

BIANCA SAYURI TAKAYASU

**Estudo Comparativo Dos Efeitos Citotóxicos De β -Sitosterol E β -Secosterol Em
Células Tumorais E Não Tumorais De Fígado De Rato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Machado-Santelli

Versão Corrigida

São Paulo
2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Takayasu, Bianca Sayuri

Estudo Comparativo Dos Efeitos Citotóxicos De β -
Sitosterol E β -Secosterol Em Células Tumerais E Não
Tumerais De Fígado De Rato / Bianca Sayuri Takayasu;
orientador Gláucia Maria Machado-Santelli. -- São
Paulo, 2023.

83 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --
Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências
Biomédicas.

1. Beta-Sitosterol. 2. Fitoesteróis. 3.
Oxifitoesteróis. 4. Morfologia celular. 5.
Citoesqueleto. I. Machado-Santelli, Gláucia Maria ,
orientador. II. Título.

RESUMO

TAKAYASU, B. S. **Estudo comparativo dos efeitos citotóxicos de β -Sitosterol e β -Secosterol em células tumorais e não tumorais de fígado de rato.** 2023. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O β -Sitosterol (β Sito) é o fitoesterol mais abundante encontrado em plantas e alimentos enriquecidos com fitoesterol. Seu consumo tem aumentado devido a sua capacidade de reduzir o risco de doenças cardiovasculares ao inibir a absorção do colesterol. Porém, o β Sito é propenso à oxidação por espécies reativas de oxigênio, como o ozônio, gerando oxifitoesteróis. É necessário compreender os efeitos biológicos e os mecanismos de ação desses compostos, uma vez que seus efeitos na saúde humana permanecem controversos. Considerando o metabolismo hepático desses esteróis, conduzimos um estudo para investigar os efeitos do β Sito e do seu principal oxifitoesterol β -Secosterol (β Sec), produzido por oxidação pelo ozônio, na viabilidade celular, distribuição do ciclo celular, morfologia celular, organização do citoesqueleto e adesão focal nas linhagens BRL-3A (células de fígado imortalizadas de *R.norvegicus*) e HTC (hepatoma de rato). Para isso, empregamos as técnicas de MTT, exclusão por azul de tripano e dupla marcação com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo para medir a viabilidade celular; técnica de citometria de fluxo para avaliar a progressão do ciclo celular; marcadores e corantes fluorescentes para analisar a morfologia celular e adesão focal. Nossos resultados demonstraram que β Sito não provocou efeitos significativos nas duas linhagens celulares, enquanto β Sec causou danos em ambas. Entretanto, as células tumorais se mostraram mais sensíveis ao oxifitoesterol em relação às não tumorais, uma vez que foi necessária uma menor concentração para observar seus efeitos. Nas células BRL-3A e HTC, β Sec provocou diminuição na viabilidade celular, induziu parada do ciclo celular em fase G0/G1, causou alterações morfológicas e na organização do citoesqueleto e modificações na distribuição da vinculina presente em adesões focais. Estes efeitos se mostraram reversíveis, uma vez que as células se recuperaram dos danos sofridos após a remoção do composto. Entretanto, observamos que apenas a morfologia celular de células BRL-3A mantiveram alterações. Deste modo, nossos resultados demonstraram possíveis efeitos celulares induzidos por β Sito e β Sec, essenciais para melhor compreender potenciais ações benéficas ou adversas relacionadas aos seus usos terapêuticos.

Palavras-chave: Beta-Sitosterol. Fitoesteróis. Oxifitoesteróis. Morfologia celular. Citoesqueleto.

ABSTRACT

TAKAYASU, B. S. **Comparative study of the cytotoxic effects of β -Sitosterol and β -Secosterol on tumor and non-tumor rat liver cells.** 2023. 83 f. Dissertation (Masters thesis in Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

β -Sitosterol (β Sito) is the most abundant phytosterol in plants and phytosterol-enriched foods. Its consumption has increased due to its ability to reduce the risk of cardiovascular diseases by inhibiting cholesterol absorption. However, β Sito is prone to oxidation by reactive oxygen species, such as ozone, generating oxyphytosterols. It is necessary to understand the biological effects and mechanisms of action of these compounds, as their impact on human health remains controversial. Considering the hepatic metabolism of these sterols, we conducted a study to investigate the effects of β Sito and its main oxyphytosterol β -Secosterol (β Sec), produced by ozone oxidation, on cell viability, cell cycle distribution, cell morphology, focal adhesion in BRL-3A (immortalized liver cells of *R.norvegicus*) and HTC (rat hepatoma) cell lines. For this, we used the techniques of MTT, trypan blue exclusion, and double labeling with Hoechst 33342 and propidium iodide to measure cell viability; flow cytometry technique to assess cell cycle progression; and fluorescent markers to analyze cellular morphology and focal adhesion. Our results demonstrated that β Sito did not cause significant effects either in BRL-3A or in HTC cells while β Sec caused damage in both cell lines. However, tumor cells were more sensitive to oxyphytosterol compared with non-tumor cells since a lower concentration was needed to observe its effects. In BRL-3A and HTC cells, β Sec caused a decrease in cell viability, induced cell cycle arrest in the G0/G1 phase, and caused morphological alterations, and changes in the organization of the cytoskeleton and in the distribution of vinculin present in focal adhesions. These effects proved reversible, as the cells recovered from the damage suffered after the compound was removed. However, we observed that only the cellular morphology of BRL-3A cells maintained the alterations. Thus, our results demonstrated possible cellular effects induced by β Sito and β Sec, essential to understanding potential beneficial or adverse actions related to their therapeutic uses.

