

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

QUIMIOPREVENÇÃO DO CARCINOMA HEPATOCELULAR COM COMPOSTOS
BIOATIVOS DOS ALIMENTOS: O POTENCIAL DO SULFORAFANO E SUAS
PERSPECTIVAS REVISADAS

Thifany da Silva Ribeiro

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo.

Orientador:
Dr. Renato Heidor

São Paulo

2021

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas	2
RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5. CONCLUSÃO	59
6. BIBLIOGRAFIA	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
AST	Aspartato aminotransferase
C/EBP α	<i>CCAAT/Enhancer-binding protein α</i>
ChE	<i>Cholinesterase</i>
CHOP	<i>C/EBP Homologous protein</i>
CPT	Carnitina palmitoil transferase
CYP	Citocromo
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S transferase
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HO-1	Heme oxygenase-1

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KEAP-1	<i>Kelch like ECH associated protein -1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
NAFLD	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	<i>Nonalcoholic Steatohepatitis</i>
NDMA	N-nitrosodimetilamina
NIH	<i>National Cancer Institute</i>
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
NQO1	NAD(P)H quinona oxidorreductase-1
MTTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SBH	Sociedade Brasileira de Hepatologia
STAT 3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
sMAF	<i>Small musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta 1</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TNF-R	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRL4	<i>Toll like receptor 4</i>
UGT	Uridino-glucuronosiltransferase

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Receptor vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i>
γ -GTP	<i>Gamma-glutamyl transpeptidase</i>

RESUMO

RIBEIRO, T.S. **Quimioprevenção do carcinoma hepatocelular com compostos bioativos dos alimentos: o potencial do sulforafano e suas perspectivas revisadas.** 2021. 72 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Palavras-chave: câncer de fígado, hepatocarcinoma, quimioprevenção do câncer, isotiocianatos.

INTRODUÇÃO: O câncer de fígado, e conseqüentemente, sua manifestação mais comum, o carcinoma hepatocelular (HCC), atualmente é um grande desafio para saúde pública. Sendo considerada a quarta principal causa de morte relacionada ao câncer, com tendência em 2030 de alcançar a terceira posição, a patologia impacta principalmente os países mais pobres, com menor capacidade de diagnóstico precoce e de tratamento adequado. Apesar de existir algumas opções terapêuticas contra o HCC, elas apresentam importantes limitações, que envolvem o alto custo e o fato de serem eficientes apenas nos estágios iniciais ou intermediários da doença. Nesse sentido, cada vez mais, é de extrema importância a implementação de medidas de caráter preventivo contra o HCC. A quimioprevenção do câncer com compostos bioativos dos alimentos é uma destas abordagens, que atua controlando as diferentes fases da carcinogênese. Além disso, ela pode ter boa aceitabilidade e ser de fácil acesso à maioria das pessoas. O sulforafano, composto presente em alimentos como brócolis, apresenta ação quimiopreventiva comprovada em algumas neoplasias, como é o caso do câncer colorretal, de mama, de bexiga, de próstata e de tireoide. **OBJETIVO:** Revisar e discutir o potencial uso do sulforafano como agente quimiopreventivo contra o carcinoma hepatocelular. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa dos artigos que contemplavam o tema proposto das bases de dados US National Library of Medicine – National Institutes of Health (Pubmed) e Scopus. Foram considerados 26 artigos originais publicados na língua inglesa durante os últimos 20 anos que traziam informações sobre efeitos do sulforafano relacionados à ação anticâncer; e, que esclareceram durante o trabalho o tipo de estudo realizado (em células, em animais ou em humanos), a fonte e a dose do composto utilizada nos ensaios. Os resultados dos trabalhos selecionados foram organizados em 3 tabelas conforme o tipo de estudo. **RESULTADOS:** Foram observados efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do sulforafano que, contribuem para o bloqueio das fases iniciais da carcinogênese, através, por exemplo, da regulação da metabolização de compostos tóxicos, e, do controle do desenvolvimento de vários fatores etiológicos da neoplasia, como hepatite B e C, obesidade, NAFLD, NASH e exposição à aflatoxina. Além disso, o sulforafano também pôde ser relacionado com o controle da proliferação celular, característica da fase de promoção do câncer, através de mecanismos genéticos e epigenéticos. Na presença do composto, a apoptose também foi induzida através de diferentes vias. Contra a progressão do tumor, o isotiocianato apresentou ação anti-metastática atuando no controle da migração, da adesão celular e da angiogênese. **CONCLUSÃO:** O sulforafano modula vias classicamente desreguladas no câncer de fígado, que estão envolvidas em diferentes fases da carcinogênese. Essa atuação torna-o um agente quimiopreventivo eficaz em modelos experimentais. Mais estudos

ainda são necessários para avaliação da quantidade e da fonte adequada para o composto desempenhar seus efeitos quimiopreventivos de forma segura. Apesar disso, o alcance das concentrações fisiológicas mínimas para sua atividade quimiopreventiva se mostra potencialmente segura e viável.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de fígado é, atualmente, um grande desafio para a saúde pública. (LLOVET et al., 2021). Diferente da tendência de outras neoplasias, sua incidência tem aumentado ao longo dos anos e, em 2019, ele foi o sexto tipo de câncer com maior número de novos casos no mundo (CRAIG et al., 2019; YANG et al., 2019). O tumor maligno no fígado é considerado a quarta principal causa de morte relacionada ao câncer, com tendência em 2030 de alcançar a terceira posição (CRAIG et al., 2019; LLOVET et al., 2021; MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). Além disso, a sobrevivência depois de cinco anos com a doença é de apenas 18% (CRAIG et al., 2019; MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2030 mais de um milhão de pacientes morrerão devido a essa neoplasia (CARRILHO et al., 2019).

De acordo com a estimativa da IARC (do inglês International Agency for Research on Cancer), o câncer de fígado apresenta uma relação incidência/mortalidade de 1,1 (ARNOLD et al., 2020), o que o caracteriza de fato como uma doença de mau prognóstico (CRAIG et al., 2019). O prognóstico ruim do câncer de fígado é observado em todas as regiões do mundo, resultando em números de incidência e mortalidade quase equivalentes (MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). A América Latina, em 2018, concentrou 4,7% das mortes devido a esse câncer (CARRILHO et al., 2019) e no Brasil, essa neoplasia foi responsável pela morte de aproximadamente 10500 pessoas, sendo mais da metade homens (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020).

O câncer de fígado pode ser classificado em dois grandes grupos de acordo com órgão de origem da neoplasia. Quando é originado no próprio tecido hepático ele é denominado primário. Já quando apresenta origem extra-hepática, ou seja, se desenvolve a partir de metástases de tumores primários em outros órgãos, como o cólon, é classificado como secundário (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020). O carcinoma de fígado primário apresenta vários subtipos, porém o mais comum deles, representando mais de 80% das neoplasias deste grupo, é o carcinoma hepatocelular ou hepatocarcinoma (YANG et al., 2019). Estima-se que em 2025 mais de 1 milhão de pessoas serão afetadas anualmente por essa manifestação neoplásica hepática (LLOVET et al., 2021).

A principal etiologia do HCC (do inglês hepatocellular carcinoma) está relacionada à infecção crônica com os vírus das hepatites B (HBV) ou C (HCV), que corresponde a 80% dos casos globais desse câncer (YANG et al., 2019). Porém, mudanças na distribuição geográfica dos casos dessa condição patológica vieram acompanhadas com crescimento do número de pacientes com HCC, o que está associado a outros fatores de risco importantes para a doença, incluindo o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, a obesidade e o diabetes tipo 2 (CARRILHO et al., 2019; MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). Além disso, a exposição à aflatoxina, contaminante presente em alguns cereais e oleaginosas, também representa um fator de risco relevante para o HCC, uma vez que essa micotoxina apresenta importantes efeitos hepatocarcinogênicos (YANG et al., 2019).

Aproximadamente 85% dos casos de HCC ocorrem nos países da Ásia Oriental e da África Subsaariana (YANG et al., 2019). Na Coreia do Sul, China, América do Norte e na Europa, mais de 60% dos pacientes com HCC se encontram em estágio avançado. Além disso, na América Latina, apesar dos dados escassos, aventa-se que a proporção de diagnóstico feita em estágios avançados da doença, alcança 41% (YANG et al., 2019; CARRILHO et al., 2019).

Apesar de existir algumas opções para o tratamento do HCC, como a ressecção cirúrgica, o transplante de fígado, a ablação percutânea, o tratamento farmacológico, a embolização transarterial e a radioterapia, todas essas apresentam limitações, que incluem o fato de serem eficientes apenas nos estágios iniciais ou intermediários da doença. O transplante de fígado, por exemplo, é a melhor opção para o tratamento definitivo do HCC, mas sua realização só é efetiva nos estágios iniciais; a cirurgia de ressecção, mesmo sendo uma abordagem potencialmente curativa, em 70% dos casos, os pacientes apresentam recidiva do câncer (YANG et al., 2019). Quanto às terapias farmacológicas, o sorafenibe, um inibidor multi-quinase, foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration) para o tratamento do HCC em estágio avançado (SATO et al., 2018). Entretanto, a maioria dos pacientes tratados mostram progressão da doença (ARNOLD et al., 2020). Os danos hepáticos de pacientes com hepatocarcinoma afetam o metabolismo dos fármacos, o que intensifica os efeitos colaterais da quimioterapia e pode induzir resistência ao tratamento farmacológico (ZOU et al., 2016). Além disso, destaca-se o custo elevado e

a toxicidade envolvida nessa abordagem terapêutica (LIU et al., 2017). Algumas imunoterapias também são utilizadas para o tratamento do HCC, como o uso do atezolizumabe e bevacizumabe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020), porém a barreira da acessibilidade continua presente (HOU; WU, 2020). Dessa forma, o que se observa, é que apesar dos avanços nas condições de tratamento, a taxa de sobrevivência geral dos pacientes com HCC ainda não aumentou (SATHIPATI; HO, 2020).

É notável que a detecção precoce e a terapia adequada aumentam as chances de cura para pacientes com HCC (KANWAL; SINGAL, 2019). Entretanto, principalmente nos países mais pobres, nos quais se encontram a maioria dos casos de HCC, o diagnóstico da doença é tardio e as melhores formas de tratamento disponíveis consomem muitos recursos financeiros (YANG et al., 2019), exemplificando que o controle do câncer é de fato restringido pelas condições econômicas (BRAY et al., 2018). Por isso, nesse cenário onde a população dos países mais pobres não tem acesso nem ao tratamento adequado nem ao diagnóstico precoce, a implementação de medidas que visem à prevenção do carcinoma hepatocelular é de extrema importância, principalmente considerando que os fatores de risco associados ao HCC são potencialmente preveníveis (YANG et al., 2019).

A vacinação contra o HBV é um exemplo de abordagem preventiva contra o HCC que apresenta resultados positivos. Nesse sentido, um estudo populacional realizado em Taiwan demonstrou que a vacinação reduziu a incidência do HCC em quatro vezes no grupo de pessoas vacinadas quando comparado aos que não receberam a vacina (CHANG et al., 2016). Outro exemplo, é a diminuição à exposição de aflatoxina na dieta, que reduz a chance de manifestação da doença em cerca de 17%, ilustrando como a abordagem preventiva é eficaz (YANG et al., 2019), inclusive nos casos que exigem apenas mudanças de comportamentos alimentares.

