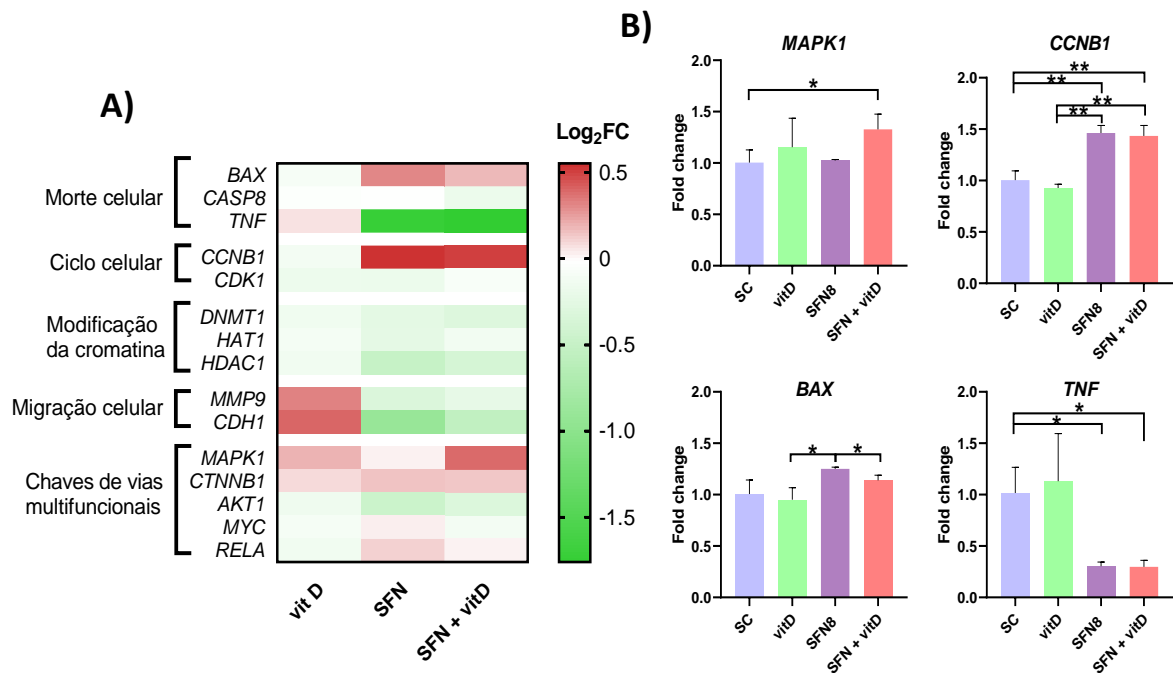
A: Heatmap da expressão dos genes analisados em células DU145 após 24 horas de tratamento isolado e associado de vitamina D (vit D 16nM) e sulforafano (SFN 8  $\mu$ M). B: Fold change dos genes que apresentaram diferença significativa na análise estatística (teste *t* de Student, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

Após o tratamento associado com sulforafano e vitamina D, 4 genes tiveram a expressão significativamente alterada em células PC-3 quando comparado ao



controle ou aos compostos isolados ( $p < 0,05$ ), *MAPK1*, *CCNB1*, *BAX* e *TNF*. *MAPK1* foi mais expresso no tratamento associado e *CCNB1* teve a expressão aumentada no tratamento com sulforafano e associado. *BAX* foi mais expresso no tratamento com sulforafano e *TNF* teve menor expressão no tratamento com sulforafano e associado (Figura 35).

**Figura 35.** Resultado da análise de expressão gênica de células PC-3 após tratamento com sulforafano e vitamina D por RT-qPCR.



A: *Heatmap* da expressão dos genes analisados em células PC-3 após 24 horas de tratamento isolado e associado de vitamina D (vit D 16nM) e sulforafano (SFN 8  $\mu\text{M}$ ). B: *Fold change* dos genes que apresentaram diferença significativa na análise estatística (teste *t* de Student, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

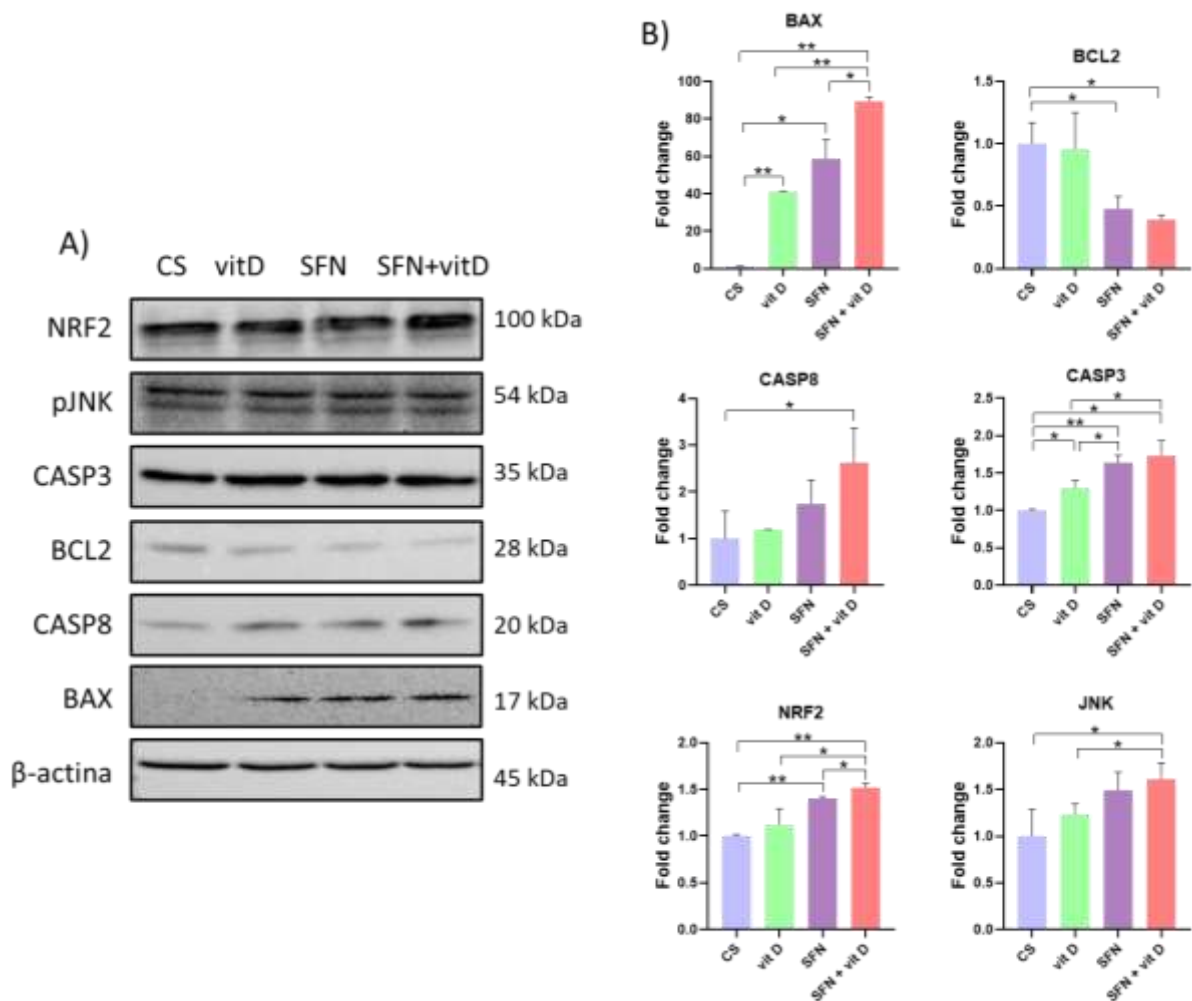
#### 4.15. Análise da expressão de proteínas por western blot

Em células DU145, comparando os tratamentos associados com o controle, foi observado aumento da expressão de BAX, CASP8, CASP3, NRF2 (NFE2L2) e JNK (MAPK8), e diminuição da expressão de BCL2. A expressão de BAX e NRF2 também foi maior no tratamento associado quando comparado aos tratamentos isolados, indicando um possível efeito sinérgico na modulação da expressão dessas proteínas (Figura 36).

Os resultados da análise de proteínas em células PC-3 demonstraram que houve aumento na expressão de BAX e NRF2 (NFE2L2), e diminuição da expressão