Keywords: Beta-Sitosterol. Phytosterols. Oxyphytosterols. Cell morphology.

Cytoskeleton.

1. INTRODUÇÃO

Os fitoesteróis são compostos esteróides com propriedades bioativas, sendo o β -sitosterol (β Sito) um dos mais abundantes e largamente distribuído em óleos vegetais, sementes, grãos, frutas, alimentos enriquecidos e suplementos nutricionais (CHENG *et al.*, 2020), sendo os esteróis predominantes na dieta humana o β -Sitosterol (β Sito), Campesterol e o Estigmasterol (LIANG *et al.*, 2011). A capacidade em reduzir os riscos de desenvolvimento de aterosclerose, pela inibição da absorção intestinal de colesterol, tem contribuído para o aumento no consumo de esteróis vegetais (LIANG *et al.*, 2011). Estima-se que a ingestão humana diária de fitoesteróis é de aproximadamente 40 a 400 mg, variando de acordo com os hábitos alimentares de cada região (OSTLUND, 2002).

Os fitoesteróis, por apresentarem o anel esteroide comum com quatro anéis e um grupo hidroxila na posição 3β do carbono 3 (C3), são semelhantes ao colesterol. As diferenças estruturais são encontradas principalmente na substituição da cadeia lateral em C24 com a presença do grupo metila ou etila (HOVENKAMP *et al.*, 2008). Devido a sua estrutura química, os fitoesteróis são propensos à oxidação por espécies reativas de oxigênio, gerando os oxifitoesteróis ou produtos oxidados de fitoesteróis (LIANG *et al.*, 2011; LÜTJOHANN, 2004). Essa reação de oxidação pode ocorrer no processamento e armazenamento de alimentos e possivelmente no organismo humano após sua ingestão (LIN; KNOL; TRAUTWEIN, 2016; O'CALLAGHAN; MCCARTHY; O'BRIEN, 2014).

Embora tenha semelhança estrutural ao colesterol, os fitoesteróis apresentam menor biodisponibilidade oral em relação ao colesterol, sendo em torno de 5% a 10% do total consumido absorvido via intestinal, enquanto a absorção de colesterol é de 45% a 54% do total ingerido (CAO *et al.*, 2023; CHAN *et al.*, 2006). A concentração plasmática média de β Sito, principal fitoesterol encontrado em alimentos, é de aproximadamente 8 μ M/L (CHAN *et al.*, 2006).

β Sito é o fitoesterol mais abundante (WOYENGO; RAMPRASATH; JONES, 2009) e vários oxifitoesteróis derivados da sua oxidação como 7α -OH-Sitosterol, 7β -OH-Sitosterol, α -epoxi-Sitosterol, β -epoxi-Sitosterol e 7-keto-Sitosterol já foram

caracterizados e descritos em literatura (Figura 1) (HOVENKAMP *et al.*, 2008; TOMOYORI *et al.*, 2004).

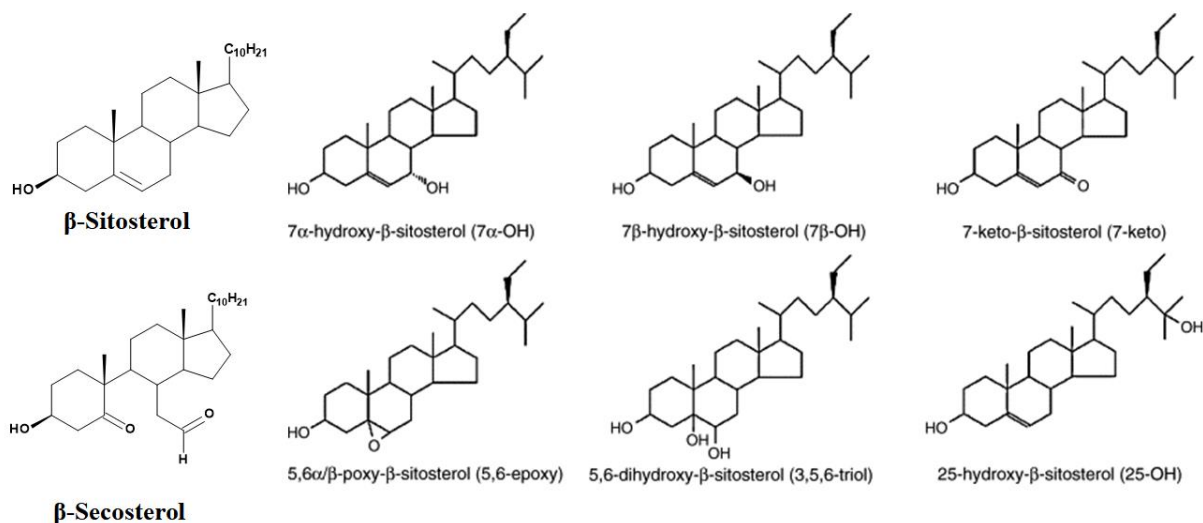


Figura 1 - Estrutura química dos diferentes óxidos do β -Sitosterol.
Fonte: Rozner; Garti, 2006. Modificado.