Outra abordagem para o controle do câncer é a quimioprevenção. Ela consiste na utilização de compostos sintéticos ou naturais com a finalidade de reverter ou suprimir as múltiplas fases da carcinogênese (HEIDOR et al., 2020b). Cada uma dessas fases apresenta características morfológicas e moleculares distintas, o que permite a classificação do desenvolvimento do câncer em três grandes etapas: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, uma fase irreversível (PITOT, 2007), ocorrem poucas mutações em *drivers*, ou seja, alterações nos genes essenciais

para o processo de carcinogênese. Na hepatocarcinogênese, especificamente, alguns desses genes são aqueles envolvidos com o controle da proliferação celular e indução da apoptose, remodelamento da cromatina, inflamação e estresse oxidativo. Na promoção, uma etapa considerada reversível e lenta, ocorre à multiplicação das células iniciadas na etapa anterior, induzindo a formação de lesões pré-neoplásicas, devido à ação de agentes específicos, como fatores de crescimento, hormônios e xenobióticos. Por fim, a progressão é uma fase irreversível na qual as células de fato evoluem para o câncer e passam a ter como característica a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), a falta de oxigênio no ambiente celular (hipóxia) e a migração para outras regiões (metástase) (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HEIDOR et al., 2020a; HEIDOR et al., 2020b). Características da iniciação, promoção e progressão, no HCC, também estão associados às alterações epigenéticas, ou seja, às modificações da expressão gênica sem variação da sequência de DNA (MORENO; HEIDOR; POGRIBNY, 2016; HEIDOR et al., 2020b). Agentes quimiopreventivos com ação nas diferentes fases da carcinogênese podem então ser eficientes na prevenção do hepatocarcinoma (TROSKO, 2005). Consideram-se agentes quimiopreventivos bloqueadores aqueles que atuam na fase de iniciação do câncer e agentes supressores aqueles que inibem a promoção de células iniciadas às células pré-neoplásicas (HEIDOR et al., 2020b).

Muitos estudos mostram que nutrientes e compostos bioativos dos alimentos podem bloquear e suprimir a carcinogênese (HEIDOR et al., 2020b). Além disso, a alimentação é considerada uma fonte importante de agentes capazes de controlar o câncer, uma vez que já estão disponíveis alimentos com potencial quimiopreventivo que são acessíveis, de baixo custo, com toxicidade reduzida e com boa aceitação entre os consumidores (LIU et al., 2017). Por exemplo, vegetais da família *Cruciferae* ou *Brassicaceae*, como o brócolis, apresentam em sua composição um isotiocianato denominado sulforafano. Esse composto, além de considerado seguro para ingestão oral (SATO et al., 2018), apresenta ações antioxidantes e anti-inflamatórias (LIU et al., 2017) demonstradas em modelos experimentais (in vitro e in vivo) de artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, doenças cardiovasculares e diabetes (MAZARAKIS et al., 2020). Ademais, o sulforafano também apresenta efeito no sistema nervoso, tendo ação protetora contra vários distúrbios neurológicos por agir na via do Nrf2 (do inglês

nuclear factor erythroid 2-related factor 2), um fator de transcrição considerado regulador mestre da resposta antioxidante (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017).

Em relação ao câncer, o sulforafano demonstrou ter ação anticarcinogênica em algumas neoplasias, como é o caso do câncer colorretal, de mama, de bexiga, de próstata e de tireoide (SATO et al., 2020). Há estudos também que mostram que ele desempenha uma ação potencializadora de fármacos quimioterápicos em outros carcinomas, como o de cabeça e pescoço (ELKASHTY; TRAN, 2020).

Como agente quimiopreventivo, o sulforafano bloqueia e suprime a carcinogênese, agindo principalmente nas etapas de iniciação e de promoção (LIU et al., 2017). Ele inibe a atividade de enzimas relacionadas à ativação de carcinógenos, como a CYP1A1; bloqueia o ciclo celular; e ativa as vias de sinalização intrínseca e extrínseca da apoptose (morte celular), o que contribui para a manutenção do equilíbrio entre morte e proliferação celular, ausente nas neoplasias (KAMAL et al., 2020). Estudos também apontam que esse composto reduz a proliferação e a migração de células endoteliais suprimindo a angiogênese, processo cuja inibição é bem explorada na prevenção de HCC. Além disso, ainda nesse aspecto, in vivo, o sulforafano também inibe a expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial), uma das moléculas endógenas mais importantes no estímulo para formação de novos vasos sanguíneos, inclusive durante a hepatocarcinogênese (SATO et al., 2017).

Assim, considerando o mau prognóstico do HCC e as limitações terapêuticas para o seu tratamento, o presente trabalho, revisou e discutiu a quimioprevenção com sulforafano da hepatocarcinogênese. Foram abordados também os aspectos moleculares da ação desse composto bioativo e os impactos do consumo de alimentos fontes de sulforafano para o controle do carcinoma hepatocelular.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é revisar e discutir o potencial uso do sulforafano como agente quimiopreventivo contra o carcinoma hepatocelular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consiste em uma revisão bibliográfica narrativa da literatura (ROTHER, 2007). Dessa forma, foi realizada uma análise ampla dos artigos indexados nas bases de dados *US National Library of Medicine – National Institutes of Health* (PubMed) e Scopus, que contemplavam o tema proposto, ou seja, o potencial quimiopreventivo do sulforafano no carcinoma hepatocelular. Foram utilizadas como palavras chave para pesquisa inicial sobre o tema os termos “chemoprevention”, “sulforaphane”, “liver cancer”, “hepatocellular carcinoma”.

Os artigos encontrados durante a busca foram identificados inicialmente por seus títulos e resumos e os de interesse foram selecionados para a análise mais detalhada. Foram considerados 26 artigos originais, publicados na língua inglesa durante os últimos 20 anos, que traziam informações sobre efeitos do sulforafano relacionados à ação anticâncer; e, que esclareceram durante o trabalho o tipo de estudo realizado (em células, em animais ou em humanos), a fonte e a dose do composto utilizada nos ensaios. Foram excluídos da base bibliográfica além dos artigos que não apontavam ação, fonte ou dose utilizada do sulforafano, estudos *in vitro* publicados há mais de 10 anos e artigos redigidos em qualquer língua diferente do inglês.

Os resultados dos estudos selecionados foram organizados em 3 tabelas conforme os subgrupos de estudos: em células, em animais e em humanos. Os mecanismos de ação anticâncer do sulforafano encontrados nos estudos foram agrupados em 7 atividades biológicas: controle dos fatores de risco do câncer, atuação no metabolismo de compostos tóxicos, efeito antioxidante, efeito anti-inflamatório, inibição da proliferação celular, indução da morte celular e atividade anti-metastática.

Além disso, também foram coletadas informações relevantes para o tema em sites institucionais reconhecidos nacionalmente e/ ou internacionalmente, como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Sociedade Brasileira de Hepatologia (SBH), FDA (do inglês Food and Drug Administration), IARC (do inglês International Agency for Research on Cancer), NIH (do inglês National Cancer Institute).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sulforafano (1-isotiocianato- (4R) - (metilsulfinil) - butano) é o composto bioativo mais estudado entre os isotiocianatos, grupo que se caracteriza pela presença da estrutura funcional de caráter eletrofílica $-N=C=S$ (BERTI; BARTSCH; GERHAUSER, 2006; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019; WU et al., 2020). Naturalmente, ele está presente nos vegetais crucíferos (plantas da família *Brassicaceae*) (KIM et al., 2018; GAO et al., 2021) como o repolho, couve e principalmente o brócolis (SU et al., 2018).

Muitos estudos têm sugerido que a alta ingestão de vegetais crucíferos na dieta está correlacionada com baixo risco de desenvolvimento do câncer e que a atividade anticâncer desses alimentos ocorre principalmente devido à presença dos isotiocianatos (SU et al., 2018). Dentro desse cenário, o NIH identificou o sulforafano como um importante candidato para pesquisa em quimioprevenção (GAO et al., 2021). Esta estratégia de controle do câncer consiste na intervenção com compostos químicos, sintéticos ou naturais, para bloqueio e/ou supressão da carcinogênese (ARUMUGAM et al., 2020).

A carcinogênese é um processo complexo que envolve muitos estágios, destacando-se a iniciação, a promoção e a progressão (HEIDOR et al., 2020b). Esse processo pode ser iniciado endogenamente devido a uma predisposição genética ou de maneira exógena, ocasionada pela exposição à fatores ambientais (CARBONE et al., 2020). Durante a iniciação do tumor, o carcinógeno interage com os ácidos nucleicos levando à ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor (STURM; WAGNER, 2017). A atuação no metabolismo de carcinógenos é uma forma de bloquear o desenvolvimento do câncer nessa fase (STURM; WAGNER, 2017). Caso não sejam inativados, os carcinógenos, assim como o processo inflamatório, podem induzir estresse oxidativo nas células, causando assim, danos irreversíveis ao DNA genômico que, podem ser responsáveis pelo início do desenvolvimento do tumor (STURM; WAGNER, 2017). Dessa forma, compostos com efeitos antioxidantes e, que atuam no controle do microambiente inflamatório, podem também evitar essa etapa.

A segunda fase da carcinogênese, a promoção, é um processo reversível caracterizado pela expansão das células tumorais iniciadas (STURM; WAGNER, 2017; MARONGIU; SERRA; LACONI, 2018). A inibição da proliferação celular, a indução da morte celular, e o controle do processo inflamatório podem ser essenciais na supressão desse estágio (STURM; WAGNER, 2017). Por fim, a etapa de progressão leva ao desenvolvimento de células com fenótipo maligno, que inclui capacidade invasiva e metastática (STURM; WAGNER, 2017; MARONGIU; SERRA; LACONI, 2018). Abordagens anti-metastáticas, que controlam, por exemplo, a angiogênese, podem ser medidas quimiopreventivas importantes para evitar que o processo avance para essa fase (STURM; WAGNER, 2017).

Os compostos bioativos dos alimentos podem intervir regularmente em diferentes fases deste processo (STURM; WAGNER, 2017). Neste sentido, para discutir o potencial quimiopreventivo do sulforafano, a presente revisão analisou os resultados da ação do composto no câncer de fígado em estudos realizados in vitro (**Tabela 1**), em animais (**Tabela 2**) e em seres humanos (**Tabela 3**). As informações encontradas foram discutidas conforme os itens a seguir.

Tabela 1

Resultados dos ensaios in vitro realizados com sulforafano, segundo linhagem celular, fonte e dose do composto.