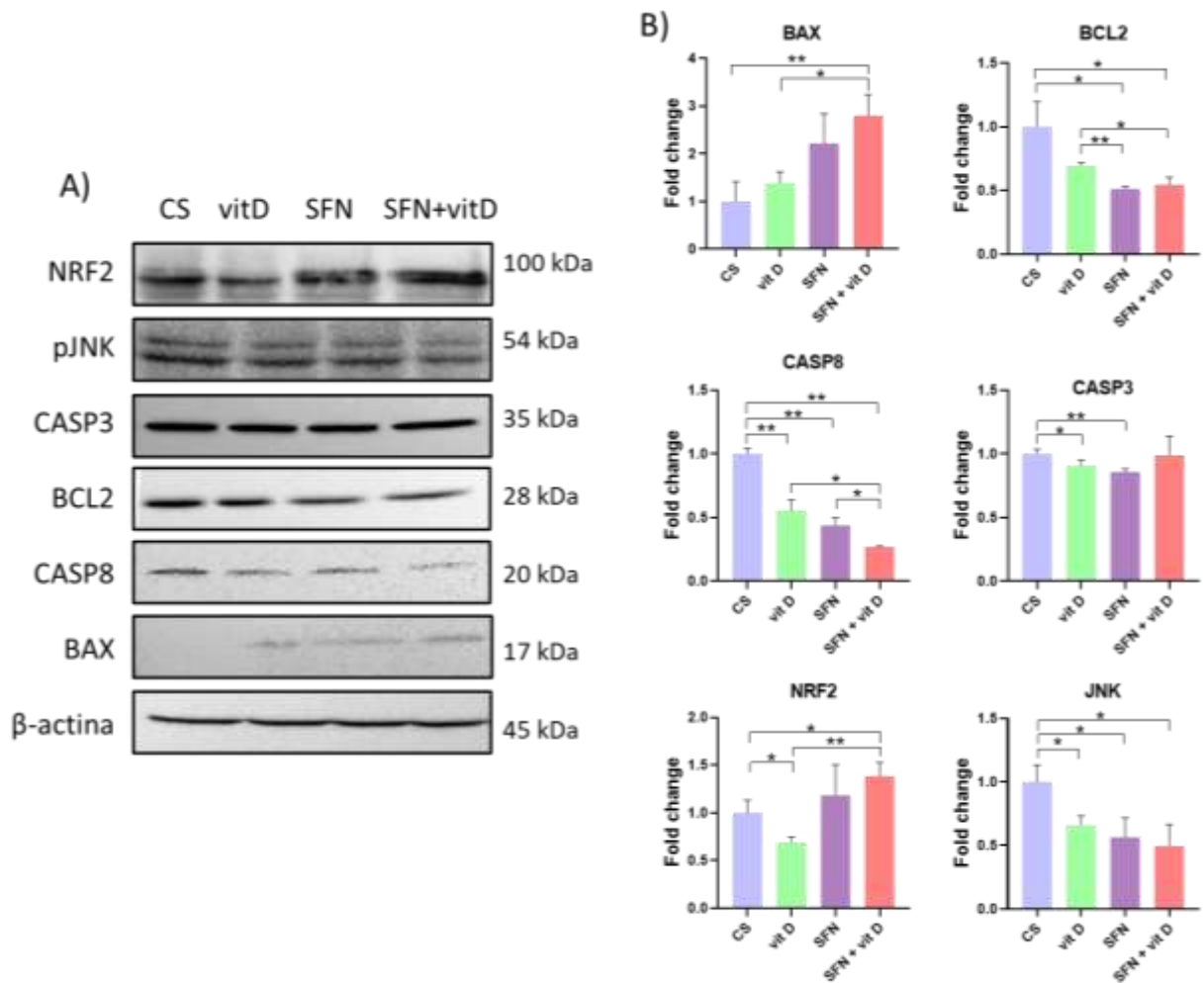
de BCL2, CASP8 e JNK (MAPK8) nos tratamentos associados em comparação ao controle. A expressão de CASP8 foi significativamente menor em tratamento associado em relação aos tratamentos isolado, sugerindo possível efeito sinérgico (Figura 37).

**Figura 36.** Resultado da análise de expressão de proteínas de células DU145 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D por western blot.



A: Representação das bandas das proteínas analisadas por *western blot*. B: *Fold change* da quantificação das bandas de proteína utilizando o ImageJ. CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); SFN: sulforafano (8 $\mu$ M); vit D: vitamina D (16 nM).  $\beta$ -actina foi utilizado como controle endógeno. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  (Teste *t* de Student,). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

**Figura 37.** Resultado da análise de expressão de proteínas de células PC-3 após 24 horas de tratamento com sulforafano e vitamina D por *western blot*.

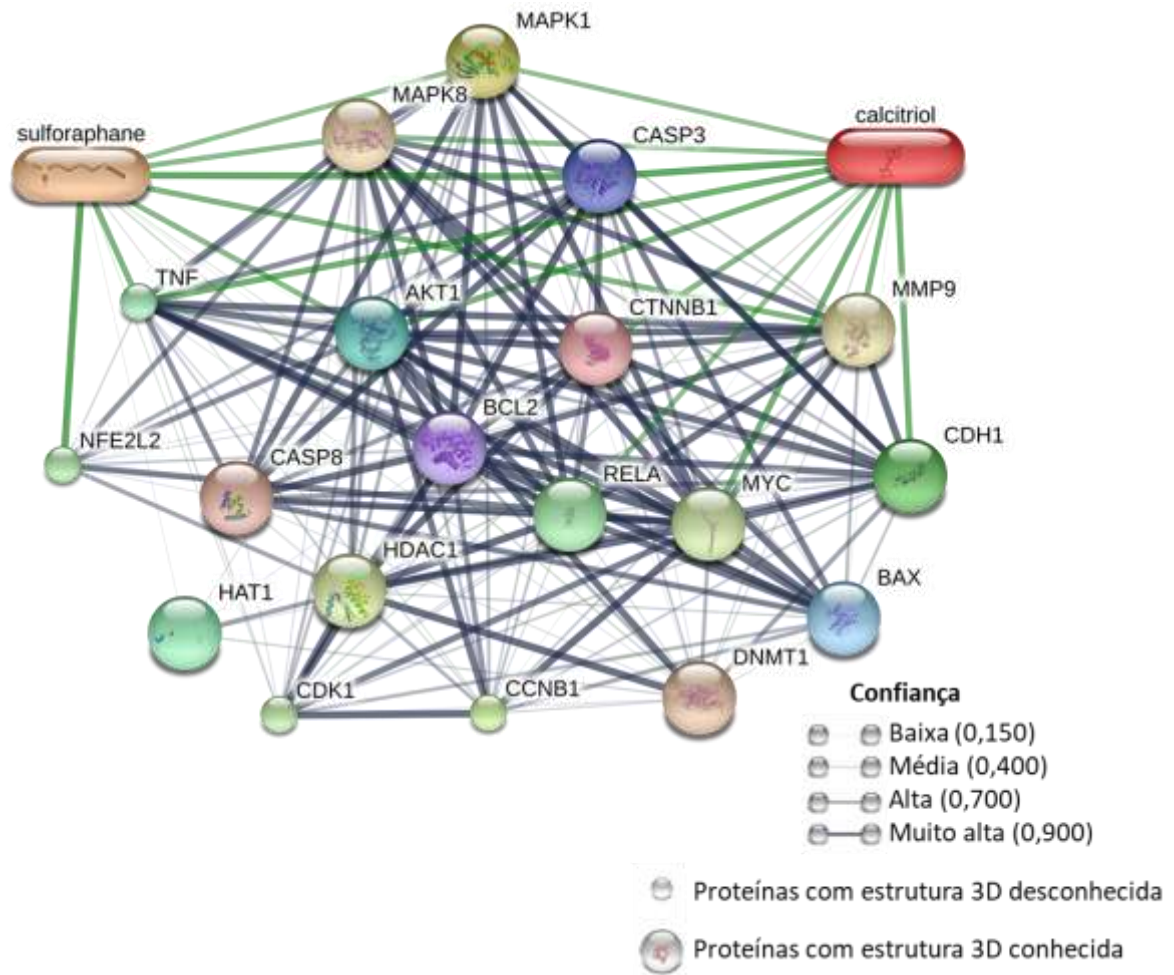


A: Representação das bandas das proteínas analisadas por western blot. B: *Fold change* da quantificação das bandas de proteína utilizando o ImageJ. CS: controle de solvente (DMSO 0,2% + EtOH 0,2%); SFN: sulforafano (8 $\mu$ M); vit D: vitamina D (16 nM).  $\beta$ -actina foi utilizado como controle endógeno. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 (Teste *t* de Student,). Média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

#### 4.16. Análise da rede de interação entre os compostos e genes/proteínas estudadas

A rede de interações preditas construída utilizando a base de dados STITCH demonstrou que as interações entre os compostos, genes e proteínas estudadas formam um grupo biologicamente conectado (Figura 38), apresentando mais interações do que o esperado (observadas/esperadas 151/75) (p<0,001), com coeficiente de agrupamento igual a 0,947, e vias de sinalização em câncer, sinalização do TNF, regulação de morte celular programada e processo apoptótico dentre as vias mais representadas (<http://stitch.embl.de/cgi/network.pl?taskId=bZ5eRbMyFpk>).

**Figura 38.** Rede de interações preditas entre sulforafano, vitamina D, genes e proteínas analisadas no presente estudo utilizando a base de dados STITCH.



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

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

## 5. Discussão

O câncer de próstata é o segundo mais incidente e a quinta causa de morte por câncer em homens no mundo (SUNG *et al.*, 2021). Pacientes com a doença respondem inicialmente à terapia, mas o tumor eventualmente progride para formas mais agressivas (FONTANA *et al.*, 2020). Embora as terapias convencionais sejam bastante eficazes, a progressão para metástase, toxicidades associadas à terapia e problemas relacionados à eficácia se desenvolvem ao longo do tempo. Assim, novas estratégias terapêuticas não tóxicas e eficazes são necessárias, destacando o potencial dos nutracêuticos como potentes agentes anticâncer (REED; RAINA; AGARWAL, 2018).

Após o diagnóstico de câncer, muitos pacientes recorrem à suplementação com nutracêuticos, buscando algum benefício à saúde, no entanto, certos suplementos podem inibir ou alterar o metabolismo de agentes terapêuticos, influenciando na sua eficácia. Por outro lado, alguns compostos naturais, sozinhos ou em associação com a dieta, podem auxiliar na quimioprevenção, inibindo os estágios iniciais da carcinogênese e de metástases (CALVANI; PASHA; FAVRE, 2020). Muitos ensaios clínicos foram realizados para testar a eficácia de nutracêuticos em pacientes, e confirmaram parcialmente os resultados promissores obtidos em modelos pré-clínicos (FONTANA *et al.*, 2020).

As evidências crescentes de estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que os bioativos da dieta podem modular várias vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer, assim, as associações desses compostos podem promover a morte celular, inibir a proliferação e invasão celular, sensibilizar as células tumorais e estimular o sistema imunológico (RIZEQ *et al.*, 2020).

Di Nunzio *et al.* (2017) demonstraram a importância de se avaliar os efeitos sobre a viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro* de bioativos da dieta em concentrações próximas as plasmáticas, e consideram obrigatória a realização desses ensaios antes dos estudos para análise dos efeitos de bioativos em outros parâmetros celulares.