1.1. Efeitos biológicos e mecanismos de ação do β -Sitosterol e oxifitoesteróis

Estudos relatam que o β Sito, além de diminuir o nível da lipoproteína de colesterol de baixa densidade (LDL), também se mostra como um potencial fitoquímico anticancerígeno, exibindo efeitos inibitórios significativos na proliferação de várias linhagens celulares de câncer estabelecidas *in vitro* e *in vivo* (CAO *et al.*, 2023). β Sito induz apoptose em várias linhagens celulares, como câncer de cólon (AWAD *et al.*, 1996), de próstata (RAMPRASATH; AWAD, 2015), de mama (AWAD; DOWNIE; FINK, 2000) e gástrico (SHIN *et al.*, 2018). Em células de linfoma histiocítico difuso (U937) e de leucemia promielocítica aguda (HL60) quando expostas ao β Sito (10, 20 ou 30 μ M) por 48h, houve indução dose-dependente no bloqueio do ciclo celular em fase G2/M e endorreduplicação após 72 h, sendo observado que as células endorreduplicadas sofreram apoptose (MOON *et al.*, 2008). Quando em concentração de 16 μ M, o β Sito é capaz de inibir em 70 % o crescimento de células de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231) e causar parada do ciclo celular na fase G2/M (AWAD; WILLIAMS; FINK, 2001). Interessantemente, β Sito parece não apresentar citotoxicidade em células de origem não tumorais, como L132 de pulmão (RAJAVEL *et al.*, 2017).

As características farmacológicas potenciais de β Sito já descritas são ação anti-inflamatória, efeito hipolipemiante, antiaterosclerótico, hepatoprotetor, antitumoral, antidiabético (BAO *et al.*, 2022), entre outras. Embora β Sito apresente potenciais efeitos na prevenção e tratamento do câncer, ainda não é conhecido os mecanismos exatos pelos quais ele atua (CAO *et al.*, 2023). No entanto, seus mecanismos antitumorais podem incluir, indução da apoptose celular, causar a parada do ciclo celular, regular o estresse oxidativo de maneira bidirecional, melhorar a reprogramação metabólica, inibir a invasão e metástase, estimular a modulação da imunidade e inflamação, além de auxiliar no combate à resistência aos medicamentos (CAO *et al.*, 2023). Embora possa exercer vários benefícios, β Sito é propenso a oxidação, resultando nos oxifitoesteróis (SCHOLZ *et al.*, 2015).

Os oxifitoesteróis detectados no plasma e tecidos humanos (GRANDGIRARD *et al.*, 2004), podem advir da ingestão alimentar ou pela formação endógena resultante da oxidação de fitoesteróis, embora ainda não seja clara como ocorre sua formação *in vivo* (WANG; LU, 2018). Em modelo experimental de camundongo, Baumgartner *et al.* relataram que apesar de altas concentrações plasmáticas de fitoesteróis, apenas no tecido hepático houve aumento na concentração de oxifitoesteróis, indicando potencial formação no fígado e que a presença plasmática desses produtos seja em consequência do transbordamento hepático para a circulação (BAUMGARTNER *et al.*, 2022).

Alguns estudos indicam que os oxifitoesteróis podem contribuir para processos patológicos da aterosclerose (LIN; KNOL; TRAUTWEIN, 2016). Investigações feitas por Liang *et al.* (2011), demonstraram que camundongos submetidos a uma dieta contendo 0,1 % de β -Sitosterol durante seis semanas, apresentaram redução do colesterol total plasmático, de LDL colesterol e diminuição de triacilgliceróis, no entanto, quando usadas dietas contendo 0,1 % de seus produtos de oxidação, houve perda na capacidade anti-aterosclerótica (LIANG *et al.*, 2011). Plat *et al.* (2014) indicaram que camundongos com deficiência em receptores de LDL (LDLR +/-) tiveram o agravamento do processo aterosclerótico quando submetidos a uma dieta rica em oxifitoesteróis durante 35 semanas (PLAT *et al.*, 2014). Yang *et al.* (2013) mostraram que produtos oxidados de β Sito parecem diminuir o relaxamento vascular através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da regulação positiva da COX-2, indicando comprometimento na funcionalidade da aorta (YANG *et al.*, 2013).