Linhagem celular	Fonte do sulforafano	Dose do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
HepG2	Sintético	2 µM	Anti-inflamatório	Redução de IL-6	(AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020)
HepG2	Sintético	2- 32 µM	Anti-inflamatório	Aumento de <i>TLR4</i>	(DOS SANTOS et al., 2020)
HepG2	Sintético	1.25 - 20 µM	Anti-metastático	Supressão da migração, adesão e formação de tubo de células endoteliais Redução da expressão da via STAT3/ HIF-1α /VEGF	(LIU et al., 2017)
HepG2	Sintético	20 µM	Anti-metastático	Redução da adesão ao colágeno e à fibronectina Redução da migração celular	(LIU et al., 2018)
HHL5 e HepG2	Sintético	0 - 20 µM	Antioxidante	Aumento de GSH	(LIU et al., 2019)
HepG2- C8	Sintético	12,5 µM	Antioxidante	Aumento de Nrf2	(KRAJKA-KUŻNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021)
HepG2	Sintético	0 - 20 µM	Antioxidante	Aumento de Nrf2 Aumento dos níveis de GSH	(GAN et al., 2010)
Hepatócitos de ratos (Wistar)	Hidrolisado de Glucosinolatos extraídos de plantas	40 µM	Antioxidante	Aumento de Nrf2 Indução de HO-1, NQO1, GST, CAT	(LA MARCA et al., 2012)
HepG2	Sintético	2,5 - 20 µM	Antioxidante	Indução de Nrf2	(LIU et al., 2019)
HepG2	Sintético	0 - 10 µM	Antioxidante	Ativação de Nrf2	(LIU et al., 2018)
HepG2	Sintético	20 µM	Antioxidante	Ativação de Nrf2, Redução de KEAP-1 Aumento de ARE	(REN et al., 2018)
HepG2	Extrato da planta <i>B. oleracea</i>	20 µM/L	Antioxidante	Aumento de Nrf2	(KIM et al., 2018)

Linhagem celular	Fonte do sulforafano	Dose do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
Ava5 (abrigando replicon subgenômico de HCV; genótipo 1b)	Sintético	0 - 10 μ M	Controle de fator de risco	Ativação de PI3K/AKT, Nrf2, ARE e HO-1	(YU et al., 2016)
HHL5 e HepG2	Sintético	20 μ M	Indução de morte celular	Indução de dano ao DNA	(LIU et al., 2019)
HepG2	Sintético	20 - 80 μ M	Indução de morte celular	Indução de apoptose	(POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018)
HepG2	Sintético	2- 32 μ M	Indução de morte celular	Aumento de <i>CASP8</i> , <i>FAS</i> , <i>TNFRSF10A</i> Redução de <i>MAPK</i>	(DOS SANTOS et al., 2020).
HepG2	Sintético	20-40 μ M/L	Indução de morte celular	Formação de corpos apoptóticos	(ZOU et al., 2016)
HepG2	Hidrolisado da glucorafanina da <i>R. sativus</i>	33.8 μ M	Indução de morte celular	Aumento das caspases 3/7/9 Indução da apoptose	(KNTAYYA et al., 2018)
HepG2	Sintético	20 μ M	Indução de morte celular	Aumento de BAX Diminuição de BCL2 Aumento de caspase 3 Redução de pró caspase 9 e 3 Redução do potencial da membrana mitocondrial Inibição de Akt/MAPK	(REN et al., 2018)
HepG2	Sintético	20 - 80 μ M	Indução de morte celular	Indução de apoptose Indução de necrose	(POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019)
HepG2	Sintético	20- 40 μ M/L	Indução de morte celular	Aumento de BIP/GRP78, BID e XBP-1 Aumento de caspase 12 e CHOP/GADD153	(ZOU et al., 2016)

Linhagem celular	Fonte do sulforafano	Dose do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
HepG2	Sementes, brotos e flores de brócolis liofilizados (<i>Brassica oleracea L. var. italica</i>)	2,5 mg/mL	Indução de morte celular	Indução de apoptose Indução de necrose	(PASKO et al., 2018)
HepG2	Sintético	80 µM	Indução de morte celular	Indução de necrose	(POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018)
HepG2	Sintético	5 - 20 µM	Indução de morte celular	Indução de ROS	(REN et al., 2018)
HepG2	Sintético	40 µM	Indução de morte celular	Indução de ROS	(POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018)
HepG2	Sintético	10 - 40 µM	Indução de morte celular	Indução de ROS	(POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019)
HepG2	Sintético	1,25 - 30 µM	Inibição da proliferação celular	Inibição da formação de colônias Indução de dano ao DNA	(LIU et al., 2018)
HepG2	Sintético	20 - 80 µM	Inibição da proliferação celular	Aumento das células em G2/M Redução da polimerização da tubulina	(POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018)
HepG2	Sintético	2- 32 µM	Inibição da proliferação celular	Indução da fragmentação do DNA Aumento de <i>DUSP4</i> Inibição da via PI3K-AKT (<i>PIK3CD</i>) Aumento de CDKN1A(p21) Desorganização dos microtúbulos Redução de <i>E2F3</i> , <i>THAP1</i> , através da hipermetilação Diminuição de <i>HDAC5</i> e <i>HDAC11</i>	(DOS SANTOS et al., 2020)
HepG2	Sintético	10 - 40 µM	Inibição da proliferação celular	Inibição da proliferação	(ZOU et al., 2016)

Linhagem celular	Fonte do sulforafano	Dose do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
HepG2	Sintético	10 - 40 μ M	Inibição da proliferação celular	Aumento das células na fase G2/M Supressão da polimerização da tubulina	(POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019)
HepG2	Hidrolisado da glucorafanina da <i>R. sativus</i>	33.8 μ M	Inibição da proliferação celular	Aumento das células na fase SubG0/G1	(KNTAYYA et al., 2018)
Hepatócitos de ratos (Wistar)	Hidrolisado de Glucosinolatos extraídos de plantas	40 μ M	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Inibição de CYP1A1/1A2 e CYP3As	(LA MARCA et al., 2012)
Hepa 1c1c7 de ratos	Extração e purificação do brócolis	0.078 - 2.5 μ M	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Indução de NQO1	(MATUSHESKI; JEFFERY, 2001)
HepG2	Sintético	2- 32 μ M	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Aumento de NQO1, HO-1, GCLC, GCLM e TRX1	(DOS SANTOS et al., 2020)
HepG2	Sintético	10 μ M	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Redução da citotoxicidade	(LIU et al., 2018)
HepG2	Sintético	1- 20 μ M	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Redução da apoptose Aumento de HO-1 e NQO1	(GAN et al., 2010)
HepG2- C8	Sintético	2,5 - 25 μ M (com curcumina)	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Indução de HO-1	(KRAJKA-KUŹNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021)
HHL5	Sintético	1,25 - 5 μ M	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Redução da citotoxicidade induzida por H ₂ O ₂	(LIU et al., 2019)

Abreviaturas: ARE, elemento responsivo à antioxidantes; BIP, binding protein; CAT, catalase; CHOP, proteína homóloga C/EBP; GCLC e GCLM, glutamato-cisteína ligases; GRP78, proteína-78 regulada pela glicose; GSH, glutathiona reduzida; GST, glutathiona S transferase; HIF-1 α , fator induzível por hipóxia 1-alfa; HO-1, heme oxigenase-1; IL-6, interleucina 6; KEAP-1, proteína 1 associada à ECH semelhante à Kelch; NQO1, NAD(P)H quinona oxidoreductase-1; NRF2, fator nuclear 2 relacionado ao eritróide; PI3K, fosfoinositídeo 3-quinase; ROS, espécies reativas de oxigênio; TRX1, tiorredoxina redutase 1; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; XBP-1, proteína 1 de ligação à X-Box;

Tabela 2 - Resultados dos ensaios em modelos animais realizados com sulforafano, segundo fonte e dose do composto.

Modelo Experimental	Fonte do sulforafano	Dose do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
Camundongo macho (B6C3F1)	Pó de brócolis (<i>Brassica oleracea</i> L. var. Green Magic) liofilizado	4,0 mM de glucorafarina por kg de brócolis liofilizado (10% de brócolis na dieta que era consumida livremente)	Anti-inflamatório	Redução de CD68 Diminuição de TNF do fígado Redução de Irfn γ hepático	(CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016)
Modelo CAM	Sintético	20 μ M	Anti-metastático	Redução de HIF-1 α e VEGF	(LIU et al., 2017)
Ratos (Wistar)	Extrato de brócolis	340 mg de glucorafarina /100 g de dieta	Antioxidante	Indução da via Nrf2	(YOSHIDA et al., 2015)
Camundongos (BALB/c)	Sintético	5 μ M/animal (administração intraperitoneal)	Antioxidante	Aumento de Nrf2 Aumento de NQO1 e HO-1	(SU et al., 2011)
Camundongos C57BL/6J Nrf2 nocaute	Sintético	90 mg de sulforafano por kg do animal (via oral gavagem)	Antioxidante	Ativação de Nrf2 e conseqüente expressão de várias categorias de genes como os de enzimas de metabolização xenobiótica, antioxidantes, sistemas de ubiquitina/ proteassoma, proteínas de resposta ao estresse, quinases e fosfatases, proteínas de imunidade, células adesão, ciclo celular e crescimento celular, metabolismo, proteínas de transporte e fatores de transcrição	(HU et al., 2006)
Camundongos machos (B6C3F1)	Pó de brócolis (<i>Brassica oleracea</i> L. var. Green Magic) liofilizado	4,0 mM de glucorafarina por kg de brócolis liofilizado (10% de brócolis na dieta que era consumida livremente)	Controle de fator de risco	Redução da ativação das células de kupffer Redução de CPT Aumento de MTTP Redução de CD36 Redução dos triglicerídeos hepáticos	(CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016)

Modelo Experimental	Fonte do sulforafano	Dose do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
Camundongos (C57BL/6N)	Sintético	1 g de sulforafano por kg de dieta	Controle de fator de risco	Redução de leptina Atenuação do acúmulo de gordura no fígado Redução de PPAR γ e C/EBP α Redução de HMG-CoA redutase Aumento da fosforilação de AMPK e ACC	(CHOI et al., 2014)
Ratos (Wistar)	Extrato de brócolis	340 mg de glucorafanina /100 g de dieta	Indução de morte celular	Aumento da regulação do ciclo celular Aumento da apoptose	(YOSHIDA et al., 2015)
Ratos (Sprague Dawley)	Cápsulas de broto de brócolis	62.5 - 250 mg de glucorafanina a cada 100 g da dieta AIN-76	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Indução de GST Redução de AST, ALT, BIL, ALB aumentada por N-nitrosodimetilamina	(KIKUCHI, 2015)
Camundongos (B6C3F1)	Pó de brócolis (<i>Brassica oleracea</i> L. var. Green Magic) liofilizado	4,0 mM de glucorafanina por kg de brócolis liofilizado (10% de brócolis na dieta que era consumida livremente)	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Redução de ALT plasmática aumentada por dietilnitrosamina Diminuição do número de nódulos hepáticos após indução por dietilnitrosamina	(CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016)
Ratos (Wistar)	Extrato de brócolis	340 mg de glucorafanina /100g de dieta	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Aumento de enzimas de fase I e II, como <i>cyps</i> , <i>gsts</i> e <i>ugts</i> Aumento de <i>gsh</i> , controlando a redução de GSH induzida pelo acetaminofeno Menor redução de GST que é induzida pelo D-galactosamina Redução de ALT e AST que é aumentada por acetaminofeno e D-galactosamina	(YOSHIDA et al., 2015)
Ratos (Wistar)	Sintético	500 μ g/kg/d	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Redução de ALT e AST aumentada por cisplatina Atenuação da redução da atividade das enzimas CAT, GR, GPx, GST e SOD causada por cisplatina	(GAONA-GAONA et al., 2011)