Dentre os testes que investigam a viabilidade celular de substâncias *in vitro*, o mais amplamente utilizado é o ensaio do MTT descrito por Mosmann (1983). Nesse ensaio, o sal de MTT que possui coloração amarela, é reduzido pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase de células viáveis a cristais de formazan, de cor púrpura. Logo, a quantidade de cristais produzida é proporcional à atividade metabólica das

células avaliadas (MOSMANN, 1983). Todavia, muitos trabalhos têm relatado resultados falso-positivos com o uso deste método, já que o sal de MTT pode ser reduzido por outros tipos de substâncias, como os flavonoides (CHAN *et al.*, 2013; MAIOLI *et al.*, 2009; WANG; HENNING; HEBER, 2010), e por diferentes organelas celulares, como membrana plasmática, mitocôndrias, endossomos e lisossomos. Sob microscopia confocal foi demonstrado que a localização da maioria dos depósitos de formazan visualizados não são coincidentes com a das mitocôndrias (STOCKERT *et al.*, 2018). Deste modo, é necessário que a avaliação da viabilidade celular seja realizada utilizando-se mais de um ensaio e, conseqüentemente, avaliando-se mais de um parâmetro.

Devido às limitações apresentadas pelo ensaio do MTT, também foi realizado o ensaio do vermelho neutro, baseado na incorporação do corante vermelho neutro por células viáveis. Este corante penetra na membrana celular por difusão passiva e se deposita nos lisossomos, se ligando à sua matriz. O corante é extraído das células utilizando-se solução de etanol acidificada e a absorbância é medida em espectrofotômetro. O parâmetro analisado por este ensaio é a integridade dos lisossomos, que possuem pH menor do que o do citoplasma. Assim, o corante entra no lisossomo e se mantém dentro dele. Quando a célula perde a capacidade de manter os diferentes gradientes de pH, o corante não pode ser retido. Entretanto, do mesmo modo que o ensaio do MTT, este ensaio também possui limitações, pois substâncias voláteis, instáveis ou com baixa solubilidade não são passíveis de avaliação por esse método (REPETTO; PESO; ZURITA, 2008). Diante do exposto, sugere-se o uso em conjunto de metodologias que avaliem a viabilidade celular de substâncias por meio de diferentes parâmetros como o procedimento mais indicado para evitar resultados falso-positivos.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando-se o ensaio LIVE/DEAD com a associação dos corantes calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1), permitindo uma definição mais específica da viabilidade, visto que o uso de apenas um corante pode gerar resultados ambíguos, principalmente quando ocorre permeabilidade da membrana celular após o tratamento. O EthD-1 é um corante que só consegue permear e marcar células mortas ou com danos à membrana celular. A calceína AM marca células com membranas intactas capazes de retê-la no citoplasma, mas se difunde para fora da célula quando há dano na membrana (JOHNSON; NGUYEN; CODER, 2013).

Para o estudo da atividade biológica *in vitro* de bioativos da dieta, é importante que sejam selecionadas concentrações correspondentes à maior concentração fisiológica encontrada no plasma, pois a biodisponibilidade destas substâncias são um fator limitante em sua administração em humanos (DI NUNZIO *et al.*, 2017; TORTORELLA *et al.*, 2015). O tempo de exposição é outro fator que deve ser levado em consideração, portanto, no presente estudo o tempo de tratamento inicial de 72 horas foi escolhido, visto que a remoção dos metabólitos de sulforafano no plasma ocorre 72 horas após a ingestão de brócolis em humanos (SHAPIRO *et al.*, 1998).

Considerando as recomendações citadas acima, no presente estudo foram selecionadas inicialmente concentrações máximas de vitamina D (2, 4, 8, 16 e 32 nM) e sulforafano (1, 2, 4, 8 e 16  $\mu$ M) próximas às concentrações plasmática descritas na literatura para serem testadas quanto a viabilidade celular após 72 horas de tratamento em células DU145 e PC-3.

O sulforafano demonstrou resultados semelhantes para as duas linhagens no ensaio do MTT, com diminuição da viabilidade celular em concentrações a partir de 2  $\mu$ M. No entanto, no ensaio do vermelho neutro, ele exibiu redução da viabilidade maior em células PC-3 ( $\geq 4 \mu$ M) quando comparado as células DU145 ( $\geq 8 \mu$ M), sugerindo que o sulforafano atinge o metabolismo celular de maneira semelhante nas duas linhagens, enquanto a integridade dos lisossomos é mais afetada em células PC-3 do que em células DU145.

Como a linhagem PC-3 tem origem em um sítio metastático de osso, a descoberta de substâncias que possam agir de maneira seletiva para esta linhagem tem grande relevância para os casos de câncer de próstata em estágios avançados, uma vez que metástases esqueléticas ocorrem em mais de 80% dos casos de câncer de próstata em estágio avançado e conferem um alto nível de morbidade (STURGE; CALEY; WAXMAN, 2011).

Quando comparados os resultados obtidos com os dois tipos celulares utilizados em ensaio de MTT, observou-se que a vitamina D diminuiu a viabilidade somente em células PC-3, com redução da viabilidade celular de até 12% na concentração de 32 nM. Estes resultados corroboram os de Zhuang *et al.* (1997), que observaram diminuição da proliferação celular (menos de 10%) de PC-3 após tratamento com 10 nM de vitamina D por 96 horas, no entanto, os autores também encontraram esta mesma resposta para células DU145.

Em ensaio de vermelho neutro a vitamina D demonstrou diminuição da viabilidade em torno de 25% em PC-3 (32 nM) após 72 horas de tratamento, corroborando os achados de Sha *et al.* (2013) que observaram até 25% de inibição do crescimento celular em PC-3 após exposição à vitamina D por 96 horas.

Há muito tempo já foi demonstrado que as células tumorais de próstata (DU145, PC-3 e LNCaP) expressam o receptor de vitamina D (VDR) (SKOWRONSKI; PEEHL; FELDMAN, 1993). Em células que apresentam VDR, a enzima CYP24A1 tem como papel principal limitar ou atenuar a ação de calcitriol nas células. A expressão de CYP24A1 é induzida pelo próprio calcitriol, isto sugere que o aumento de calcitriol em células alvo poderia desencadear o catabolismo mediado por CYP24A1 e então proteger as células do excesso de ativação da via VDR (JONES; PROSSER; KAUFMANN, 2012). Por isto, a superexpressão de CYP24A1 em células tumorais pode ser um fator que afeta a biodisponibilidade de calcitriol e sua atividade antiproliferativa pré-clínica e clínica (LUO *et al.*, 2013). O promotor de CYP24A1 é hipermetilado em linhagens LNCaP e PC-3 que apresentam baixa expressão de CYP24A1, enquanto em células DU145 o promotor é completamente não metilado, promovendo alta expressão de CYP24A1 (LUO *et al.*, 2010). Juntos, estes dados podem ajudar a justificar o maior efeito citotóxico da vitamina D em células PC-3.

Outros trabalhos têm mostrado inibição do crescimento celular em concentrações muito além daquelas já encontradas no plasma humano. Os resultados de Li *et al.* (2015) apontam até 100% de inibição do crescimento em células DU145 tratadas com a vitamina D (2000 nM) por 72 horas, e Wang *et al.* (2012) encontraram redução da viabilidade celular pelo ensaio do MTT em células tumorais de esôfago (EC9706) tratadas com vitamina D (40-160  $\mu$ M) por 48 horas. Entretanto, em estudo sobre a farmacocinética de calcitriol em pacientes, foi determinada a máxima dose tolerada (MTD) com pico de concentração plasmática em torno de 12 ng/mL (aproximadamente 30 nM), demonstrando a recuperação dos níveis plasmáticos normais dentro de 72 horas após exposição ao calcitriol (MUINDI *et al.*, 2009). De acordo com os resultados apresentados por Miundi *et al.* (2009), foram estabelecidos os parâmetros do presente estudo, e concentrações muito acima da MTD não correspondem com a realidade clínica observada em humanos.

Na avaliação do sulforafano, o ensaio do MTT demonstrou maior redução da viabilidade celular quando comparado ao ensaio do vermelho neutro. Enquanto a vitamina D reduziu a viabilidade de DU145 por ensaio de vermelho neutro, não



apresentando efeito no ensaio do MTT. Isto pode ser devido aos diferentes mecanismos de ação específicos de cada composto testado, já que cada ensaio estima a viabilidade celular por um parâmetro distinto. O tipo da linhagem celular também influencia no desempenho dos ensaios de viabilidade. Portanto, é recomendável a aplicação de mais de um ensaio para avaliação da viabilidade celular (KAMILOGLU *et al.*, 2020).

A partir dos resultados do presente estudo e dos achados na literatura, foi testada a associação da vitamina D ao sulforafano com o objetivo de se verificar a ocorrência de um possível efeito sinérgico para células humanas tumorais de próstata, DU145 e PC-3. Existem três possíveis tipos de interações para substâncias que são administradas em conjunto: (1) as farmacodinâmicas, que geralmente resultam da associação de duas substâncias com mecanismos de ação similares e podem resultar em uma redução na eficácia (antagonismo), um aumento na toxicidade de uma ou ambas (toxicidade sinérgica), ou um efeito anteriormente não observado e que não está relacionado a nenhuma das substâncias (efeito coalístico) (BULUSU *et al.*, 2016). Mas, quando apenas uma das substâncias é ativa e o efeito da associação for maior, é chamado de “potencialização” (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015); (2) as farmacocinéticas, que ocorrem quando uma das substâncias altera a absorção, distribuição, metabolismo e/ou excreção da outra; (3) e as farmacêuticas, que acontecem quando duas substâncias física ou quimicamente incompatíveis interagem, resultando na inativação de uma ou ambas (BEIJNEN; SCHELLENS, 2004).

A fim de se observar uma possível interação entre sulforafano e vitamina D foi realizado o ensaio de MTT em células DU145 e PC-3 após incubação simultânea com os dois bioativos por 72 horas. No entanto, as respostas obtidas pela associação das duas substâncias na viabilidade celular foram iguais às respostas exibidas por sulforafano avaliado individualmente. Desse modo, a associação da vitamina D ao sulforafano não provocou alteração na viabilidade de células tumorais de próstata, não demonstrando efeito sinérgico nem antagônico decorrente da associação dos compostos.

Apesar de não encontrar interação entre sulforafano e vitamina D que pudesse diminuir a viabilidade celular além do efeito observado com sulforafano após tratamento simultâneo, em alguns casos, protocolos de tratamento sequenciais podem apresentar melhores resultados (AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012).