Por outro lado, há outros relatos que demonstram que os produtos de oxidação apresentam citotoxicidade, promovem a apoptose celular (ROUSSI *et al.*, 2005; RYAN *et al.*, 2005), disfunção mitocondrial, estresse oxidativo (ROUSSI *et al.*, 2007), modulam a inflamação (ALEMANY *et al.*, 2012) e apresentam atividade antiviral (DOS SANTOS SOUZA MARINHO *et al.*, 2016). Além de possível ação antiproliferativa em várias linhagens celulares de origem tumoral (HOVENKAMP *et al.*, 2008), assim como demonstrado em estudos com 7 α -OH-Sitosterol, 7 β -OH-Sitosterol, α -epoxi-Sitosterol, β -epoxi-Sitosterol e 7-Keto-Sitosterol, em que apresentam efeitos em linhagens tumorais, podendo causar efeitos citotóxicos, ter ação pró-inflamatória, causar a disfunção mitocondrial, depleção de glutathiona, estresse oxidativo e indução da apoptose (HOVENKAMP *et al.*, 2008). Os compostos 7 β -OH-Sitosterol e 7-keto-Sitosterol apresentam citotoxicidade em células de adenocarcinoma colorretal (CaCo-2), de linfoma histiocítico (U937) e de hepatocarcinoma (HepG2) (RYAN *et al.*, 2005), havendo evidências também de que o 7-keto-Sitosterol causa aumento na produção de ROS e induz apoptose em células HepG2 (KOSCHUTNIG *et al.*, 2009). O 7 α -OH-Sitosterol têm efeito citotóxico em concentrações de 0,5 até 80 μ M em células HepG2, em linhagem celular de câncer oral (HSC-4) e de câncer de mama (MCF-7), após 24 h de exposição demonstrando ser concentração e tempo dependente. Em células endoteliais microvasculares dérmicas (HMEC) não foi perceptível efeito citotóxico significativo (TASYRIQ *et al.*, 2012).

Embora muitos trabalhos estejam associados aos efeitos biológicos dos oxifitoesteróis em células tumorais, pouco se sabe sobre seus efeitos no ciclo celular, na morfologia celular e organização do citoesqueleto e adesão celular.

1.2. Ozônio como agente oxidante do β -Sitosterol

O ozônio (O₃) apresenta forte potencial oxidativo e é muito utilizado como agente sanitizante por indústria agroalimentares e de processamento de alimentos (MODESTI *et al.*, 2021). Apesar de O₃ ser naturalmente presente na estratosfera, seu aumento tem sido detectado na troposfera, principalmente em áreas urbanas, em consequência ao aumento da poluição (ABDUL AZIZ; RAHMAN; MOHD ALI, 2019). Considerando esses fatores somados ao aumento no consumo de alimentos enriquecidos com fitoesteróis, maiores são as chances de formação de oxifitoesteróis

em alimentos através da oxidação pelo ozônio. A síntese, isolamento e caracterização química de oxifitoesteróis gerados por esta via de oxidação, foram relatadas por Martin *et al.* (Figura 2), mostrando β -Secosterol como principal produto (MARTINS *et al.*, 2020). Nossos estudos anteriores demonstraram que β Sec causa diminuição na viabilidade de células hepáticas tumorais HepG2, além de provocar alterações morfológicas e nucleares, e promover parada em fase G0/G1 do ciclo celular (TAKAYASU *et al.*, 2020).

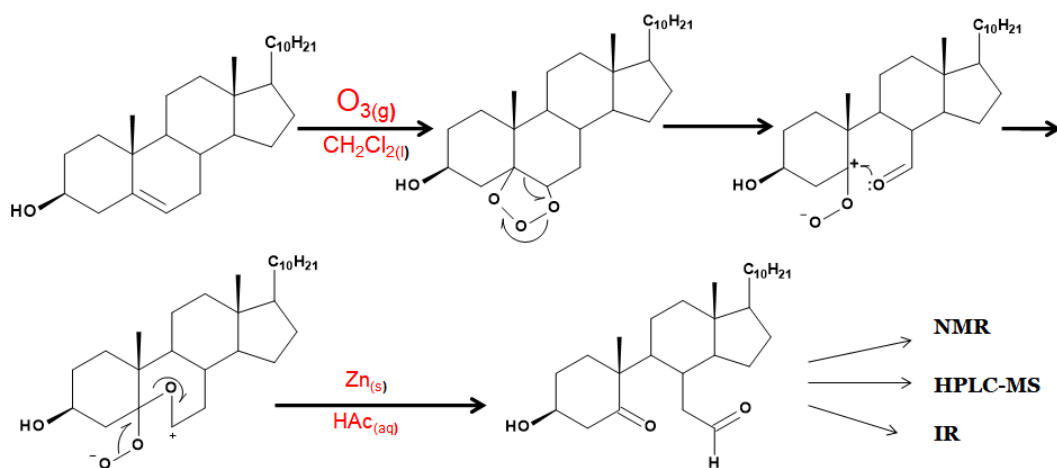


Figura 2 - Reação de oxidação do β -Sitosterol pela ozonização.
Fonte: Martins *et al.*, 2020.

1.1. Ciclo celular

O ciclo celular ocorre por uma sequência ordenada de eventos em uma célula para duplicar seu material genético e se dividir, produzindo novas células-filhas (BARNUM; O'CONNELL, 2014). O controle da duplicação celular é regulado por proteínas que conferem a integridade genética prevenindo a propagação de danos no DNA (OTTO; SICINSKI, 2017).

A progressão do ciclo celular é caracterizada por quatro fases distintas e sequenciais, sendo elas G0/G1 (gap0/gap1), S (síntese), G2 (gap2) e M (mitose) (WANG, 2022). As células de muitos tecidos adultos são encontradas em um estado não proliferativo denominado G0, podendo ser momentâneo (estado de quiescência),

ou permanente, seguido de diferenciação terminal ou senescência (OTTO; SICINSKI, 2017).