Modelo Experimental	Fonte do sulforafano	Dose do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
Camundongos (BALB/c)	Sintético	5 µM/animal (administração intraperitoneal)	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Inibição de CYP2E1 induzida por Microcistina Diminuição de TNF-α induzido por Microcistina Redução da clivagem de PARP e da ativação de caspase 3 induzida por Microcistina Redução de ALT e AST induzida por Microcistina Bloqueio da indução de Bid e indução de Bcl-xl, reduzindo morte celular na presença de Microcistina Aumento de NQO1 e HO-1 quando exposto a Microcistina Redução de peroxidação lipídica induzida por Microcistina Bloqueio da redução de GSH induzida por Microcistina	(SU et al., 2011)
Ratos (Fischer 344)	Extraído e purificado do brócolis	500 -1000 µM/kg	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Indução de NQO1 e GST	(MATUSHESKI; JEFFERY, 2001)

Abreviaturas: ACC, acetil-coa carboxilase; ALB, albumina; ALT, alanina aminotransferase; AMPK, proteína quinase ativada por AMP; AST, aspartato aminotransferase; BIL, bilirrubina; CAM, chick embryo chorioallantoic membrane; C/EBPα, proteína intensificadora da ligação tipo alfa da sequência CCAAT; CAT, catalase; CPT, carnitina palmitoiltransferase; CYP, citocromo; GPx, glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase; GSH, glutatona reduzida; GST, glutatona S transferase; HMG-CoA redutase, hidroxil-3-metilglutaril coenzima A redutase; HIF-1α, fator induzível por hipóxia 1 alfa; HO-1, heme oxigenase; ifnγ, interferon gama; mtpt, proteína anti-microsomal de transferência de triglicerídeos; NQO1, NAD(P) H quinona oxidoreductase-1; Nrf2, fator nuclear 2 relacionado ao eritróide; PARP, poli(ADP-ribose)polimerase; PPARγ, receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma; SOD, superóxido dismutase; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; UGT, uridino-glucuronosiltransferase; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

Tabela 3 - Resultados dos ensaios clínicos realizados com sulforafano, segundo tipo de estudo e fonte do composto.

Tipo de estudo	Fonte do sulforafano	Atividade biológica	Mecanismo envolvido	Referência
Randomizado Duplo Cego Com Placebo Realizado em homens, japoneses, 30 a 69 anos, com doença hepática gordurosa 2 meses de estudo	3 cápsulas de broto de brócolis contendo 30 mg de glucorafanina (aproximadamente 69 µM por dia)	Antioxidante	Redução dos níveis de 8-OHdG na urina	(KIKUCHI, 2015)
Randomizado Duplo Cego Com Placebo Realizado em homens, japoneses, 30 a 69 anos, com doença hepática gordurosa 2 meses de estudo	3 cápsulas de broto de brócolis contendo 30 mg de glucorafanina (aproximadamente 69 µM por dia)	Controle de fator de risco	Redução do colesterol total Redução da atividade sérica de ChE	(KIKUCHI, 2015)
Randomizado Com Placebo Realizado com homens e mulheres chineses (de Qidong), 25 a 65 anos, com função normal do fígado 2 semanas de estudo	Infusão de brotos de brócolis com 3 µM de glucorafanina todas as noites por 2 semanas	Controle de fator de risco	Redução da formação do aduto aflatoxina-N7- guanina	(KENSLE et al., 2005)
Randomizado Duplo Cego Com Placebo Realizado em homens, japoneses, 30 a 69 anos, com doença hepática gordurosa 2 meses de estudo	3 cápsulas de broto de brócolis contendo 30 mg de glucorafanina (aproximadamente 69 µM por dia)	Modulação do metabolismo de compostos tóxicos	Redução do nível sérico das enzimas AST, ALT, γ-GTP, ALP, ALB	(KIKUCHI, 2015)

Abreviaturas: 8-OHdG, 8-hidroxidesoxiguanosina; ALT, aspartato aminotransferase; AST, alanina aminotransferase; ALP, fosfatase alcalina; ChE, colinaesterase; γ-GTP, gama-glutamil transpeptidase.

4.1. O papel do sulforafano contra os fatores etiológicos do HCC

Cerca de 80% dos casos globais de HCC estão relacionados à infecção crônica com os vírus da hepatite B ou C (YANG et al., 2019). A infecção pelo HBV representa o principal fator de risco de hepatocarcinogênese, sendo responsável por

aproximadamente 50% dos casos (GILLMAN et al., 2021; LLOVET et al., 2021; MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). Já a infecção pelo HCV encontra-se em segundo lugar (GILLMAN et al., 2021), e é a causa predominante de HCC na Europa Ocidental, no Japão e nos Estados Unidos (LLOVET et al., 2021), onde é também uma das principais causas de cirrose (MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). Um estudo realizado em um sistema de replicação do HCV em células Ava5 mostrou que o sulforafano foi capaz de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes (**Tabela 1**). Esse efeito pode ser considerado uma abordagem terapêutica importante para controle da infecção por HCV, uma vez que a replicação do vírus está significativamente relacionada com o estresse oxidativo celular (YU et al., 2016; D'SOUZA et al., 2020). Foi demonstrado que o sulforafano inibiu a replicação do HCV através da modulação da via de sinalização PI3K (do inglês phosphoinositide 3-kinase) o que levou a ativação em cascata de fatores como Nrf2 e ARE (do inglês antioxidant response element) e culminou na indução da enzima heme oxigenase 1 (HO-1)(YU et al., 2016), conforme a **Figura 1**. HO-1 é um fator antioxidante depletado durante a infecção viral, considerado um potencial alvo terapêutico para infecções de HCV e HBV (YU et al., 2016).

A maioria dos indivíduos infectados com HBV ou HCV não consegue eliminar o vírus e corre o risco de desenvolver complicações hepáticas, como a cirrose (YU et al., 2016). Cerca de 90% dos casos de HCC ocorrem em cenário de doença hepática crônica (LLOVET et al., 2021), que costuma surgir no contexto de inflamação e fibrose. O acúmulo excessivo de matriz extracelular pode resultar em cirrose, que é considerada o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do HCC (LLOVET et al., 2021; GILLMAN et al., 2021). Além disso, o HCC é a principal causa de morte em pacientes com cirrose (LLOVET et al., 2021).

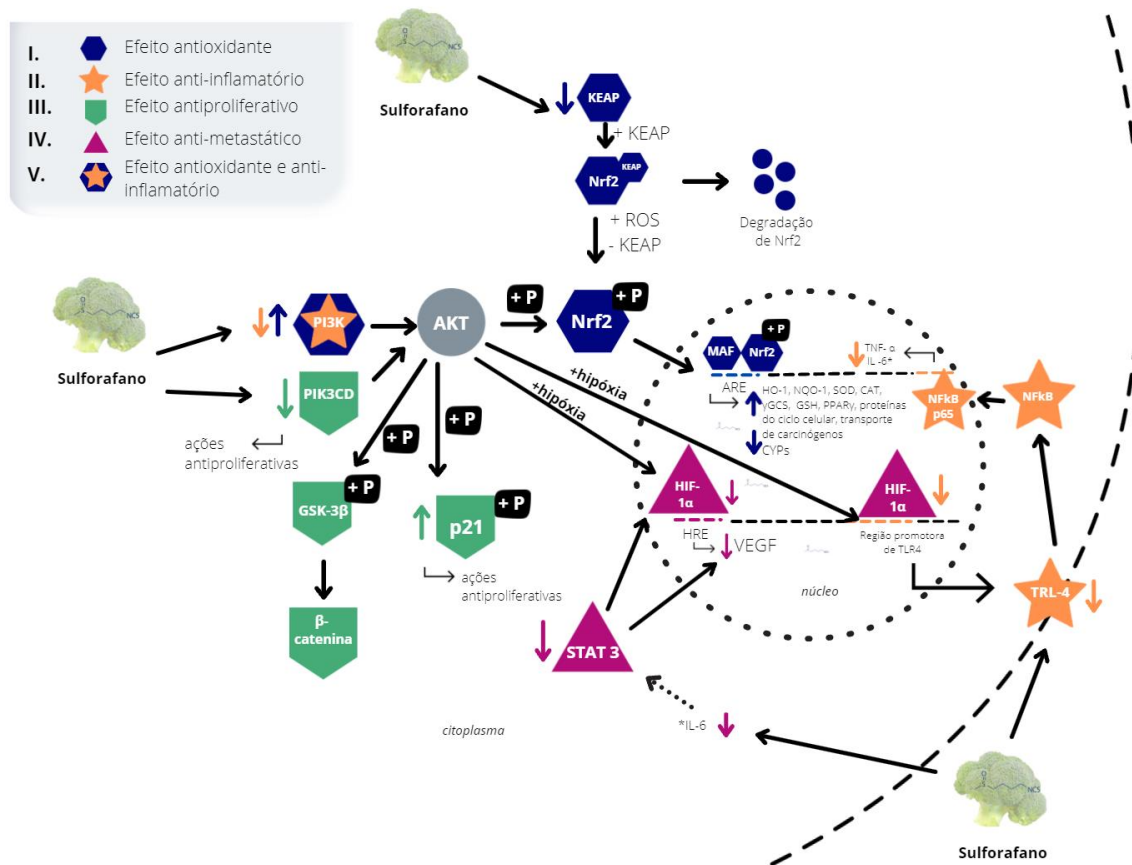


Figura 1: Possíveis efeitos do sulforafano envolvidos com a quimioprevenção do carcinoma hepatocelular. **(I) Efeito antioxidante:** O sulforafano ativa a via de Nrf2 ao ativar a via de PI3K e reduzir níveis de KEAP-1. O Nrf2 está envolvido em uma complexa cascata de sinalização. Em condições normais, ele é sequestrado do citoplasma por sua ligação com KEAP-1, que desencadeia sua degradação proteossomal. Quando Nrf2 é ativado pelo estresse oxidativo, por exemplo, ele se dissocia de KEAP-1 e uma sequência de eventos tem início: a translocação nuclear de Nrf2, heterodimerização com proteína sMAF (do inglês Small musculoaponeurotic fibrosarcoma), ligação do complexo Nrf2/sMAF ao ARE, e em última análise, o início da expressão gênica por ARE. ARE é o elemento de resposta a antioxidantes que medeia a ação desintoxicante das enzimas de fase II e das enzimas antioxidantes como HO-1 e NQO1 e por isso, quando ativado fornece proteção contra efeitos toxicológicos decorrentes de carcinógenos exógenos e ROS endógenas. **(II) Efeito anti-inflamatório:** O receptor TLR4 ativa NFκB e conseqüentemente estimula o aumento da produção de citocinas inflamatórias, incluindo TNF-α e IL-6. O sulforafano reduz os níveis das citocinas inflamatórias por reduzir a oligomerização de TLR4, por suprimir a via PI3K/AKT em macrófagos em hipóxia e por reduzir a ativação de HIF-1α, que em condições de hipóxia mostrou se ligar a região promotora de TLR4. **(III) Efeito antiproliferativo:** A via PI3KCD/ AKT / GSK-3β / β-catenina está relacionada com o crescimento descontrolado em cânceres. Sulforafano apresenta efeito antiproliferativo ao reduzir a expressão de *PIK3CD*. Além disso, o composto aumenta a expressão de p21, proteína antiproliferativa envolvida no controle do ciclo celular. **(IV) Efeito anti-metastático:** Sulforafano regula a expressão de VEGF por diminuir níveis de IL-6, STAT 3 e HIF-1α.