Portanto, testamos o efeito da associação de sulforafano e vitamina D em protocolos de pré e pós-tratamento nas células tumorais de próstata utilizando ensaio de MTT. Contudo, as respostas apresentadas foram as mesmas observadas em tratamento simultâneo.

No presente estudo, sulforafano (2, 4 e 8  $\mu\text{M}$ ) e vitamina D (16 nM) foram testados em células não tumorais de pele (HaCaT) em ensaio de MTT, mas não encontramos efeitos diferentes dos apresentados pelas linhagens tumorais de próstata. A associação dos nutracêuticos em tratamento simultâneo também não diminuiu a viabilidade celular quando comparado ao tratamento isolado com sulforafano, assim como em células DU145 e PC-3. Clarke *et al.* (2011) testaram sulforafano em células normais e tumorais de próstata, e observaram atividade citotóxica e antiproliferativa seletiva de sulforafano em células tumorais. Hac *et al.* (2020) demonstraram que sulforafano foi seletivamente antiproliferativo para células PC-3 em relação às células normais de fibroblasto dermal (HDFa). Embora sulforafano não tenha apresentado atividade seletiva sobre a viabilidade celular comparando células tumorais de próstata com HaCaT, os resultados da literatura são promissores quanto ao seu efeito seletivo.

Com o ensaio LIVE/DEAD foi possível observar que, em células DU145, as concentrações de sulforafano de 4 e 8  $\mu\text{M}$  foram citotóxicas após 72 horas de tratamento, enquanto em células PC-3, somente a concentração de 8  $\mu\text{M}$  induziu morte celular. Após testar a associação em protocolo de tratamento simultâneo, os resultados mostraram que a vitamina D potencializou o efeito do sulforafano, aumentando sua citotoxicidade em relação ao tratamento com sulforafano isolado em ambas as linhagens.

Em estudos de outras associações entre sulforafano e diferentes bioativos da dieta, foi notado tanto efeito sinérgico como antagônico. As associações de sulforafano:diindolilmetano (2,5 a 20  $\mu\text{M}$ ) parecem inibir a proliferação de células tumorais de cólon (40-16 derivadas de HCT116) de maneira antagônica, enquanto as associações em concentrações citotóxicas de 40  $\mu\text{M}$  ou mais, atuam de maneira sinérgica (PAPPA *et al.*, 2007). Chen *et al.* (2013) também observaram estes efeitos ao associar diversas concentrações de sulforafano (7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$ ) à epigallocatequina galato (5, 10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ), com a associação sulforafano:epigallocatequina galato (10:20  $\mu\text{M}$ ) demonstrando melhor efeito. Ainda, Jiang *et al.* (2010) associaram sulforafano (25  $\mu\text{M}$ ) a resveratrol (25  $\mu\text{M}$ ) e verificaram

um aumento do efeito antiproliferativo de sulforafano em células de glioma (U251). Ao observarmos os resultados descritos na literatura, notamos a utilização de concentrações maiores aquelas investigadas no presente estudo, indicando que a associação de sulforafano à vitamina D poderia apresentar melhores resultados em concentrações maiores, embora concentrações muito elevadas não sejam clinicamente relevantes devido à limitação da biodisponibilidade dos compostos.

No presente estudo, sulforafano (8  $\mu\text{M}$ ) induziu aumento de células apoptóticas, inibição da atividade clonogênica e parada de ciclo celular em DU145 (fase S e G2) e PC-3 (fase G2). Sulforafano e seus metabólitos parecem inibir o crescimento de muitos tipos de câncer e os mecanismos de ação pelos quais esses induzem citotoxicidade têm sido amplamente estudados (BERNKOPF *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2016; PAWLIK *et al.*, 2013; TSAI; TSAI; WU, 2019). Assim, os dados na literatura demonstram que sulforafano induz ativação de caspases, expressão elevada de BAX, clivagem de PARP e condensação de cromatina nuclear (BERGANTIN *et al.*, 2014; JO, G. H. *et al.*, 2014; MONDAL *et al.*, 2016).

Seus metabólitos, sulforafano-cisteína e sulforafano-N-acetil-cisteína, podem desencadear o desequilíbrio dinâmico e a ruptura de microtúbulos, levando a apoptose as células DU145 e PC-3 (ZHOU *et al.*, 2018). Em células de hepatocarcinoma (HepG2), sulforafano induziu morte celular por apoptose, inibição da atividade clonogênica, parada do ciclo celular (fase G2/M) e danos no DNA, modulando as vias MAPK e AKT (SANTOS, P. W. S *et al.*, 2020). Ainda foi relatado um incremento nas proteínas associadas ao estresse do retículo endoplasmático causado pelo sulforafano, relacionando seu efeito pró-apoptótico à ativação dessas vias de sinalização e à modulação do ciclo celular, agindo em reguladores chave, tais como ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e inibidores de CDKs de uma maneira dependente do tipo celular, dose e tempo de tratamento, induzindo a parada do ciclo celular nas fases G1, S e G2/M (RUSSO *et al.*, 2018).

Sulforafano e seus metabólitos inibiram a migração de células tumorais de pulmão (A549) (RAKARIYATHAM *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2019) e induziram danos no DNA de células de osteosarcoma (MG-63) (OLIVEIRA *et al.*, 2014a), hepatocarcinoma (HepG2) (SANTOS, P. W. S. *et al.*, 2020) e câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e SK-BR-3) (LEWINSKA *et al.*, 2017). Apesar dos dados da literatura apresentarem diminuição da migração celular e aumento de dano no DNA, não encontramos os mesmos resultados utilizando as concentrações de 2, 4 e 8  $\mu\text{M}$  de

sulforafano em células tumorais de próstata. No entanto, quando associados, houve um aumento dos danos no DNA em células DU145.

A possível interação entre sulforafano e vitamina D foi testada quanto a indução de morte por apoptose, diminuição da atividade clonogênica, modulação do ciclo celular e inibição da migração. Os resultados observados na associação dos nutracêuticos foram iguais aos encontrados para sulforafano isolado. Desse modo, a associação da vitamina D ao sulforafano não aumentou seu efeito anticâncer em células tumorais de próstata, indicando que não houve efeito sinérgico e nem antagônico após o tratamento associado. Considerando que o sulforafano não perdeu sua atividade após o tratamento simultâneo com vitamina D, é possível supor que não houve interação farmacêutica, portanto, a vitamina D não foi capaz de inativar o sulforafano.

A autofagia é um processo intracelular no qual os constituintes celulares são englobados por autofagossomos e degradados após a fusão do autofagossomo com os lisossomos. A autofagia serve como um importante processo citoprotetor, mantendo a homeostase celular e reciclando o conteúdo citoplasmático. No entanto, evidências recentes sugerem que a autofagia é um mecanismo primário de morte celular, podendo implicar em diversos aspectos fisiológicos em mamíferos, incluindo supressão tumoral. Em células tumorais, foi observada a indução de morte autofágica por agentes indutores de espécies reativas de oxigênio (JUNG; JEONG; YU, 2020).

A relação da autofagia na morte celular pode ser definida como: (i) morte celular associada à autofagia, onde a indução da autofagia coincide com a indução da apoptose (ou outras vias de morte celular), e a autofagia acompanha o processo de morte celular mas não tem papel ativo nele; (ii) morte celular mediada por autofagia, quando a indução de autofagia provoca a apoptose; e (iii) morte celular dependente de autofagia, que representa um mecanismo de morte celular independente de apoptose ou necrose (DENTON; KUMAR, 2019).

Após o tratamento com sulforafano, foi possível observar aumento da atividade autofágica nas duas linhagens de câncer de próstata. Sulforafano já havia demonstrado indução de autofagia em células tumorais de próstata PC-3 e LNCaP (HERMAN-ANTOSIEWICZ; JOHNSON; SINGH, 2006). Os efeitos citotóxicos e a indução de autofagia dependente de estresse oxidativo também foram observados em células de câncer e pâncreas (NAUMANN *et al.*, 2011) e células neuronais (JO, C. *et al.*, 2014). E o metabólito sulforafano-N-acetil-cisteína induziu autofagia por meio da

ativação de ERK1/2 (MAPK1) em células de glioma U87MG e U373MG (LIU *et al.*, 2018).

A vitamina D não induziu autofagia em tratamento isolado, no entanto, em tratamento associado a indução de autofagia foi maior que no tratamento isolado com sulforafano na concentração de 4  $\mu\text{M}$  em células DU145 e de 8  $\mu\text{M}$  em células PC-3. A associação de sulforafano com vitamina D em camundongos obesos inibiu a atividade de histona desacetilase e ativou a indução de autofagia (LI *et al.*, 2019). Esses resultados sugerem que a vitamina D pode potencializar o efeito do sulforafano quanto a indução de morte celular associado à autofagia, uma vez que houve aumento da autofagia, mas não dá apoptose após o tratamento associado em DU145 e PC-3.

Embora a maioria dos compostos bioativos da dieta possua capacidade antioxidante em baixas doses, em altas doses podem induzir atividade pró-oxidante, levando ao aumento nas concentrações de espécies reativas intracelulares (NAVANEETHAKRISHNAN; ROSALES; LEE, 2019). A regulação das concentrações de espécies reativas é crucial para a manutenção celular. Quando as concentrações estão moderadas, contribuem para o controle da proliferação e diferenciação celular. Se a produção de espécies reativas aumentar ou a capacidade de eliminá-las diminuir, as células passarão por um estresse oxidativo. Essa condição pode causar diversos danos e morte das células, assim, uma estratégia anticâncer alternativa é uso de inibidores de enzimas antioxidantes ou agentes capazes de aumentar a produção de espécies reativas para provocar a morte de células tumorais (PERILLO *et al.*, 2020)

Para determinar a produção de espécies reativas, foi utilizado o marcador CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Esse marcador se difunde passivamente pelo interior das células, onde é convertido em uma forma não fluorescente (CM-H<sub>2</sub>DCF) pela ação de esterases intracelulares, sendo posteriormente oxidado por espécies reativas em CM-DCF, que é altamente fluorescente (FORKINK *et al.*, 2010).