Para células eucariontes, a replicação do DNA ocorre na fase S do ciclo celular, enquanto a segregação dos cromossomos homólogos são vistos na mitose (BARNUM; O'CONNELL, 2014). As fases S e M são separadas pelas fases G1 e G2, caracterizadas por serem um período de atividade elevada, com obtenção de massa, crescimento, organização do genoma duplicado e preparo para a segregação cromossômica (BARNUM; O'CONNELL, 2014). As fases do ciclo celular são reguladas e impulsionadas por proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), sendo ciclicamente ativadas, formando complexos com as ciclinas correspondentes (OTTO; SICINSKI, 2017).

Para que se inicie o ciclo celular, as células quiescentes são estimuladas por fatores mitogênicos que ativam uma série de cascatas de sinalização intracelular que resultam na indução de várias proteínas, assim como o aumento nos níveis de ciclinas do tipo D e consequente formação de complexos ativos de ciclinas D e CDKs 4 e 6 (OTTO; SICINSKI, 2017). O controle positivo da atividade de CDK4 e 6 é realizada pela ligação de ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3), enquanto sua inibição ocorre pela ligação de inibidores de CDK da família INK4, composta por p16^{INK4A}, p15^{INKB}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D} (MALUMBRES; BARBACID, 2001). O complexo ciclina D-CDK4/6 sequestra inibidores de CDKs, como p21^{CIP1} e p27^{KIP1}, que inibem a ativação de ciclina E-CDK2, além de fosforilarem inúmeros alvos celulares, entre eles a proteína supressora de tumor de retinoblastoma (pRb), permitindo a liberação do fator de transcrição E2F e consequente ativação de genes relacionados com a progressão do ciclo celular de G1 para S, síntese de DNA, elementos estruturais da cromatina, segregação dos cromossomos e genes associados ao ponto de verificação de montagem do fuso mitótico (OTTO; SICINSKI, 2017). E2F também aumenta a transcrição de ciclinas E1 e E2, que formam complexos com CDK2 e auxiliam na hiperfosforilação de pRb (BARNUM; O'CONNELL, 2014). Na fase S, ocorre a rápida degradação de ciclina E por ubiquitinação e CDK2, agora livre, se complexa com ciclina A2 recém sintetizada, atuando na fase S e G2 (OTTO; SICINSKI, 2017). Na fase G2, há ligação da CDK1 à ciclinas A2 e B e após a entrada em mitose, ocorre a degradação de ciclina A2 com a manutenção do complexo ciclina B-CDK1, relevante tanto para o início da mitose quanto para condução de vários eventos mitóticos

(BARNUM; O'CONNELL, 2014). No período tardio da mitose, há degradação da ciclina B, diminuindo a atividade de CDK1, contribuindo para segregação cromossômica com a finalização da mitose, seguida pela citocinese (GAVET; PINES, 2010).

Durante o processo carcinogênico, há desregulação na progressão e controle do ciclo celular e em vias de sinalização correlatas, provocada por mutações em genes responsáveis pela codificação de proteínas reguladoras do ciclo (BARNUM; O'CONNELL, 2014).

1.2. Citoesqueleto de microtúbulos e microfilamentos

Os microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários formam o citoesqueleto (FLETCHER; MULLINS, 2010). Os microtúbulos são polímeros constituídos por heterodímeros de α e β -tubulina que associados formam os protofilamentos e a associação de treze protofilamentos dão origem a sua estrutura cilíndrica e oca (BROUHARD; RICE, 2014). Seus heterodímeros apresentam instabilidade dinâmica com capacidade de polimerizar e despolimerizar rapidamente, sofrendo a rápida remodelação do citoesqueleto ao longo do ciclo celular (BROUHARD; RICE, 2014; NOGALES, 2001). Os microtúbulos desempenham papel importante na montagem do fuso mitótico, transporte intracelular, posicionamento de organelas, sinalização célula-célula, motilidade e manutenção da estrutura celular (FLETCHER; MULLINS, 2010).

Os filamentos de actina ou microfilamentos, juntamente com os microtúbulos, exercem funções relevantes na proliferação, migração, diferenciação e apoptose celular, além de fornecerem estabilidade mecânica às células e mediar respostas à estímulos mecânicos externos (KUBITSCHKE et al., 2017). A actina é uma das proteínas encontrada em maior quantidade nas células, estando presente na forma de monômero livre e esférico (G-actina), ou na forma polimérica formando microfilamentos de dupla hélice linear e filamentosa (f-actina) (REN et al., 2021).

O citoesqueleto de actina possui uma dinâmica espacial e temporal que possibilita mudanças rápidas em resposta à diferentes estímulos fisiológicos ou patológicos, de modo que a alteração da sua distribuição, equilíbrio ou dinâmica do

pool de actina, está associada com diversas patologias, como o envelhecimento e câncer (REN et al., 2021).