Adaptado de Bielecka, Czarnecka, Szczylik, 2014; Yarmohammadi, Rezaee, Karimi, 2020; Chen, Kao, Liu, 2018; Zhang, Feng, Jiang, 2021.

A adoção de medidas como a vacinação contra o HBV e a disponibilidade de tratamentos eficazes para o controle das hepatites B e C (LLOVET et al., 2021; MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021) estão diminuindo as taxas das infecções virais associadas ao desenvolvimento de HCC (MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). No intervalo entre 1978 e 2012, por exemplo, foi demonstrada uma redução da incidência de HCC em muitos países asiáticos, região na qual a maioria deles apresenta como principal fator etiológico para o HCC o vírus da hepatite B (LLOVET et al., 2021; MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021).

Em contrapartida a esse cenário, a incidência de doenças metabólicas, como a diabetes tipo II, obesidade e NASH (do inglês Nonalcoholic Steatohepatitis) estão aumentando e, em conjunto, apresentam potencial de se tornarem a principal causa de HCC em todo o mundo (HUANG; EL-SERAG; LOOMBA, 2020; MEJIA; PASKO, 2020; LLOVET et al., 2021; MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). Em países ocidentais, por exemplo, 20% dos casos de HCC estão relacionados com a NASH (LLOVET et al., 2021) e a estimativa é que a incidência da esteatohepatite para os próximos 10 anos aumente em até 56%. Além disso, a NASH pode ser estabelecida através da progressão do quadro de NAFLD (do inglês Nonalcoholic Fatty Liver Disease) (GILLMAN et al., 2021; LLOVET et al., 2021), que, atualmente, já é o principal fator etiológico do HCC nos Estados Unidos, França e Reino Unido (HUANG; EL-SERAG; LOOMBA, 2020).

Um estudo realizado em camundongos apontou que o sulforafano desempenha um papel importante no metabolismo lipídico e no controle de NAFLD (CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016). Foi demonstrado que a dieta com pó de brócolis foi capaz de: reduzir a concentração de triglicerídeos hepáticos; reduzir a expressão da proteína CD36, que é a principal transportadora de gorduras para o interior do hepatócito e que está altamente regulada em NAFLD; e ainda de aumentar a expressão do transportador MTP (do inglês microsomal triglyceride transfer protein) que é responsável pela liberação das VLDLs (do inglês very low density lipoproteins), contribuindo assim para menor deposição de triglicerídeos no tecido hepático (CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016). Esse estudo também mostrou que a dieta com pó de brócolis reduziu a ativação das células de Kupffer, células que produzem citocinas inflamatórias

desempenham um papel fundamental na progressão de NAFLD para NASH (CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016)(**Tabela 2**).

O aumento da incidência de doenças crônicas no fígado como NAFLD e NASH tem sido diretamente relacionado com a alta prevalência da obesidade (MEJIA; PASKO, 2020). A enzima ChE (do inglês Cholinesterase), por exemplo, é conhecida por ter maior expressão em indivíduos obesos que desenvolvem doença hepática gordurosa (KIKUCHI, 2015). Um estudo clínico realizado em homens japoneses com NAFLD mostrou que a ingestão por 2 meses de cápsulas de glucorafanina, precursora do sulforafano foi capaz de reduzir, além do colesterol total, a atividade sérica da ChE (KIKUCHI, 2015)(**Tabela 3**).

Um outro estudo foi realizado em camundongos a fim de relacionar os efeitos do sulforafano com a redução da obesidade. O desenho experimental consistia em três grupos: um que recebeu uma dieta gordurosa com sulforafano, outro que recebeu a mesma dieta gordurosa sem sulforafano e um terceiro que não recebeu dieta gordurosa (grupo controle). Assim, foi observado que a dieta gordurosa que continha sulforafano controlou o ganho de peso dos camundongos, que no final mantiveram um peso muito semelhante ao controle. Além disso, esse grupo apresentou também redução no tamanho do tecido adiposo, no acúmulo de gordura no fígado, na expressão de leptina e também nos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeo hepático (CHOI et al., 2014)(**Tabela 2**). A melhora no perfil lipídico ocasionada pelo sulforafano pode estar associada à redução de gorduras encontrada no fígado destes camundongos, e à redução dos níveis de leptina, hormônio produzido no tecido adiposo que está positivamente correlacionado com a obesidade (CHOI et al., 2014). Esses dados reforçam que o sulforafano pode desempenhar um papel importante no metabolismo lipídico, que, na obesidade, se encontra alterado.

Outra modificação presente na obesidade é o aumento do estresse oxidativo, que contribui para o ambiente inflamatório e mais propenso para o desenvolvimento de outros fatores de risco relacionados ao HCC, como a NASH (CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016; PÉREZ-TORRES et al., 2021). A obesidade está associada à expansão do tecido adiposo devido a um desequilíbrio entre consumo e gasto energético (CHOI et al., 2014). A ingestão de gordura na dieta, por exemplo, pode causar a sobrecarga de ácidos graxos nas mitocôndrias, levando ao aumento da

captação de oxigênio necessária para a oxidação beta e contribuindo para o estresse oxidativo (CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016). A oxidação mitocondrial é controlada enzimaticamente e uma das enzimas responsáveis é CPT (Carnitina Palmitoil Transferase). Foi observado em camundongos tratados com dieta com brócolis em pó, a regulação negativa da CPT. Tal evento não foi observado em animais controle que receberam uma dieta tipicamente ocidental, com elevadas concentrações de carboidratos e gorduras saturadas. Além disso, também foi observado que o brócolis foi capaz de diminuir a expressão de CYP2E1, enzima que quando ativada também ocasiona a produção de ROS (do inglês Reactive Oxygen Species)(CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016)(**Tabela 2**). Dessa forma, o controle do estresse oxidativo se mostra também importante para a prevenção dos fatores de risco do HCC.

O desenvolvimento de alterações metabólicas observadas na obesidade, como o estresse oxidativo, inflamação, disfunção mitocondrial e imunológica, tem relação com o tecido adiposo, que é o regulador central do metabolismo energético (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021). O tecido adiposo expande sua massa na obesidade por mecanismos relacionados à hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, que consistem nas principais células armazenadoras de gordura. Essas células podem ser diferenciadas de pré-adipócitos por sinais adipogênicos e essa diferenciação é regulada por uma rede complexa de fatores de transcrição como PPAR γ (do inglês Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma) e C/EBP α (do inglês CCAAT/Enhancer-binding Protein alpha)(CHOI et al., 2014). O estudo realizado em camundongos também mostrou que o sulforafano pode atuar no controle da obesidade suprimindo a expressão do PPAR γ e C/EBP α . Além disso, a dieta com sulforafano foi capaz de aumentar a fosforilação de AMPK (do inglês AMP-activated protein kinase), uma enzima reguladora envolvida no metabolismo lipídico e energético que quando fosforilada/ ativada inibe a biossíntese lipídica inativando as enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase e hidroximetilglutaril coenzima A redutase, que regula a síntese de colesterol. Dessa forma o sulforafano agiria como um potencial candidato a composto anti-obesidade (CHOI et al., 2014)(**Tabela 2**).

Outro fator de risco também importante para o desenvolvimento de HCC é a exposição às aflatoxinas (LA MARCA et al., 2012), grupo de micotoxinas produzidas por fungos *Aspergillus*, que são carcinógenos naturais e contaminam uma grande parte do

suprimento alimentar mundial, como os grãos (FISHBEIN et al., 2021). Elas apresentam efeitos hepatocarcinogênicos (YANG et al., 2019), causando cerca de 28% dos casos de HCC no mundo (FISHBEIN et al., 2021). A contaminação de alimentos com aflatoxina tem um papel importante principalmente em países com clima quente e úmido e, devido às mudanças climáticas, têm o potencial de se tornar um dos principais fatores etiológicos nas próximas décadas (MCGLYNN; PETRICK; ERAG, 2021). Por depender de fatores ecológicos, a presença da aflatoxina nos alimentos é de difícil controle, reforçando a relevância da quimioprevenção nesse caso (KENSLER et al., 2005). Tendo em vista esse contexto, avaliou-se o efeito da infusão de broto de brócolis em indivíduos residentes em uma região onde ocorre elevada ingestão de alimentos contaminados com aflatoxina. Foi observado na urina dos participantes do estudo que a presença de aflatoxina-N7-guanina foi inversamente relacionada com a quantidade de ditiocarbamatos (KENSLER et al., 2005)(**Tabela 3**). Os ditiocarbamatos são formados durante o metabolismo do sulforafano que ocorre pela via do ácido mercaptúrico (**Figura 3**) e por isso são utilizados como biomarcadores importantes da biodisponibilidade do isotiocianato (KENSLER et al., 2005; LIU et al., 2018). A aflatoxina é um composto que precisa ser bioativado para ter ação carcinogênica. No organismo, depois de metabolizada, ela forma epóxidos reativos que apresentam atividade genotóxica causando, por exemplo, alterações cromossômicas e adutos no DNA, mecanismos relacionados com a iniciação da carcinogênese (FISHBEIN et al., 2021). Um dos adutos de DNA formados nesse processo é a aflatoxina-N7-guanina, que em nível elevado está associado com risco aumentado de câncer de fígado (KENSLER et al., 2005). O achado desse estudo indica que a presença sulforafano no organismo está relacionada com a redução da formação deste aduto, que pode ser explicado pela potencial ação do composto na redução da bioativação do carcinógeno e/ou na indução de enzimas que inativam a aflatoxina, como as glutathione S-transferases (GSTs)(KENSLER et al., 2005; CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016).

4.2. Atuação do sulforafano no metabolismo de compostos tóxicos

Agentes quimiopreventivos podem agir em fases diferentes da carcinogênese (STURM; WAGNER, 2017). Considera-se agentes quimiopreventivos bloqueadores aqueles que atuam na fase de iniciação do câncer (HEIDOR et al., 2020b), evitando que os carcinógenos sejam ativados ou interajam com biomoléculas alvo, como fosfolípidios de membrana ou ácidos nucleicos (WATTENBERG, 1985). A regulação de enzimas envolvidas no metabolismo desses carcinógenos é considerada uma maneira de bloquear a iniciação da carcinogênese (STURM; WAGNER, 2017), podendo inibir a bioativação do carcinógeno e/ou induzir a excreção do xenobiótico pelo organismo (HEIDOR et al., 2020b).