Apesar de muito estudos demonstrarem a atividade antioxidante de sulforafano (AKBARI; NAMAZIAN, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2014b; RUHEE; SUZUKI, 2020; SANTOS, P. W. *et al.*, 2020), alguns autores observaram indução de espécies reativas após o tratamento de células *in vitro* com o composto (CHHUNCHHA; KUBO; SINGH, 2019; CHOI *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2014b; PARK *et al.*, 2014).

Após 24 horas de tratamento com sulforafano 8  $\mu\text{M}$ , foi observada uma diminuição de espécies reativas em células DU145 e PC-3, apresentado uma

porcentagem menor que a do controle negativo. Este efeito também foi observado por Prata *et al.* (2018), que mostraram que sulforafano regula negativamente a expressão de AQP8 (transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e Nox2 (produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células leucêmicas (B1647), limitando a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sua entrada nas células, e inibindo a viabilidade celular. Em células humanas de estômago (MNP01) a redução das espécies reativas foi regulada pela ativação da via NRF2 (SANTOS, P. W. *et al.*, 2020). Kumar *et al.* (2008) demonstrou que altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e superóxido são produzidos em células DU145 e PC-3, e a inibição de Nox nessas células resultou na inibição da proliferação e migração celular, causando parada de ciclo celular em fase G2/M. Esses resultados indicam que a manutenção de uma alta concentração intracelular de espécies reativas é importante para manter o equilíbrio redox e a sinalização celular em células tumorais, e que sulforafano é capaz de diminuir a viabilidade dessas células inibindo a produção e transporte de espécies reativas.

Sulforafano isolado não induziu estresse oxidativo, mas quando associado à vitamina D foi possível observar um aumento de espécies reativas em 3 horas de tratamento em células DU145 e PC-3, além de um aumento após 24 horas de tratamento em células DU145. Essas alterações na homeostase redox das células DU145 e PC-3 podem estar relacionadas com o aumento da autofagia e danos no DNA observados no tratamento associado, pois o acúmulo de espécies reativas perturba a homeostase redox e pode danificar componentes celulares, como lipídios, proteínas e o DNA, causando danos graves nas células tumorais e resultando em morte celular induzida por apoptose, autofagia ou necroptose (KIM; KIM; SEO, 2019).

A fim de tentar elucidar os mecanismos responsáveis pelas respostas obtidas após o tratamento associado, foram investigadas as expressões de genes e proteínas de células DU145 e PC-3 tratadas com sulforafano (8 µM) e vitamina D (16 nM), isolados e associados.

Os resultados apresentados indicam que os efeitos observados pela associação de sulforafano à vitamina D são decorrentes da modulação de genes/proteínas das principais vias de sinalização desreguladas nos tumores, como WNT, AKT e MAPK (SHORNING *et al.*, 2020). Dentre os alvos que tiveram suas expressões alteradas pelo tratamento associado estão genes/proteínas responsáveis pela regulação de morte, ciclo e adesão celular e estresse oxidativo.

Após o tratamento com a associação foi observado maior expressão dos genes *MAPK1* e *CCNB1* e das proteínas BAX e NRF2 nas duas linhagens, enquanto a

proteína BCL2 foi menos expressa. Em células DU145 a expressão dos genes *CDK1* e *CTNNB1* e das proteínas CASP8, CASP3 e JNK foi aumentada. E em células PC-3 o gene *TNF* e as proteínas CASP8 e JNK tiveram menor expressão. Essas diferenças na modulação dos alvos devem-se aos perfis transcricionais específicos de cada linhagem.

Enquanto em células DU145 tanto a via intrínseca (BAX/BCL2) como a via extrínseca (CASP8 e CASP3) foram moduladas, em célula PC-3 somente a via intrínseca foi ativada. Rutz *et al.* (2020) encontraram diminuição da viabilidade celular, proliferação, efeito clonogênico, parada de ciclo e aumento da acetilação de histonas em DU145 e PC-3 tratadas com sulforafano, mas observaram que a alteração da sinalização intracelular não ocorreu pelos mesmos mecanismos nas duas linhagens. Além disso, a morte celular por apoptose em células PC-3 parece ser independente da ativação de caspases, ao contrário de células DU145, que demonstrou maior expressão das caspases 3 e 8. Karmakar *et al.* (2006) observaram que ambas as vias dependentes e independentes de caspase estavam envolvidas na apoptose induzida por sulforafano em células de glioblastoma T98G e U87MG.

A proteína p53 é um importante supressor tumoral que modula diversas funções como reparo de DNA, ciclo celular e apoptose. Mutações no gene p53 ocorrem em alta frequência em CRPC, sugerindo mutantes p53 como possíveis alvos para intervenções terapêuticas da doença. Enquanto células PC-3 são p53-*null*, DU145 coexpressam dois mutantes diferentes, p53<sup>P223L</sup> e p53<sup>V274F</sup>. Aggarwal *et al.* (2019) demonstraram que o isotiocianato de fenetil (PEITC), encontrado em vegetais crucíferos, inibiu a proliferação de células DU145 de forma seletiva e dependente do tipo de mutação em p53. PEITC induziu apoptose e parada de ciclo em fase G1, restaurando o mutante p53<sup>P223L</sup> de células DU145 e ativando alvos de p53, como BAX, p21, PUMA e MDM2 (AGGARWAL *et al.*, 2019). Esses resultados comprovam a importância de utilizar linhagens com diferentes tipos de mutações para avaliação de compostos. As mutações de p53 também podem estar relacionadas com algumas diferenças observadas nos resultados em células PC-3 e DU145 no presente estudo.

A JNK (quinase N-terminal c-Jun), tem papel importante no crescimento do carcinoma da próstata *in vitro* e *in vivo*, controlando processos como apoptose, proliferação, migração, sobrevivência, diferenciação e inflamação através da ativação de diversas moléculas. Muitos estímulos podem ativar JNK, incluindo, estresse oxidativo, toxinas e fármacos. A ativação de JNK pode desencadear a cascata

mediada pela caspase 8 induzindo a apoptose. No entanto, a inibição de JNK também tem demonstrado diminuição da proliferação celular e indução de apoptose em células de câncer de próstata (XU; HU, 2020). Nossos resultados mostraram ativação de JNK e CASP8 em células DU145, diferente de células PC-3, onde esses alvos foram inibidos após o tratamento associado. Apesar das diferenças na modulação dos alvos, as respostas ao tratamento são semelhantes nas duas linhagens.

Os resultados de Cho *et al.* (2005) indicam que sulforafano diminuiu o número de células viáveis por meio da ativação da sinalização mediada por JNK, gerando ROS, causando parada de ciclo em fase G2/M e apoptose dependente de caspase em células DU145. A vitamina D parece regular todo o processo de tumorigênese, desde o início até a metástase e as interações célula-microambiente. Esses mecanismos incluem a proliferação celular, diferenciação, apoptose, autofagia, transição epitelial-mesenquimal, modulação de interações célula-microambiente como angiogênese, efeito antioxidante, inflamação e sistema imunológico (JEON; SHIN, 2018).

Alguns estudos mostraram que a associação de vitamina D ao sulforafano é capaz de modular a via de sinalização WNT e inibir histonas desacetilases em células de câncer colorretal (Caco-2) e de mama (TMX2–28) (HOSSAIN, 2017; LEE; YANG; LIU, 2015), além de induzir autofagia em camundongos *Apc*<sup>1638N</sup> (heterozigotos para mutação germinativa no gene *Apc* e utilizados para estudar tumorigênese intestinal) (LI *et al.*, 2019). Portanto os resultados encontrados no presente estudo corroboram os descritos na literatura, e com a predição das interações dos compostos com os alvos e entre os alvos, podemos verificar uma possível rede de sinalização responsável pelos efeitos observados pela associação de sulforafano e vitamina D.

É importante ressaltar que, devido a variabilidade de paciente para paciente, a ação independente dos fármacos é suficiente para explicar a superioridade clínica de muitas associações que apresentam ausência de sinergia ou aditividade, pois cada paciente pode responder a único fármaco ou à associação desses (PALMER; SORGER, 2017). Além de observar potencialização dos efeitos de sulforafano ao associá-lo com vitamina D em concentrações clinicamente relevantes, como indução de estresse oxidativo, indução de autofagia, morte celular e modulação de genes e proteínas, as outras atividades anticâncer de sulforafano não tiveram redução após a associação dos nutracêuticos.

Em resumo, em células DU145, sulforafano associado à vitamina D aumentou



a citotoxicidade, estresse oxidativo, danos no DNA e autofagia, envolvendo ativação da via MAPK (JNK e *MAPK1*) e WNT (*CTNNB1*), aumento da expressão de proteínas BAX, CASP8, CASP3 (pró-apoptóticas) e NRF2 (antioxidante), de genes *CDK1* e *CCNB1* (reguladores do ciclo celular), e diminuição da expressão da proteína BCL2 (anti-apoptótica). Em células PC-3, a associação dos nutracêuticos promoveu maior efeito sobre a citotoxicidade, estresse oxidativo e autofagia, aumento da expressão dos genes *MAPK1* e *CCNB1* e das proteínas BAX e NRF2, e diminuição do gene *TNF* e proteínas JNK, CASP8 e BCL2. A modulação da via MAPK parece ser a principal responsável pelos efeitos observados com a associação de sulforafano e vitamina D.