Muitos agentes quimioterápicos apresentam a capacidade de se ligarem aos microtúbulos (MT), modificando a polimerização e a sua dinâmica, resultando no bloqueio da mitose e consequente morte celular (PAIER et al., 2018). Esses agentes são representados, predominantemente, por compostos naturais extraídos de plantas, esponjas marinhas ou bactérias, além de seus derivados sintéticos (BOIARSKA; PASSARELLA, 2021). Os agentes direcionados aos microtúbulos são classificados em estabilizadores ou desestabilizadores (DUMONTET; JORDAN, 2010). Os agentes estabilizadores, assim como taxanos, são caracterizados por promoverem a polimerização dos microtúbulos, enquanto os agentes desestabilizadores, como alcaloides da vinca ou de ligação ao local da colchicina, promovem a despolimerização dos microtúbulos (PAIER et al., 2018). Alterações na instabilidade dinâmica dos microtúbulos (montagem e desmontagem), acarretam em mudanças conformacionais às células, podendo resultar em morte celular (BOIARSKA; PASSARELLA, 2021). Assim como observado para os microtúbulos, toxinas naturais também podem provocar a despolimerização (citocalasinas, latrunculinas e toxinas botulínicas) ou a polimerização (jasplakinolide) dos filamentos de actina (LÁZARO-DIÉGUEZ et al., 2008).

1.3. Adesão focal

As adesões focais são formadas por complexos proteicos que permitem a adesão células-matriz, através da ligação do citoesqueleto à matriz extracelular (MEC), sendo mediada por receptores transmembrana denominadas integrinas (LEGERSTEE; HOUTSMULLER, 2021). Esse tipo de adesão apresenta função relevante na sinalização celular, migração celular, progressão do ciclo celular, proliferação, diferenciação e reparação (MISHRA; MANAVATHI, 2021). As adesões focais são complexos dinâmicos, em contínua formação e desmonte (LEGERSTEE; HOUTSMULLER, 2021).

A formação de adesões focais se dá pela ligação inicial de integrinas à MEC, induzindo seu agrupamento e formando pequenos aglomerados modulares que

resultam na ativação desses receptores transmembrana (LEGERSTEE; HOUTSMULLER, 2021). Em seguida, na porção intracelular, há o recrutamento de inúmeras proteínas adaptadoras diferentes, assim como a talina, paxilina e vinculina que auxiliam o recrutamento de outras proteínas, promovendo a ligação com a fibra de estresse de actina (LEGERSTEE; HOUTSMULLER, 2021). Foi observado por microscopia de super resolução que a ligação dessas proteínas se organiza em uma nanoarquitetura dividida em três camadas paralelas, constituídas por uma porção de sinalização de integrina direcionada à membrana, uma porção intermediária de ligação à actina e uma porção superior reguladora da actina (BAYS; DEMALI, 2017). A vinculina é inicialmente encontrada na porção sinalizadora, porém logo após, é direcionada para a porção de ligação à actina, facilitando o recrutamento de outras proteínas com função de regular a dinâmica de adesão focal, favorecendo a migração celular (BAYS; DEMALI, 2017).

6. CONCLUSÕES

β Sito não mostrou efeitos significativos na viabilidade celular (quando medida pelo azul de tripano e pela marcação fluorescente), no ciclo celular e não provocou alterações na morfologia celular das duas linhagens celulares. Opostamente, β Sec promoveu diminuição significativa na viabilidade celular, parada do ciclo celular em fase G0/G1, alterações morfológicas com desorganização das redes de microtúbulos e microfilamentos, além de induzir alteração na adesão celular de células BRL-3A e HTC. Embora β Sec tenha provocado efeitos em células tumorais e não tumorais, é importante ressaltar que células HTC mostraram maior sensibilidade ao composto quando comparado às células BRL-3A, uma vez que foi necessária menor concentração para observar os efeitos. Observamos também, que β Sec atuou de maneira reversível, com exceção da morfologia celular de células não tumorais, indicando que o oxifitoesterol tenha efeitos mais duradouros em células BRL-3A.

Deste modo, nossos resultados demonstraram que β Sito não promoveu citotoxicidade em células BRL-3A e HTC, enquanto seu oxifitoesterol β Sec apresentou efeitos tóxicos nas duas linhagens celulares, sendo mais acentuado na morfologia celular de células não tumorais.

Em conclusão, este trabalho contribui para melhor compreender potenciais ações benéficas ou adversas relacionadas aos usos terapêuticos de fitoesteróis e oxifitoesteróis.

REFERÊNCIAS

AAT BIOQUEST, I. **Quest Graph™ IC50 Calculator**. Disponível em: <<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>>. Acesso em: 21 out. 2019.

ABDUL AZIZ, F. A. B.; RAHMAN, N.; MOHD ALI, J. Tropospheric ozone formation estimation in Urban City, Bangi, Using Artificial Neural Network (ANN). **Computational Intelligence and Neuroscience**, v. 2019, p. 1–10, 2019.

ALEMANY, L. et al. Evaluation of the cytotoxic effect of 7keto-stigmasterol and 7keto-cholesterol in human intestinal (Caco-2) cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3106–3113, 2012.

AWAD, A. B. et al. β -sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. **Anticancer Research**, v. 16, n. 5 A, p. 2797–2804, set. 1996.

AWAD, A. B.; DOWNIE, A. C.; FINK, C. S. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. **International journal of molecular medicine**, v. 5, n. 5, p. 541–545, 2000.

AWAD, A. B.; WILLIAMS, H.; FINK, C. S. Phytosterols Reduce In Vitro Metastatic Ability of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 40, n. 2, p. 157–164, maio 2001.

BAO, X. et al. Molecular Mechanism of β -Sitosterol and its Derivatives in Tumor Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 12, n. June, p. 1–12, 2022.

BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods in Molecular Biology**, v. 1170, p. 29–40, 2014.

BAUMGARTNER, S. et al. Plasma oxyphytosterols most likely originate from hepatic oxidation and subsequent spill-over in the circulation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 216, 1 fev. 2022.

BAYS, J. L.; DEMALI, K. A. Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2999–3009, 2017.

BOIARSKA, Z.; PASSARELLA, D. Microtubule-targeting agents and neurodegeneration. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 2, p. 604–615, 2021.

BROUHARD, G. J.; RICE, L. M. The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. **Journal of Cell Biology**, v. 207, n. 3, p. 323–334, 2014.

CAO, Z. QI et al. β -Sitosterol as a Promising Anticancer Agent for Chemoprevention and Chemotherapy: Mechanisms of Action and Future Prospects. **European Journal of Pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 1–15, 2023.

CHAN, Y.-M. M. et al. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 9, p. 385–402, 2006.

CHAZOTTE, B. Labeling nuclear DNA with Hoechst 33342. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 6, n. 1, p. 83–86, 2011.

CHEN, S. et al. Roles of focal adhesion proteins in skeleton and diseases. **Acta**

Pharmaceutica Sinica B, v. 13, n. 3, p. 998–1013, 2023.

CHENG, Y. et al. Dietary β -sitosterol regulates serum lipid level and improves immune function, antioxidant status, and intestinal morphology in broilers. **Poultry Science**, v. 99, n. 3, p. 1400–1408, 2020.

DANESI, F. et al. Phytosterol supplementation reduces metabolic activity and slows cell growth in cultured rat cardiomyocytes. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 4, p. 540–548, 2011.

DOS SANTOS SOUZA MARINHO, R. et al. Antiviral activity of 7-ketostigmaterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispa* against equine herpesvirus 1. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 555–562, fev. 2016.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 790–803, 2010.

FLETCHER, D. A.; MULLINS, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 485–492, 2010.

GAVET, O.; PINES, J. Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis. **Developmental Cell**, v. 18, n. 4, p. 533–543, 2010.

GOODE, B. L.; DRUBIN, D. G.; BARNES, G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 63–71, 2000.

GRANDGIRARD, A. et al. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 101–106, 2004.

HOVENKAMP, E. et al. Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 1, p. 37–49, 2008.

IONTA, M. et al. 7-Epiclusianone, a benzophenone extracted from *Garcinia brasiliensis* (Cusciaceae), induces cell cycle arrest in G1/S transition in A549 cells. **Molecules**, v. 20, p. 12804–12816, 2015.

KIM, J. S. et al. Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 25, n. 2, p. 90–94, 2011.

KOSCHUTNIG, K. et al. Cytotoxic and apoptotic effects of single and mixed oxides of beta-sitosterol on HepG2-cells. **Toxicology in vitro**, v. 23, n. 5, p. 755–762, 2009.

KUBITSCHKE, H. et al. Actin and microtubule networks contribute differently to cell response for small and large strains. **New Journal of Physics**, v. 19, n. 9, 2017.

LÁZARO-DIÉGUEZ, F. et al. Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 9, p. 1415–1425, 2008.

LEGERSTEE, K.; HOUTSMULLER, A. B. A layered view on focal adhesions. **Biology**, v. 10, n. 11, 2021.

LEMA, C.; VARELA-RAMIREZ, A.; AGUILERA, R. J. Differential nuclear

staining assay for high-throughput screening to identify cytotoxic compounds. **Curr Cell Biochem**, v. 1, n. 1, p. 1–14, 2011.

LIANG, Y. T. et al. Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 1, p. 124–133, nov. 2011.

LIN, Y.; KNOL, D.; TRAUTWEIN, E. A. Phytosterol oxidation products (POP) in foods with added phytosterols and estimation of their daily intake: A literature review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 10, p. 1423–1438, 2016.

LIZARD, G. Invited Commentary Impact of phytosterols on mitochondrial functions. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 461–462, 2011.

LÜTJOHANN, D. Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols. **Br J Nutr**, v. 91, n. 1, p. 3–4, 2004.

MAHADDALKAR, T. et al. Biochemical characterization and molecular dynamic simulation of β -sitosterol as a tubulin-binding anticancer agent. **European Journal of Pharmacology**, v. 760, p. 154–162, 5 ago. 2015.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222–231, 2001.

MARTINS, I. R. et al. Characterization of oxyphytosterols generated by β -sitosterol ozonization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 689, n. April, p. 108472, 2020.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 74–88, 2022.

MISHRA, Y. G.; MANAVATHI, B. Focal adhesion dynamics in cellular function and disease. **Cellular Signalling**, v. 85, n. May, p. 110046, 2021.

MODESTI, M. et al. Ozone and bioactive compounds in grapes and wine. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2021.

MONTALTO, F. I.; DE AMICIS, F. Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2020.

MOON, D.-O. et al. β -Sitosterol induces G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis through the Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathways. **Cancer Letters**, v. 264, n. 2, p. 181–191, 18 jun. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NEUMEISTER, P. et al. Cyclin D1 Governs Adhesion and Motility of Macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. June, p. 1977–2000, 2003.

NOGALES, E. Structural insights into microtubules function. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 30, p. 397–420, 2001.