A bioativação de carcinógenos acontece através da ação das enzimas de fase I (ZHENG et al., 2018; HEIDOR et al., 2020). Estas enzimas compostas principalmente pela família das CYPs estão envolvidas em reações de oxidação e hidroxilação dos xenobióticos, que, na maioria das vezes, tem por consequência torná-los mais tóxicos (YOSHIDA et al., 2015). A inibição dessas enzimas por fitoquímicos é uma etapa preventiva crucial no estágio inicial da carcinogênese (STURM; WAGNER, 2017).

Há estudos mostrando o potencial do sulforafano em inibir a atividade das enzimas de fase I. Um deles realizado em hepatócitos de ratos com vários isotiocianatos mostrou que o sulforafano foi capaz de inibir a expressão de diversas CYPs, inclusive a CYP3A4 (LA MARCA et al., 2012)(**Tabela 1**). Esta enzima de biotransformação é importante por, além de estar envolvida na metabolização de fármacos, também estar relacionada com a bioativação da aflatoxina. Esses resultados reforçam as hipóteses levantadas no estudo clínico de KENSLER et al., 2005 (**Tabela 3**), trazendo como mecanismo de redução dos danos da aflatoxina no organismo, a inibição das enzimas responsáveis pela bioativação do carcinógeno (KENSLER et al., 2005; CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016).

Além do seu potencial em regular as enzimas de fase I, muitos estudos também têm mostrado que sulforafano age induzindo a expressão de enzimas de fase II. As enzimas de fase II estão relacionadas com a inativação dos xenobióticos (HEIDOR et al., 2020b), convertendo os carcinógenos potenciais em metabólitos inativos que podem ser rapidamente excretados (STURM; WAGNER, 2017). A excreção destes compostos é facilitada porque essas enzimas catalisam reações como conjugação com glutathione, glicuronídeo, sulfato e outras moléculas, que tornam o carcinógeno mais hidrofílico e

corroboram para o mecanismo de desintoxicação (YOSHIDA et al., 2015; ZHENG et al., 2018). A modulação da expressão das enzimas de fase II é então um mecanismo importante de proteção do organismo, sendo que, quando ativadas, elas colaboram para prevenção da carcinogênese (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019).

Estudos realizados em células HepG2 e em hepatócitos de ratos apontaram que o sulforafano foi capaz de aumentar a expressão de várias enzimas de fase II, como NAD(P)H quinona oxidoreductase-1 (NQO1), HO-1, glutamato-cisteína ligases, tiorredoxina redutase 1, GST e catalase (MATUSHESKI; JEFFERY, 2001; LA MARCA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2020; KRAJKA-KUŹNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021)(**Tabela 1**). Além disso, um desses estudos também comparou a indução de quinona redutase por sulforafano e por outros isotiocianatos. Assim, foi demonstrado que o sulforafano foi mais potente que o sulforafano nitrila na ativação dessa enzima. O sulforafano nitrila é um isotiocianato que também está presente no brócolis (MATUSHESKI; JEFFERY, 2001) e por isso pode ter ação sinérgica ao sulforafano, tornando esse alimento interessante como fonte de compostos quimiopreventivos contra o câncer.

A indução de enzimas hepáticas pelo sulforafano também foi observada in vivo. Um estudo realizado em ratos mostrou que o sulforafano foi capaz de induzir a expressão da enzima hepática quinona redutase e, em doses maiores também da GST (MATUSHESKI; JEFFERY, 2001)(**Tabela 2**). Essa ação do sulforafano no metabolismo hepático pode explicar uma série de efeitos que o composto mostrou atenuar frente à exposição de células e animais à xenobióticos. Por exemplo, células HepG2 tratadas com sulforafano e expostas a um composto tóxico apresentaram resistência à morte celular (GAN et al., 2010)(**Tabela 1**). O mesmo estudo demonstrou que o sulforafano aumentou a expressão do composto glutatona reduzida (GSH) e das enzimas de fase II HO-1 e NQO1, as quais são alvos importantes para quimioprevenção do câncer, devido também aos seus papéis antioxidantes. NQO1, por exemplo, é uma redutase que induz a formação de estruturas antioxidantes de ubiquinona e vitamina E relevantes para a citoproteção, assim como HO-1 catalisa a formação de metabólicos com funções antioxidantes e anti-inflamatórias importantes para a homeostase celular em resposta ao estresse mediado por ROS (STURM; WAGNER, 2017). Em camundongos tratados

com sulforafano expostos a Microcistina também foi observado regulação da via apoptótica e redução nos níveis de mediadores pró-inflamatórios (SU et al., 2011)(**Tabela 2**).

Quando a fonte de sulforafano foi o extrato de broto de brócolis, efeitos protetores contra carcinógenos também foram observados. Além de a dieta ter sido capaz de modular a expressão de vários genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos, tais quais de *cyps* e uridino-glucuronosiltransferases (*ugts*)(YOSHIDA et al., 2015), o estudo mostrou que ratos expostos à acetaminofeno e D-galactosamina, que ingeriram dietas com extrato de broto de brócolis, apresentaram maior expressão de *gsh* e de *gst*, se comparado aos animais que receberam rações sem o extrato do vegetal (YOSHIDA et al., 2015)(**Tabela 2**). O acetaminofeno, por exemplo, é um xenobiótico que causa lesão hepática principalmente por diminuição da expressão de GSH nas células, levando a aumentos na concentração de ROS e RNS (do inglês Reactive Nitrogen Species) nos hepatócitos (YOSHIDA et al., 2015). Um estudo realizado em camundongos mostrou também que a presença do sulforafano na exposição ao composto tóxico não reduz os níveis de GSH e, controla a peroxidação lipídica (SU et al., 2011)(**Tabela 2**).

Altos níveis de estresse oxidativo provocam danos às células e, inclusive, podem estimular a proliferação celular descontrolada (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020). As enzimas de fase II regulam o estado redox em células de mamíferos e fornecem um equilíbrio preciso no nível de ROS (JAMES et al., 2012). Dessa forma, a ativação dessas enzimas se torna fundamental para proteção celular frente à exposição à carcinógenos. Um estudo realizado em ratos mostrou que a ingestão de sulforafano preveniu de forma dose dependente a hepatotoxicidade induzida pelo carcinógeno N-nitrosodimetilamina (NDMA), uma vez que suprimiu o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, através da indução da expressão das enzimas antioxidantes de fase II (KIKUCHI, 2015)(**Tabela 2**). Outro estudo também realizado em ratos mostrou que o pré-tratamento com sulforafano foi capaz de manter a atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, GST e superóxido dismutase, que foram inibidas com a exposição ao carcinógeno cisplatina (GAONA-GAONA et al., 2011)(**Tabela 2**). A atividade do composto também reduziu o estresse

oxidativo mitocondrial das células do fígado, o que é essencial para manter o balanço redox fisiológico (GAONA-GAONA et al., 2011).

Outros efeitos protetores do sulforafano também são observados em células e em animais frente à exposição de diferentes carcinógenos. Por exemplo, o pó de brócolis administrado em camundongos foi capaz de reduzir: a incidência e o tamanho de adenomas hepáticos; e os níveis séricos de enzimas hepáticas (CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016)(**Tabela 2**). Ratos e camundongos tratados com sulforafano apresentaram menores níveis de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – ALT- e alanina aminotransferase - AST) após a exposição aos xenobióticos Cisplatina, Acetaminofeno, D-galactosamina e Microcistina (GAONA-GAONA et al., 2011; SU et al., 2011; KIKUCHI, 2015; YOSHIDA et al., 2015)(**Tabela 2**). Um estudo clínico realizado com homens japoneses com doença hepática gordurosa apontou que a ingestão de glucorafanina como fonte de sulforafano durante 2 meses foi capaz de reduzir os níveis de marcadores da função hepática, como AST, ALT, γ -GTP, entre outros (KIKUCHI, 2015)(**Tabela 3**). Em várias lesões pré-neoplásicas e neoplásicas são observados altos níveis de enzimas hepáticas (KIKUCHI, 2015), tornando assim o monitoramento e o controle das concentrações dessas enzimas de extrema importância para a prevenção do câncer.

Além disso, há estudos indicando que ação protetora do sulforafano contra xenobióticos pode também ser encontrada em seus metabólitos. Um estudo demonstrou que tanto sulforafano como seus metabólitos apresentam atividade antioxidante demonstrada em células HepG2 tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2)(LIU et al., 2018)(**Tabela 1**). Essa mesma atividade foi verificada em hepatócitos de seres humanos imortalizados, células HHL5, que também foram expostas ao peróxido de hidrogênio (LIU et al., 2019a)(**Tabela 1**). Como os isotiocianatos apresentam meia vida curta (KENSLEER et al., 2005), essa característica dos seus metabólitos poderia prolongar os efeitos biológicos do composto no organismo. Além disso, alguns dos metabólitos do sulforafano parecem ter meia vida mais longa e serem menos tóxicos do que altas doses do isotiocianato (LIU et al., 2018).

4.3. Efeitos antioxidantes do sulforafano no tecido hepático

O estresse oxidativo é definido como excesso de ROS comparado a quantidade de antioxidantes (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). ROS são produtos do metabolismo celular normal que desempenham um papel importante na regulação de muitos processos metabólicos (LV et al., 2019; VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020). O equilíbrio entre a geração e eliminação de ROS é de grande importância para manter o ambiente fisiológico favorável e adequado, mas a presença em alto nível dessas espécies pode induzir mutações no DNA e ser causa do desenvolvimento de vários distúrbios, incluindo das doenças neoplásicas (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020). O estresse oxidativo é um dos principais fatores envolvidos na fisiopatologia do câncer relacionado com fatores ambientais (ZHENG et al., 2018), desempenhando um papel importante nas diversas fases da carcinogênese (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020). Altos níveis de ROS estão associados, por exemplo, à proliferação celular e metástase dos tumores (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020).

O fator de transcrição Nrf2 é um regulador mestre envolvido na homeostase redox e adaptação ao estresse oxidativo das células (LIU et al., 2019). Ele é geralmente considerado como o principal regulador dos mecanismos de defesa celular, especialmente contra o estresse oxidativo, tendo como alvo mais de 200 genes, muitos dos quais provocam respostas citoprotetoras (LIU et al., 2019). Por exemplo, o Nrf2 controla a produção, utilização e regeneração de GSH, o cofator antioxidante mais abundante dentro das células (LIU et al., 2018).

Nrf2 tem sido apontado como um importante fator para proteção da saúde hepática (KIKUCHI, 2015), podendo ser considerado um dos fatores relacionados ao desenvolvimento do HCC (GABBIA; CANNELLA; DE MARTIN, 2021). Dessa, sua modulação é de grande interesse para quimioprevenção do câncer de fígado. O sulforafano em modelos experimentais tem demonstrado proteger uma ampla variedade de doenças hepáticas (LIU et al., 2019), e acredita-se que sua atividade indutora de enzimas de fase II pode estar relacionada com seu potencial de ação em Nrf2 (JAMES et al., 2012).