## 6. Conclusões

- Nos ensaios de viabilidade celular (MTT e vermelho neutro), vitamina D diminuiu a viabilidade de ambas as linhagens em concentrações de 16 e 32 nM. Sulforafano diminuiu a viabilidade de células DU145, PC-3 e HaCaT após o tratamento com concentrações a partir de 2  $\mu$ M. A associação dos compostos não alterou a viabilidade das linhagens em comparação aos tratamentos isolados.
- Em ensaio de citotoxicidade Live/Dead, sulforafano foi citotóxico em concentrações de 4 e 8  $\mu$ M em células DU145 e somente em concentração de 8  $\mu$ M em células PC-3. As associações de sulforafano (4 e 8  $\mu$ M) e vitamina D (16 nM) aumentaram o efeito citotóxico de sulforafano nas duas linhagens.
- Em células DU145 a concentração de 8  $\mu$ M de sulforafano aumentou as células em apoptose, diminuiu a capacidade de formar colônias, e parou o ciclo celular em fases S e G2, diminuindo o número de células em fase G1. Após o tratamento associado não foram observadas alterações em nenhum desses parâmetros quando comparado aos tratamentos isolados.
- Em células PC-3, a concentração de 8  $\mu$ M de sulforafano aumentou as células em apoptose e parou o ciclo celular em fase G2, diminuindo o número de células em fase G1. Vitamina D (16 nM) e sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) diminuíram a capacidade de PC-3 formar colônias. Após o tratamento associado, também não foram observadas alterações em nenhum desses parâmetros quando comparado aos tratamentos isolados.
- A atividade migratória de células DU145 e PC-3 analisada por ensaio de *wound healing*, não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos avaliados.
- Após 24 horas de tratamento, vitamina D (16 nM) e sulforafano (2, 4 e 8  $\mu$ M) não diminuíram a viabilidade celular em tratamento isolado. No entanto, todas as associações testadas em células DU145 e a associação de 8  $\mu$ M de sulforafano e vitamina D (16 nM) em células PC-3, diminuíram a viabilidade celular em relação aos tratamentos isolados.

- Em ensaio de indução de autofagia a concentração de 8  $\mu$ M de sulforafano aumentou a atividade autofágica em células DU145 e PC-3. A associação de vitamina D (16 nM) ao sulforafano (4  $\mu$ M) potencializou a indução de autofagia em células DU145 quando comparado aos tratamentos isolados. Em células PC-3, a associação de vitamina D (16 nM) ao sulforafano (8  $\mu$ M) potencializou a indução de autofagia.
- Em ensaio de estresse oxidativo, sulforafano (8  $\mu$ M) diminuiu a porcentagem de espécies reativas após 24 horas de tratamento das duas linhagens. A associação de vitamina D (16 nM) ao sulforafano (2  $\mu$ M) aumentou as espécies reativas após o tratamento de 3 horas em células DU145 e PC-3. A associação de vitamina D (16 nM) ao sulforafano (4  $\mu$ M) aumentou as espécies reativas após o tratamento de 24 horas somente em células DU145.
- Não foi observada alteração na indução de danos no DNA de ambas as linhagens tratadas com sulforafano ou vitamina D isolados. Mas após o tratamento associado de vitamina D (16 nM) e sulforafano (8  $\mu$ M), houve um aumento dos danos no DNA de células DU145.
- Em células DU145 foi observado o aumento da expressão dos genes *MAPK1*, *CCNB1*, *CDK1* e *CTNNB1* após o tratamento associado. Em células PC-3 foi observado o aumento da expressão dos genes *MAPK1* e *CCNB1* e diminuição do gene *TNF* após o tratamento associado.
- Após o tratamento associado, as proteínas BAX, CASP8, CASP3, NRF2 e JNK foram mais expressas, e BCL2 menos expressa em relação ao controle em células DU145. Em PC-3, a expressão de BAX e NRF2 aumentou, enquanto a expressão de BCL2, CASP8 e JNK diminuiu.
- A predição de interação entre os alvos e os compostos estudados demonstrou uma rede biologicamente conectada, sugerindo a via MAPK como principal via de sinalização responsável pelos efeitos observados pela associação de sulforafano e vitamina D.

## Referências

- ABBAOUI, B. *et al.* Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Bladder Cancer Prevention. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 62, n. 18, p. e1800079, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201800079>>. Acesso em: 30 nov. 2018.
- AGGARWAL, M. *et al.* p53 mutant-type in human prostate cancer cells determines the sensitivity to phenethyl isothiocyanate induced growth inhibition. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 38, n. 1, p. 1-17, 2019.
- AKBARI, E.; NAMAZIAN, M. Sulforaphane: A natural product against reactive oxygen species. **Computational and Theoretical Chemistry**, Amsterdam, v. 1183, p. 112850, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210271X2030150X>>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- ALBANES, D. Vitamin D and Cancer: Diversity, Complexity, and Still a Ways to Go. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, Philadelphia, v. 8, n. 8, p. 657–661, 2015.
- AL-LAZIKANI, B.; BANERJI, U.; WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 7, p. 679–692, 2012.
- ALUMKAL, J. J. *et al.* A phase II study of sulforaphane-rich broccoli sprout extracts in men with recurrent prostate cancer. **Investigational new drugs**, New York, v. 33, n. 2, p. 480–489, 2015.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 243, de 26 de julho de 2018**. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=27/07/2018&jornal=515&pagina=100>>. Acesso em: 04 fev. 2022.
- ATWELL, L. L. *et al.* Absorption and chemopreventive targets of sulforaphane in humans following consumption of broccoli sprouts or a myrosinase-treated broccoli sprout extract. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v. 59, n. 3, p. 424–433, 2015.
- BALACHANDAR, R. *et al.* Relative Efficacy of Vitamin D2 and Vitamin D3 in improving Vitamin D status: Systematic review and meta-Analysis. **Nutrients**, Basel, v. 13, n. 10, p. 3328, 2021.
- BAL-PRICE, A.; COECKE, S. Guidance on good cell culture practice (GCCP). In: **Cell culture techniques**. Humana Press, 2011. p. 1-25.
- BEER, T. M. *et al.* Pharmacokinetics and Tolerability of a Single Dose of DN-101, a New Formulation of Calcitriol, in Patients with Cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 11, n. 21, p. 7794–7799, 2005.

- BEER, T. M. *et al.* Phase I study of weekly DN-101, a new formulation of calcitriol, in patients with cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 59, n. 5, p. 581–587, 2007.
- BEER, T. M. *et al.* Weekly high-dose calcitriol and docetaxel in advanced prostate cancer. **Seminars in Oncology**, Philadelphia, v. 28, p. 49–55, 2001.
- BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Drug interactions in oncology. **The Lancet Oncology**, London, v. 5, n. 8, p. 489–496, 2004.
- BEN-ELTRIKI, M.; DEB, S.; GUNS, E. S. T. Calcitriol in Combination Therapy for Prostate Cancer: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions. **Journal of Cancer**, Wyoming, v. 7, n. 4, p. 391–407, 2016.
- BERGANTIN, E. *et al.* Sulforaphane induces apoptosis in rhabdomyosarcoma and restores TRAIL-sensitivity in the aggressive alveolar subtype leading to tumor elimination in mice. **Cancer Biology & Therapy**, Philadelphia, v. 15, n. 9, p. 1219–1225, 2014.
- BERNKOPF, D. B. *et al.* Sulforaphane inhibits growth and blocks Wnt/ $\beta$ -catenin signaling of colorectal cancer cells. **Oncotarget**, Albany, v. 9, n. 74, p. 33982–33994, 2018.
- BLEYER, A.; SPREAFICO, F.; BARR, R. Prostate cancer in young men: An emerging young adult and older adolescent challenge. **Cancer**, Hoboken, v. 126, n. 1, p. 46–57, 2020.
- BULUSU, K. C. *et al.* Modelling of compound combination effects and applications to efficacy and toxicity: state-of-the-art, challenges and perspectives. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 225–238, 2016.
- CALVANI, M.; PASHA, A.; FAVRE, C. Nutraceutical Boom in Cancer: Inside the Labyrinth of Reactive Oxygen Species. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 6, p. 1936, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7139678/>>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- CHAN, G. K. Y. *et al.* A Simple High-Content Cell Cycle Assay Reveals Frequent Discrepancies between Cell Number and ATP and MTS Proliferation Assays. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e63583, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063583>>. Acesso em: 13 dez. 2018.
- CHANG, C.-C. *et al.* Sulforaphane induced cell cycle arrest in the G2/M phase via the blockade of cyclin B1/CDC2 in human ovarian cancer cells. **Journal of Ovarian Research**, London, v. 6, p. 41, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733945/>>. Acesso em: 17 jan. 2019.
- CHEN, H. *et al.* Epigallocatechin Gallate and Sulforaphane Combination Treatment Induce Apoptosis in Paclitaxel-Resistant Ovarian Cancer Cells through hTERT and

Bcl-2 Down-regulation. **Experimental cell research**, Orlando, v. 319, n. 5, p. 697–706, 2013.

CHHABRA, G. *et al.* Prostate cancer chemoprevention by natural agents: Clinical evidence and potential implications. **Cancer Letters**, Limerick, v. 422, p. 9–18, 2018.

CHHUNCHHA, B.; KUBO, E.; SINGH, D. P. Sulforaphane-Induced Klf9/Prdx6 Axis Acts as a Molecular Switch to Control Redox Signaling and Determines Fate of Cells. **Cells**, Basel, v. 8, n. 10, p. 1159, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6829349/>>. Acesso em: 30 nov. 2020.

CHIKARA, S. *et al.* Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. **Cancer Letters**, Limerick, v. 413, p. 122-134, 2018.

CHO, S.-D. *et al.* Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU145 prostate cancer cells. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 52, n. 2, p. 213–224, 2005.

CHOI, W. Y. *et al.* Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 62, n. 9, p. 637–644, nov. 2008.

CHOPRA, A. S. *et al.* The current use and evolving landscape of nutraceuticals. **Pharmacological Research**, Amsterdam, v. 175, p. 106001, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34826602/>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

CHOUDHARI, A. S. *et al.* Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 10, p. 1614, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7025531/>>. Acesso em: 29 nov. 2020.

CLARKE, J D. *et al.* Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v. 55, n. 7, p. 999-1009, 2011.

DENTON, D.; KUMAR, S. Autophagy-dependent cell death. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 26, n. 4, p. 605–616, 2019.

DI NUNZIO, M. *et al.* Is cytotoxicity a determinant of the different in vitro and in vivo effects of bioactives? **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 17, p. 453, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5590171/>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

FELDMAN, D. *et al.* The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 14, n. 5, p. 342-357, 2014.

FETAHU, I. S.; HÖBAUS, J.; KÁLLAY, E. Vitamin D and the epigenome. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 5, p. 164, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010791/>>. Acesso em: 8 dez. 2017.