O'CALLAGHAN, Y.; MCCARTHY, F. O.; O'BRIEN, N. M. Recent advances in

Phytosterol Oxidation Products. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 3, p. 786–791, 2014.

OSTLUND, R. E. PHYTOSTEROLS IN HUMAN NUTRITION. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.020702.075220>, v. 22, p. 533–549, 28 nov. 2002.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 48, n. 0, p. 93–115, 2017.

PAIER, C. R. K. et al. Natural products as new antimetabolic compounds for anticancer drug development. **Clinics**, v. 73, p. 1–11, 2018.

PENNYCOOK, B. R.; BARR, A. R. Restriction point regulation at the crossroads between quiescence and cell proliferation. **FEBS Letters**, v. 594, n. 13, p. 2046–2060, 2020.

PLAT, J. et al. Protective role of plant sterol and stanol esters in liver inflammation: Insights from mice and humans e110758. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–11, 2014.

PRADHAN, M. et al. Elucidation of the anticancer potential and tubulin isotype-specific interactions of β -sitosterol. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 1, p. 195–208, 2018.

RAI, Y. et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 531, 2018.

RAJAVEL, T. et al. Beta sitosterol and Daucosterol (phytosterols identified in *Grewia tiliaefolia*) perturbs cell cycle and induces apoptotic cell death in A549 cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017.

RAJAVEL, T. et al. β -Sitosterol targets Trx/Trx1 reductase to induce apoptosis in A549 cells via ROS mediated mitochondrial dysregulation and p53 activation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

RAMPRASATH, V. R.; AWAD, A. B. Role of phytosterols in cancer prevention and treatment. **Journal of AOAC International**, 2015.

RANGEL, M. et al. Cytoskeleton alterations induced by *Geodia corticostylifera* depsipeptides in breast cancer cells. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2047–2057, 2006.

REN, W. et al. Involvement of the Actin Machinery in Programmed Cell Death. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 634849, 2021.

ROSKOSKI, R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. **Pharmacological Research**, v. 107, p. 249–275, 2016.

ROUSSI, S. et al. Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7β -hydroxysitosterol and 7β -hydroxycholesterol in human colon cancer cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 2, p. 128–135, 19 fev. 2005.

ROUSSI, S. et al. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7β -hydroxysitosterol and 7β -hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. **Apoptosis**, v. 12, p. 87–96, 2007.

RUBIS, B. et al. Phytosterols in Physiological Concentrations Target Multidrug Resistant Cancer Cells. **Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 184–190, jun. 2010.

RYAN, E. et al. Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 3, p. 443–451, set. 2005.

RYAN, L.; O'CALLAGHAN, Y. C.; O'BRIEN, N. M. The role of the mitochondria in apoptosis induced by 7 β -hydroxycholesterol and cholesterol-5 β ,6 β -epoxide. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 4, p. 519–525, out. 2005.

SCHOLZ, B. et al. Phytosterol oxidation products in enriched foods: Occurrence, exposure, and biological effects. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2015.

SHAHZAD, N. et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 786–794, 2017.

SHI, C.; WU, F.; XU, J. Incorporation of β -sitosterol into mitochondrial membrane enhances mitochondrial function by promoting inner mitochondrial membrane fluidity. **Journal of Bioenergetic and Biomembranes**, v. 45, p. 301–305, 2013.

SHIEH, S. Y. et al. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate, p53 at multiple DNA damage-inducible sites. **Genes and Development**, v. 14, n. 3, p. 289–300, 2000.

SHIN, E. J. et al. Anti-tumour effects of beta-sitosterol are mediated by AMPK/PTEN/HSP90 axis in AGS human gastric adenocarcinoma cells and xenograft mouse models. **Biochemical Pharmacology**, v. 152, p. 60–70, 1 jun. 2018.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., v. 21p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.

SUNDARAM, M. et al. Neosis: A novel type of cell division in cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 3, n. 2, p. 207–218, 2004.

TAKAYASU, B. S. et al. Biological effects of an oxyphytosterol generated by β -Sitosterol ozonization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 696, 2020.

TASYRIQ, M. et al. 7 α -hydroxy- β -sitosterol from chisocheton tomentosus induces apoptosis via dysregulation of cellular Bax/Bcl-2 ratio and cell cycle arrest by downregulating ERK1/2 activation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

TOMOYORI, H. et al. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Biochemical and Molecular Actions of Nutrients**, v. 134, n. 7, p. 1690–1696, 1 jul. 2004.

VUNDRU, S. S.; KALE, R. K.; SINGH, R. P. β -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, jun. 2013.

WANG, M.; LU, B. How do oxyphytosterols affect human health? **Trends in**

Food Science & Technology, v. 79, p. 148–159, 2018.

WANG, Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 2579, p. 3–23, 2022.

WOYENGO, T. A.; RAMPRASATH, V. R.; JONES, P. J. H. Anticancer effects of phytosterols. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 7, p. 813–820, 2009.

YANG, C. et al. β -Sitosterol oxidation products attenuate vasorelaxation by increasing reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Cardiovascular Research**, 2013.

ZHANG, Z. et al. Irradiation-induced polyploid giant cancer cells are involved in tumor cell repopulation via neosis. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 8, p. 2219–2234, 2021.