Um estudo foi realizado em células HepG2 e em células nocautes para Nrf2 com a finalidade de avaliar a relação entre os efeitos do sulforafano e sua atuação nessa

via. Ambas as células foram tratadas com peróxido de hidrogênio, entretanto o efeito antioxidante foi observado apenas nas células HepG2 que podiam expressar Nrf2 (LIU et al., 2018)(**Tabela1**). Células HepG2 que foram tratadas com sulforafano e expostas à hepatotoxina microcistina também mostraram maior expressão de Nrf2 comparado aos controles (GAN et al., 2010)(**Tabela1**). Além disso, outros estudos também observaram a ativação de Nrf2 em células de animais de experimentação e de seres humanos (LA MARCA et al., 2012; KRAJKA-KUŹNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021), assim como aumento da glutathiona em células hepáticas tratadas com sulforafano (LIU et al., 2019)(**Tabela1**).

Esses efeitos também foram observados em ensaios in vivo. A análise *post mortem* dos hepatócitos de camundongos que receberam sulforafano, mostrou aumento da expressão de Nrf2 na fração nuclear e aumento dos níveis de enzimas de fase II como NQO1 e HO-1 na fração citoplasmática (SU et al., 2011)(**Tabela 2**). Animais que receberam extrato de broto de brócolis também apresentaram aumento de expressão de genes ativados pelo Nrf2 (HU et al., 2006; YOSHIDA et al., 2015)(**Tabela 2**). Além disso, outro estudo realizado em camundongos mostrou que a ação do sulforafano por essa via não se limita à regulação de enzimas antioxidantes. Nesse sentido, foi observado apenas em camundongos não nocautes para Nrf2 tratados com sulforafano, aumento da expressão de proteínas relacionadas com importantes vias metabólicas celulares, inclusive aquelas associadas ao efluxo de carcinógenos em hepatócitos. Neste mesmo estudo, também foi observado que, dos 5 genes controlados por Nrf2 que atuam no metabolismo de xenobiótico, o sulforafano foi capaz de regular 3 (*cypa10*, *cyp4a14* e *cyp39a1*)(HU et al., 2006)(**Tabela 2**). Estes achados reforçam o papel central desse fator de transcrição na homeostase celular, principalmente em relação ao metabolismo de xenobióticos, e apontam como o sulforafano pode contribuir para essa regulação.

Os efeitos antioxidantes do sulforafano também já foram observados em estudos em seres humanos. Um estudo clínico realizado com homens japoneses com doença hepática gordurosa mostrou que a ingestão de cápsula de glucorafanina por 2 meses foi capaz de reduzir o nível urinário de 8-hidroxidesoxiguanosina, que é um importante marcador do estresse oxidativo no organismo (KIKUCHI, 2015)(**Tabela3**). Apesar de não se ter um mecanismo estabelecido claro, esses resultados são compatíveis com a

potencial indução de Nrf2 do sulforafano, sendo que outros compostos bioativos já demonstraram controlar o estresse oxidativo em seres humanos através da ativação dessa via (SEYYEDEBRAHIMI et al., 2018)

O Nrf2 está associado a uma complexa cascata de sinalização que envolve sua proteína inibitória KEAP-1 (do inglês Kelch Like ECH Associated Protein 1) e outros elementos, como mostra a **Figura 1**. O sulforafano mostrou atuar em diferentes estágios dessa via. Um estudo em HepG2 apontou que o sulforafano induz ARE através da ação em Nrf2 (KRAJKA-KUŻNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021)(**Tabela 1**). Resultados semelhantes foram observados no estudo que utilizou sulforafano e benzil sulforafano, ou seja, constatou-se aumento da ativação de Nrf2, diminuição de KEAP-1 e aumento de sua ligação ao ARE (REN et al., 2018)(**Tabela 1**). A ação antioxidante do sulforafano através dessa via também foi observada em células HHL5 (LIU et al., 2019)(**Tabela 1**) e seus metabólitos também parecem ser ativos nessa modulação (LIU et al., 2018).

Tendo em vista que o sulforafano apresenta resultados promissores na regulação da via Nrf2, o aumento da concentração deste isotiocianato nos alimentos tem despertado interesse. Um estudo foi realizado utilizando NaCl e Na₂SeO₃ com a finalidade de aumentar os níveis de isotiocianatos na couve. Os resultados mostraram maior concentração de sulforafano no extrato da couve tratada com esses compostos. Além disso, foi observado em células HepG2 que o tratamento com o extrato da couve exposta ao cloreto e selenito de sódio, resultou em aumento da expressão de Nrf2 (KIM et al., 2018)(**Tabela 1**). Essa estratégia ilustra que há alternativas interessantes para aumentar a concentração de compostos bioativos para fins de quimioprevenção.

4.4. O sulforafano e os seus efeitos anti-inflamatórios na carcinogênese

A inflamação é uma resposta natural do corpo que envolve a liberação de vários mediadores celulares, como as citocinas (KUNNUMAKKARA et al., 2018; AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020). As citocinas inflamatórias, além de representarem um desafio importante para o tratamento quimioterápico, estão diretamente relacionadas com os

quadros de inflamação crônica (AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020). O câncer é uma das doenças relacionadas com a inflamação crônica (KUNNUMAKKARA et al., 2018), sendo esta uma das suas características fisiopatológicas. A infecção junto com a inflamação estão associadas diretamente com cerca de 25% de todos os tipos de tumores (AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020), o que inclui o HCC (FISHBEIN et al., 2021).

Em modelos experimentais de câncer de pâncreas foi demonstrado que a inflamação desempenhou um papel essencial para a carcinogênese (GUERRA et al., 2007). Além disso, o aumento da infiltração de células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, no microambiente tumoral está relacionado com angiogênese e mau prognóstico do câncer (FISHBEIN et al., 2021). Acredita-se que células tumorais usufruam das vias de sinalização inflamatórias facilitando seus mecanismos de proliferação, migração e invasão celular (LIU et al., 2019b). Já foi demonstrado também que altos níveis de interleucina 6 (IL-6), uma importante citocina inflamatória, está associado à progressão da carcinogênese (AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020), e que a superexpressão da citocina TNF- α (do inglês Tumor Necrosis Factor-alpha) por meio da ativação de NF- κ B, está associada ao desenvolvimento do câncer (KUNNUMAKKARA et al., 2018).

Nesse sentido, a inflamação hepática pode ter também um papel importante na hepatocarcinogênese (YANG et al., 2019), uma vez que, genes envolvidos no processo inflamatório são considerados drivers da etapa de iniciação do HCC (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HEIDOR et al., 2020a). Em um estudo clínico prospectivo foi demonstrado também que o microambiente do carcinoma hepatocelular exibe atividade pró-inflamatória (FISHBEIN et al., 2021). Além disso, sabe-se que uma série de compostos que iniciam a hepatocarcinogênese, como tiametoxam, NDMA e a aflatoxina ativam vias inflamatórias (ZHANG et al., 2019; FISHBEIN et al., 2021). O agente mutagênico NDMA, por exemplo, atua induzindo o recrutamento de células inflamatórias e aumenta os níveis de citocinas como a IL-1 e a IL-6 (FISHBEIN et al., 2021). Outros importantes fatores de risco para o HCC, como a própria infecção por HBV e HCV, além do consumo de bebidas alcoólicas e a obesidade, estão também associados à inflamação (KUNNUMAKKARA et al., 2018; LIU et al., 2019a; FISHBEIN et al., 2021).

A inflamação induzida por carcinógenos causa danos teciduais e morte celular. Células mortas ativam macrófagos e contribuem para um fenótipo pró-inflamatório, gerando aumento de citocinas. Se persistirem ao longo do tempo, esses eventos ativam também sinais pró angiogênicos, infiltrações celulares e estímulos fibróticos. Além disso, a inflamação também é conhecida por contribuir para a carcinogênese através da geração de ROS e RNS que além de causar dano ao DNA e aberrações genéticas, ativam uma série de cascatas inflamatórias nas células da vizinhança (STURM; WAGNER, 2017; CHEN; KAO; LIU, 2018; FISHBEIN et al., 2021). Em contrapartida a esse cenário, a inibição da expressão de citocinas inflamatórias pode controlar o desenvolvimento do câncer (CHEN; KAO; LIU, 2018). Mediadores anti-inflamatórios como algumas resolvinas são capazes de inibir a proliferação celular durante a hepatocarcinogênese, por reduzirem os níveis de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β (interleucina-1 β) e IL-6 (KUNNUMAKKARA et al., 2018; ZHENG et al., 2018; FISHBEIN et al., 2021).

Dessa maneira, compostos que controlam a inflamação podem também ser eficientes na quimioprevenção do câncer. Em modelos experimentais de HCC e de câncer colorretal, foi demonstrado, inclusive in vivo, que o sulindaco, um anti-inflamatório, inibe a carcinogênese (GURPINAR; GRIZZLE; PIAZZA, 2013; FISHBEIN et al., 2021). Além disso, em um estudo prospectivo, o uso de aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) mostrou reduzir o risco de desenvolvimento de HCC e doença hepática crônica (SAHASRABUDDHE et al., 2012). Compostos anti-inflamatórios também apresentaram atividade quimiopreventiva em ratos que receberam aflatoxina em modelo de hepatocarcinogênese (FISHBEIN et al., 2021).

Apesar dos fármacos anti-inflamatórios apresentarem efeitos quimiopreventivos no câncer (CHEN; KAO; LIU, 2018), a maioria desses compostos tem custo elevado e efeitos colaterais (KUNNUMAKKARA et al., 2018). O uso a longo prazo de AINEs, por exemplo, pode estar associado a problemas como o desenvolvimento de úlceras (CHEN; KAO; LIU, 2018). Dessa forma, a identificação de compostos bioativos presentes nos alimentos que possam exercer essas ações anti-inflamatórias e quimiopreventivas se torna ainda mais importante para a quimioprevenção do câncer (STURM; WAGNER, 2017).

Dietas ricas em compostos bioativos com ação quimiopreventiva têm demonstrado atividade contra a hepatocarcinogênese por, entre outros fatores, contribuir para menor expressão de TNF- α e IL-6 (ZHENG et al., 2018). Um estudo realizado in vitro utilizou lipopolissacarídeo (LPS), que é um componente das membranas celulares de bactérias gram negativas, como modelo para induzir o estado inflamatório. Nesse sentido, foi observado que as células tratadas com sulforafano apresentaram menor expressão de IL-6 (AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020)(**Tabela 1**). Além disso, um outro estudo realizado em camundongos mostrou que a dieta com brócolis foi capaz de diminuir a expressão de TNF e de outras proteínas hepáticas que estão envolvidas na ativação de macrófagos no fígado (CHEN; WALLIG; JEFFERY, 2016)(**Tabela 2**). A redução dos níveis de TNF- α e IL-6 pode estar relacionada com a capacidade do sulforafano de bloquear ou diminuir a expressão do receptor pró inflamatório da imunidade inata TLR4 (do inglês Toll Like Receptor 4)(CHEN; KAO; LIU, 2018; DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**)(**Figura 1**).