FLEET, J. C. *et al.* Vitamin D and Cancer: A review of molecular mechanisms. **The Biochemical journal**, London, v. 441, n. 1, p. 61–76, 2012.

FONTANA, F. *et al.* Natural Compounds in Prostate Cancer Prevention and Treatment: Mechanisms of Action and Molecular Targets. **Cells**, Basel, v. 9, n. 2, p. 460, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/460/>>. Acesso em: 1 fev. 2022.

FORKINK, M. *et al.* Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 16th European Bioenergetics Conference 2010. Amsterdam, v. 1797, n. 6, p. 1034–1044, 2010.

FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 3, n. 3, p. e00149, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492765/>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FUJITA, K.; NONOMURA, N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. **The World Journal of Men's Health**, Seoul, v. 36, p. e32, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.5534/wjmh.180040>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

GAO, J. *et al.* Circulating vitamin D concentration and risk of prostate cancer: a dose–response meta-analysis of prospective studies. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, Auckland, v. 14, p. 95–104, 2018.

GASPER, A. V. *et al.* Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 82, n. 6, p. 1283–1291, 2005.

GEORGE, B. P.; CHANDRAN, R.; ABRAHAMSE, H. Role of Phytochemicals in Cancer Chemoprevention: Insights. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, Basel, v. 10, n. 9, p. 1455, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/9/1455>>. Acesso em: 04 fev. 2022.

GIBBS, A. *et al.* Sulforaphane destabilizes the androgen receptor in prostate cancer cells by inactivating histone deacetylase 6. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 39, p. 16663–16668, 2009.

HAC, A. *et al.* Mechanism of selective anticancer activity of isothiocyanates relies on differences in DNA damage repair between cancer and healthy cells. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 59, n. 4, p. 1421–1432, 2020.

HANLON, N. *et al.* Repeated intake of broccoli does not lead to higher plasma levels of sulforaphane in human volunteers. **Cancer Letters**, Limerick, v. 284, n. 1, p. 15–20, 2009.

HARRIS, I. S.; DENICOLA, G. M. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 30, n. 6, p. 440–451, 2020.

HERMAN-ANTOSIEWICZ, A.; JOHNSON, D. E.; SINGH, S. V. Sulforaphane causes autophagy to inhibit release of cytochrome C and apoptosis in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 66, n. 11, p. 5828–5835, 2006.

HO, E.; CLARKE, J. D.; DASHWOOD, R. H. Dietary sulforaphane, a histone deacetylase inhibitor for cancer prevention. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 139, n. 12, p. 2393-2396, 2009.

HOSSAIN, S. Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on Vitamin D Dependent Gene Expression in Human Colorectal and Breast Cancers. **The FASEB Journal**, Hoboken, v. 31, n. S1, p. 644.7-644.7, 2017. Disponível em: <[https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.644.7](https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1_supplement.644.7)>. Acesso em: 26 nov. 2020.

HSU, A. *et al.* Promoter de-methylation of cyclin D2 by sulforaphane in prostate cancer cells. **Clinical Epigenetics**, London, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2011.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2020.

JEON, S.-M.; SHIN, E.-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, New York, v. 50, n. 4, p. 1–14, 2018.

JIANG, H. *et al.* Combination Treatment with Resveratrol and Sulforaphane Induces Apoptosis in Human U251 Glioma Cells. **Neurochemical research**, New York, v. 35, n. 1, p. 152, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2821708/>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

JO, C. *et al.* Sulforaphane induces autophagy through ERK activation in neuronal cells. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 588, n. 17, p. 3081–3088, 2014.

JO, G. H. *et al.* Sulforaphane induces apoptosis in T24 human urinary bladder cancer cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway: the involvement of endoplasmic reticulum stress and the Nrf2 signaling pathway. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 45, n. 4, p. 1497–1506, 2014.

JOHNSON, S.; NGUYEN, V.; CODER, D. Assessment of cell viability. **Current Protocols in Cytometry**, New York, v. 64, n. 1, p. 9.2.1-9.2.26, 2013.

JONES, G.; PROSSER, D. E.; KAUFMANN, M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, The Many Faces of Vitamin D. New York, v. 523, n. 1, p. 9–18, 2012.

JONES, P. A.; ISSA, J. P. J.; BAYLIN, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 17, n. 10, p. 630-641, 2016.



JUNG, S.; JEONG, H.; YU, S.-W. Autophagy as a decisive process for cell death. **Experimental & Molecular Medicine**, New York, v. 52, n. 6, p. 921–930, 2020.

KALLIFATIDIS, G.; HOY, J.; LOKESHWAR, B. L. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer. **Seminars in cancer biology**, London, v. 40–41, p. 160–169, 2016.

KAMAL, M. M. *et al.* Sulforaphane as an anticancer molecule: mechanisms of action, synergistic effects, enhancement of drug safety, and delivery systems. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 43, n. 4, p. 371–384, 2020.

KAMILOGLU, S. *et al.* Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, Hoboken, v. 1, n. 3, p. 332–349, 2020.

KARMAKAR, S. *et al.* Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. **Neuroscience**, New York, v. 141, n. 3, p. 1265–1280, 2006.

KAUFMAN-SZYMCZYK, A. *et al.* The role of sulforaphane in epigenetic mechanisms, including interdependence between histone modification and DNA methylation. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 12, p. 29732-29743, 2015.

KGATLE, M. M. *et al.* Prostate Cancer: Epigenetic Alterations, Risk Factors, and Therapy. **Prostate Cancer**, Cairo, v. 2016, p. 5653862, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5116340/>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

KIM, B. G. *et al.* Sulforaphane, a natural component of broccoli, inhibits vestibular schwannoma growth *in vitro* and *in vivo*. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 36215, 2 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep36215>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

KIM, S. J.; KIM, H. S.; SEO, Y. R. Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2019, p. 5381692, 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/5381692/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

KRISTAL, A. R.; LAMPE, J. W. Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 42, n. 1, p. 1–9, 2002.

KUMAR, B. *et al.* Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. **Cancer Research**, Baltimore, v. 68, n. 6, p. 1777–1785, 2008.

LABBÉ, D. P. *et al.* Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link. **Oncogene**, Basingstoke, v. 34, n. 36, p. 4683–4691, 2015.

LAI, G-R. *et al.* Active vitamin D induces gene-specific hypomethylation in prostate cancer cells developing vitamin D resistance. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Bethesda, v. 318, n. 5, p. 836-847, 2020.

LEE, B. H.; YANG, Y.; LIU, Z. Synergistic Mediation of Sulforaphane and Vitamin D on the Wnt-signaling Pathway. **Journal of Nature and Science (JNSCI)**, Los Angeles, v. 1, n. 2, p. 36, 2015. Disponível em: <<http://www.jnsoci.org/index.php?journal=nsoci&page=article&op=view&path%5B%5D=36>>. Acesso em: 8 dez. 2017.

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

LI, H.-X. *et al.* Vitamin D3 potentiates the growth inhibitory effects of metformin in DU145 human prostate cancer cells mediated by AMPK/mTOR signalling pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 711–717, 2015.

LI, J. *et al.* The Prevention of a High Dose of Vitamin D or Its Combination with Sulforaphane on Intestinal Inflammation and Tumorigenesis in Apc1638N Mice Fed a High-Fat Diet. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 63, n. 4, p. e1800824, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201800824>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

LI, Y. *et al.* Recent Progress on Nutraceutical Research in Prostate Cancer. **Cancer metastasis reviews**, Dordrecht, v. 33, n. 0, p. 629–640, 2014.

LIANG, J. *et al.* Sulforaphane Inhibits Inflammatory Responses of Primary Human T-Cells by Increasing ROS and Depleting Glutathione. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, p. 2584, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02584/full>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

LIU, H.-J. *et al.* Sulforaphane-N-Acetyl-Cysteine Induces Autophagy Through Activation of ERK1/2 in U87MG and U373MG Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, Basel, v. 51, n. 2, p. 528–542, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, Duluth, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LUO, W. *et al.* 24-Hydroxylase in cancer: Impact on vitamin D-based anticancer therapeutics. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 136, p. 252–257, 2013.

LUO, W. *et al.* Epigenetic Regulation of Vitamin D 24-Hydroxylase/CYP24A1 in Human Prostate Cancer. **Cancer research**, Baltimore, v. 70, n. 14, p. 5953–5962, 2010.

MAIOLI, E. *et al.* Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. **Biological Procedures Online**, London, v. 11, p. 227–240, 2009.

MATEO, J. *et al.* DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. **European Urology**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 417–425, 2017.

MOKBEL, K.; WAZIR, U.; MOKBEL, K. Chemoprevention of Prostate Cancer by Natural Agents: Evidence from Molecular and Epidemiological Studies. **Anticancer Research**, Attiki, v. 39, n. 10, p. 5231–5259, 2019.

MONDAL, A. *et al.* Sulforaphane promotes Bax/Bcl2, MAPK-dependent human gastric cancer AGS cells apoptosis and inhibits migration via EGFR, p-ERK1/2 down-regulation. **General Physiology and Biophysics**, Bratislava, v. 35, n. 1, p. 25–34, 2016.

MONDUL, A. M. *et al.* Vitamin D and Cancer Risk and Mortality: State of the Science, Gaps, and Challenges. **Epidemiologic Reviews**, New York, v. 39, n. 1, p. 28–48, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.

MUINDI, J. R. *et al.* A phase I and pharmacokinetics study of intravenous calcitriol in combination with oral dexamethasone and gefitinib in patients with advanced solid tumors. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, Berlin, v. 65, n. 1, p. 33–40, 2009.

MURPHY, A. B. *et al.* Vitamin D Deficiency Predicts Prostate Biopsy Outcomes. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 20, n. 9, p. 2289–2299, 2014.

MYZAK, M. C. *et al.* Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 811-819, 2006.

MYZAK, M. C. *et al.* Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 232, n. 2, p. 227-234, 2007.

NAUMANN, P. *et al.* Autophagy and cell death signaling following dietary sulforaphane act independently of each other and require oxidative stress in pancreatic cancer. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 39, n. 1, p. 101–109, 2011.

NAVANEETHAKRISHNAN, S.; ROSALES, J. L.; LEE, K.-Y. ROS-Mediated Cancer Cell Killing through Dietary Phytochemicals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2019, p. 9051542, 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/9051542/>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

OLIVEIRA, J. M. P. F. DE; REMÉDIOS, C.; *et al.* Sulforaphane Induces DNA Damage and Mitotic Abnormalities in Human Osteosarcoma MG-63 Cells: Correlation with Cell Cycle Arrest and Apoptosis. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 66, n. 2, p. 325–334, 2014a.

OLIVEIRA, J. M. P. F. DE; COSTA, M.; *et al.* Sulforaphane Induces Oxidative Stress and Death by p53-Independent Mechanism: Implication of Impaired Glutathione Recycling. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e92980, 2014b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965485/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

PALLIYAGURU, D. L. *et al.* Isothiocyanates: Translating the Power of Plants to People. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 62, n. 18, p. e1700965, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201700965/>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

PALMER, A. C.; SORGER, P. K. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. **Cell**, Cambridge, v. 171, n. 7, p. 1678- 1691, 2017.

PAPPA, G. *et al.* Quantitative combination effects between sulforaphane and 3,3'-diindolylmethane on proliferation of human colon cancer cells in vitro. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1471–1477, 2007.

PARK, H. S. *et al.* Sulforaphane induces reactive oxygen species-mediated mitotic arrest and subsequent apoptosis in human bladder cancer 5637 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 64, p. 157–165, fev. 2014.

PAUR, I. *et al.* Tomato-based randomized controlled trial in prostate cancer patients: Effect on PSA. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, Kidlington, v. 36, n. 3, p. 672–679, 2017.

PAWLIK, A. *et al.* Sulforaphane inhibits growth of phenotypically different breast cancer cells. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 52, n. 8, p. 1949–1958, 2013.

PERILLO, B. *et al.* ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, New York, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020.

PORRAS, V. R.; FONT, A.; AYLES, A. Chemotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: Current scenario and future perspectives. **Cancer Letters**, Limerick, v. 523, p. 162-169, 2021.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. In: **Checkpoint Controls and Cancer**. Humana Press, 2004. p. 301-311.

PRATA, C. *et al.* Sulforaphane Modulates AQP8-Linked Redox Signalling in Leukemia Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2018, p. 4125297, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30581529/>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

RAKARIYATHAM, K. *et al.* Synergistic chemopreventive effect of allyl isothiocyanate and sulforaphane on non-small cell lung carcinoma cells. **Food & Function**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 893–902, 2019.

REED, D.; RAINA, K.; AGARWAL, R. Nutraceuticals in prostate cancer therapeutic strategies and their neo-adjuvant use in diverse populations. **npj Precision Oncology**, London, v. 2, n. 1, p. 15, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41698-018-0058-x>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

REPETTO, G.; PESO, G.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

RIZEQ, B. *et al.* The Power of Phytochemicals Combination in Cancer Chemoprevention. **Journal of Cancer**, Wyoming, v. 11, n. 15, p. 4521–4533, 2020.

RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J-L. Wound-healing assay. In: **Cell migration**. Humana Press, 2005. p. 23-29.

RUHEE, R. T.; SUZUKI, K. The Integrative Role of Sulforaphane in Preventing Inflammation, Oxidative Stress and Fatigue: A Review of a Potential Protective Phytochemical. **Antioxidants**, Basel, v. 9, n. 6, p. 521, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/9/6/521>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

RUSSO, M. *et al.* Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 58, n. 8, p. 1391–1405, 2018.

RUTZ, J. *et al.* Sulforaphane Reduces Prostate Cancer Cell Growth and Proliferation In Vitro by Modulating the Cdk-Cyclin Axis and Expression of the CD44 Variants 4, 5, and 7. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 22, p. 8724, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7699211/>>. Acesso em: 1 fev. 2022.

SANTOS, P. W. *et al.* Effects of sulforaphane on the oxidative response, apoptosis, and the transcriptional profile of human stomach mucosa cells in vitro. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 854–855, p. 503201, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571820300711>>. Acesso em: 26 nov. 2020.

SANTOS, P. W. S. *et al.* Transcriptome and DNA methylation changes modulated by sulforaphane induce cell cycle arrest, apoptosis, DNA damage, and suppression of proliferation in human liver cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 136, p. 111047, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31838189/>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

SARTOR, O.; DE BONO, J. S. Metastatic Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 378, n. 7, p. 645–657, 2018.

SHA, J. *et al.* Synergistic effect and mechanism of vitamin A and vitamin D on inducing apoptosis of prostate cancer cells. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 4, p. 2763–2768, 2013.

SHAPIRO, T. A. *et al.* Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, Philadelphia, v. 7, n. 12, p. 1091–1100, 1998.

SHEN, Y. *et al.* Calcitriol induces cell senescence of kidney cancer through JMJD3 mediated histone demethylation. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 59, p. 100187–100195, 2017.

SHORNING, B. Y. *et al.* The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 12, p. 4507, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/12/4507>>. Acesso em: 1 fev. 2022.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022.

SINGH, M.; SHUKLA, Y. Combinatorial Approaches Utilizing Nutraceuticals in Cancer Chemoprevention and Therapy. In: BAGCHI, D.; SWAROOP, A.; BAGCHI, NASHI (Org.). **Genomics, Proteomics and Metabolomics in Nutraceuticals and Functional Foods**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 185–217. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118930458.ch15/summary>>. Acesso em: 8 dez. 2017.

SKOWRONSKI, R. J.; PEEHL, D. M.; FELDMAN, D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in human prostate cancer cell lines. **Endocrinology**, New York, v. 132, n. 5, p. 1952–1960, 1993.

SMITH, D. C. *et al.* A Phase I Trial of Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) in Patients with Advanced Malignancy. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 5, n. 6, p. 1339–1345, 1999

STOCKERT, J. C. *et al.* Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, Jena, v. 120, n. 3, p. 159–167, 2018.

STURGE, J.; CALEY, M. P.; WAXMAN, J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, London, v. 8, n. 6, p. 357–368, 2011.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SZKLARCZYK, D. *et al.* STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, n.1, p. 380-384, 2016.

THOMAS, R. *et al.* A double-blind, placebo-controlled randomised trial evaluating the effect of a polyphenol-rich whole food supplement on PSA progression in men with prostate cancer—the UK NCRN Pomi-T study. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, London, v. 17, n. 2, p. 180–186, 2014.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.

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

TRUMP, D. L.; ARAGON-CHING, J. B. Vitamin D in prostate cancer. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v. 20, n. 3, p. 244–252, 2018.

TSAI, J.-Y.; TSAI, S.-H.; WU, C.-C. The chemopreventive isothiocyanate sulforaphane reduces anoikis resistance and anchorage-independent growth in non-small cell human lung cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 362, p. 116–124, 2019.

TUNG, C.-W. ChemDIS: a chemical-disease inference system based on chemical-protein interactions. **Journal of Cheminformatics**, London, v. 7, p. 25, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26078786/>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

TUSSKORN, O. *et al.* Mitochondrial division inhibitor-1 potentiates cisplatin-induced apoptosis via the mitochondrial death pathway in cholangiocarcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 111, p. 109–118, 2019.

VALDÉS-MORA, F.; CLARK, S. J. Prostate cancer epigenetic biomarkers: next-generation technologies. **Oncogene**, Basingstoke, v. 34, n. 13, p. 1609–1618, 2015.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010202>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

WANG, S.-K. *et al.* Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by the combination of  $\beta$ -carotene and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human esophageal cancer EC9706 cells. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, Bangkok, v. 13, n. 12, p. 6327–6332, 2012.

WANG, Z. *et al.* Nutraceuticals for prostate cancer chemoprevention: from molecular mechanisms to clinical application. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, Abingdon, v. 22, n. 12, p. 1613–1626, 2013.

WEI, L.-Y. *et al.* The functional role of sulforaphane in intestinal inflammation: a review. **Food & Function**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 514–529, 2022.

WU, G. *et al.* Sulforaphane: Expected to Become a Novel Antitumor Compound. **Oncology Research**, Elmsford, v. 28, n. 4, p. 439–446, 2020.

WU, Y. *et al.* Plasma genistein and risk of prostate cancer in Chinese population. **International Urology and Nephrology**, Amsterdam, v. 47, n. 6, p. 965–970, 2015.

XIE, D.-D. *et al.* Low vitamin D status is associated with inflammation in patients with prostate cancer. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 13, p. 22076–22085, 2017.

XU, R.; HU, J. The role of JNK in prostate cancer progression and therapeutic strategies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 121, p. 109679, 2020.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219353016>>. Acesso em: 4 fev. 2022.

ZHANG, C. *et al.* Sulforaphane enhances Nrf2 expression in prostate cancer TRAMP C1 cells through epigenetic regulation. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 85, n. 9, p. 1398-1404, 2013.

ZHANG, M.; XU, Y.; JIANG, L. Sulforaphane attenuates angiotensin II-induced human umbilical vein endothelial cell injury by modulating ROS-mediated mitochondrial signaling. **Human & Experimental Toxicology**, London, v. 39, n. 5, p. 734–747, 2020.

ZHANG, Z. *et al.* The Role of Cruciferous Vegetables and Isothiocyanates for Lung Cancer Prevention: Current Status, Challenges, and Future Research Directions. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 62, n. 18, p. e1700936, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201700936>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

ZHENG, Z. *et al.* Sulforaphane metabolites inhibit migration and invasion via microtubule-mediated Claudins dysfunction or inhibition of autolysosome formation in human non-small cell lung cancer cells. **Cell Death & Disease**, London, v. 10, n. 4, p. 259, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41419-019-1489-1>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

ZHOU, Y. *et al.* Sulforaphane metabolites cause apoptosis via microtubule disruption in cancer. **Endocrine-Related Cancer**, Bristol, v. 25, n. 3, p. 255–268, 2018.

ZHUANG, S-H. *et al.* Vitamin D receptor content and transcriptional activity do not fully predict antiproliferative effects of vitamin D in human prostate cancer cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 126, n. 1, p. 83–90, 1997.

ZMIJEWSKI, M. A.; CARLBERG, C. Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 29, n. 9, p. 876-884, 2020.