Os níveis reduzidos de TLR 4, induzidos por sulforafano, inibem a ativação do fator de transcrição NF κ B (STURM; WAGNER, 2017)(**Figura 1**), que, em vários tipos de cânceres, como de mama, cólon, pulmão, pâncreas e fígado, está constitutivamente ativado (STURM; WAGNER, 2017; KUNNUMAKKARA et al., 2018). Essa ação tem potencial eficácia na prevenção e tratamento de cânceres (KUNNUMAKKARA et al., 2018), uma vez que esse fator além de ativar centenas de genes pró inflamatórios (KUNNUMAKKARA et al., 2018), é responsável por estimular uma série de eventos pró tumorigênicos como proliferação, invasão e angiogênese (STURM; WAGNER, 2017; KUNNUMAKKARA et al., 2018).

4.5. A inibição da proliferação celular pelo sulforafano

Aventa-se que as vias de sinalização de crescimento sofrem desregulação em todos os tumores humanos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Enquanto as células normais precisam de estímulos para iniciar a proliferação, células tumorais são capazes de serem auto suficientes em seus sinais de crescimento, apresentando pouca

dependência do microambiente tumoral para proliferar (HANAHAN; WEINBERG, 2000). No câncer, as células são capazes de sustentar a proliferação crônica por também não responderem aos sinais inibitórios do crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Mecanismos de inibição do crescimento tumoral podem então ser alvos importantes para o controle do tumor.

A via de sinalização de PI3K, por exemplo, é uma das principais vias envolvidas na proliferação e crescimento celular no câncer de fígado (DOS SANTOS et al., 2020). A literatura sugere que essa é a via mais ativada em neoplasias humanas, estando alterada em cerca de 30–50% dos vários tipos de tumores (SUVARNA et al., 2017). Na fisiopatologia do câncer ela está envolvida em diversos processos como proliferação, metástase, quimiorresistência e outros (WU et al., 2020). No HCC foi relatado que ela desempenha um papel crucial no equilíbrio da proliferação e metástase (WU et al., 2020).

Considerando esse cenário, acredita-se que as substâncias naturais que têm como alvo a via PI3K podem apresentar grande potencial terapêutico no tratamento de pacientes com câncer (SUVARNA et al., 2017). Estudos têm mostrado que o sulforafano desempenha um papel antiproliferativo em células tumorais (ZOU et al., 2016; LIU et al., 2018), inclusive através da modulação dessa via. Ensaios realizados em HepG2 mostraram que o sulforafano suprime a ativação da via PI3K-AKT por reduzir a expressão de *PIK3CD* (**Figura 1**), gene que é encontrado hiperexpresso no HCC (DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**) e que em cânceres como o de cólon retal está associado a vias de sinalização que promovem a proliferação celular descontrolada (CHEN et al., 2019). Além disso, sulforafano estimula o aumento da expressão do *DUSP4*, que está relacionado com efeitos antiproliferativos (DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**). O composto também apresentou, além de metabólitos ativos para esse efeito (LIU et al., 2018), maior atividade antiproliferativa que outros isotiocianatos (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018).

O sulforafano também mostrou inibir a proliferação celular atuando através de mecanismos epigenéticos. A organização celular do DNA genômico acontece por meio da estrutura compacta e definida da cromatina, que sofrendo alterações pode ativar ou silenciar genes (STURM; WAGNER, 2017). As alterações epigenéticas são aquelas que modificam a expressão dos genes sem alterar a sequência de DNA (DOS SANTOS et

al., 2020). Há vários tipos de modificações epigenéticas entre elas a metilação de DNA e as modificações nas histonas (STURM; WAGNER, 2017). As histonas são proteínas que se ligam ao DNA, definem a forma dos cromossomos e assim modulam a expressão gênica (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

A desregulação epigenética é uma marca registrada do câncer e desempenha um papel fundamental durante seu desenvolvimento (DOS SANTOS et al., 2020). Entre as características epigenéticas, a hipometilação global é uma das frequentemente presentes em células tumorais (STURM; WAGNER, 2017). A metilação do DNA na posição 5' dos resíduos de citosina dentro dos dinucleotídeos CpG é catalisada por enzimas DNA metiltransferases e controla epigeneticamente a estabilidade e integridade do DNA. Esses eventos frequentemente ocorrem nas regiões regulatórias dos genes e a hipermetilação geralmente causa silenciamento da expressão gênica, enquanto a hipometilação frequentemente ativa a expressão dos genes (STURM; WAGNER, 2017). Células HepG2 tratadas com sulforafano demonstraram alterações epigenéticas em genes de fatores de transcrição que estão envolvidos no controle da proliferação celular e na progressão do ciclo celular (DOS SANTOS et al., 2020). Neste sentido, o estudo mostrou que sulforafano induziu a hipermetilação de *E2F3*, *THAP1* (DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**).

Outro evento epigenético desregulado na hepatocarcinogênese é o aumento da expressão das enzimas HDACs (do inglês Histone Deacetylases). Enquanto as enzimas HATs (do inglês Histone Acetyltransferase) transferem grupos acetil para resíduos de lisina nas caudas das histonas, HDACs removem estes grupos e catalisam sua transferência para outra molécula, a coenzima A. O estado de hipoacetilação da histona está associada à repressão transcricional de genes por manter a cromatina em uma estrutura condensada (LOSSON et al., 2016). Dessa forma, a alta expressão de HDACs promove o silenciamento gênico, por modular negativamente o acesso transcricional à cromatina (DOS SANTOS et al., 2020).

A proliferação descontrolada presente nos tumores pode ser consequência do silenciamento epigenético de genes supressores de tumor (STURM; WAGNER, 2017). Devido a isso, a superexpressão de HDACs em células tumorais vem sendo associada a efeitos de proteção contra vias antiproliferativas (DOS SANTOS et al., 2020). Além disso, HDACs acabam contribuindo para o desenvolvimento do tumor por interferir na

expressão de proteínas que controlam a apoptose e a diferenciação do ciclo celular (LOSSON et al., 2016). Essas alterações apresentam natureza reversível e a modulação da expressão gênica via mecanismos epigenéticos por compostos fitoquímicos pode ser uma abordagem promissora na prevenção do câncer (STURM; WAGNER, 2017).

Um estudo realizado em células HepG2 mostrou que o sulforafano é capaz de diminuir a expressão de *HDAC5* e *HDAC11* contribuindo, conseqüentemente, para diminuição da atividade da enzima HDAC (DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**). Resultados similares também foram obtidos em outros cânceres como do intestino e de próstata (STURM; WAGNER, 2017).

A inibição da proliferação celular pode acontecer também através da modulação da parada do ciclo celular (ZOU et al., 2016). O TGF- β (do inglês, Transforming Growth Factor-Beta), por exemplo, é um inibidor de crescimento eficaz de células epiteliais, incluindo de hepatócitos, que atua por, entre outros mecanismos, induzir a parada do ciclo celular (ZHANG et al., 2020). A divisão celular rápida e descontrolada é uma marca registrada do câncer e muitos compostos que inibem o processo mitótico têm se mostrado eficazes no seu controle. Dessa forma, compostos naturais, que inibem a proliferação, particularmente controlando o ciclo celular, são candidatos importantes para potenciais abordagens anticâncer (BAILON-MOSCOSO et al., 2017).

A ingestão de extrato de broto de brócolis por ratos causou aumento da expressão de genes relacionados com o controle do ciclo celular (YOSHIDA et al., 2015)(**Tabela 2**). Além disso, outros estudos também apontam que o sulforafano pode induzir a parada do ciclo celular. Estudos realizados com sulforafano (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019; DOS SANTOS et al., 2020) e outros isotiocianatos (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019) em células HepG2 mostram parada do ciclo celular na fase G2/M)(**Tabela 1**). A interrupção do ciclo celular nessa fase pode ser relacionada: à identificação de danos nos checkpoints do DNA (DOS SANTOS et al., 2020), que é controlada por p21(CDKN1A), uma proteína antiproliferativa que o sulforafano mostrou induzir a expressão (DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**)(**Figura 1**); e/ou à alteração induzida pelo composto na organização dos microtúbulos e tubulina (POCASAP;

WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019; DOS SANTOS et al., 2020). Os isotiocianatos ligam-se de forma covalente a tubulina causando mudanças conformacionais que levam à desagregação da proteína (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019). As tubulinas são proteínas que quando polimerizadas formam os microtúbulos que são estruturas essenciais durante a divisão celular (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019), principalmente durante a metáfase. Nessa fase as cromátides duplicadas, com ajuda dos microtúbulos, migram para porção equatorial para serem então divididas (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018). Além disso, estudos observaram que o sulforafano induziu a parada do ciclo celular nas fases subG0 e G1, o que sugere que o composto interrompe o ciclo por causar fragmentação no DNA das células (LIU et al., 2018; KNTAYYA et al., 2018; LIU et al., 2019a; DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**).

Os efeitos antiproliferativos do sulforafano também vêm sendo observados em células de diferentes tipos de cânceres, como no de mama e no de intestino (BAILON-MOSCOSO et al., 2017; KNTAYYA et al., 2018). Entretanto, parece que a ação do composto em células hepáticas tumorais pode ser maior do que nas células de outros tipos de cânceres (KNTAYYA et al., 2018). Além disso, o efeito do sulforafano também já foi comparado com outros isotiocianatos, e em relação ao alissina, o composto se mostrou mais seletivo para células tumorais do que para células normais de rim de macaco (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019).

4.6 O sulforafano induz a morte celular do hepatocarcinoma

A capacidade de crescimento de um tumor não é determinada apenas pela taxa de proliferação celular, sendo a morte celular outro fator fundamental (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A morte celular é uma forma natural de remover células envelhecidas ou lesionadas do organismo (GUAMAN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVITSKI, 2017) e o que se observa é que as células tumorais tornam-se resistentes a esse fenômeno (HEIDOR et al., 2020b). A indução deste evento é então considerada uma importante estratégia para o controle do câncer (GUAMAN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVITSKI, 2017; SATO et al., 2020) e atualmente, a maioria das

terapias anticâncer são direcionadas para facilitar a morte das células tumorais (ARUMUGAM et al., 2020).

Existem várias formas de morte celular (OUYANG et al., 2012) porém a apoptose, um processo altamente regulado (REN et al., 2018), no qual células individuais são eliminadas e a morfologia do tecido circundante é preservada (ARUMUGAM et al., 2020), é uma das mais estudadas (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020). A proliferação descontrolada das células, resultando em sobrevivência do tumor, e resistência quimioterápica frequentemente exibida no câncer, em grande parte, está relacionada com a desregulação na sinalização apoptótica (GUAMAN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVITSKI, 2017). Genes pró apoptóticos geralmente estão silenciados (DOS SANTOS et al., 2020) e genes anti-apoptóticos como os da família *MAPK* são superexpressos em cerca de 50% a 100% dos casos em fase de desenvolvimento do HCC (DOS SANTOS et al., 2020).

Por ser um processo que não envolve resposta inflamatória ou causa danos aos tecidos vizinhos, a indução da apoptose é considerada uma das estratégias terapêuticas mais frequentes e padrão ouro para tratamentos quimioterápicos (ZOU et al., 2016; GUAMAN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVITSKI, 2017; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018). Esse mecanismo também pode evitar que células com alterações genéticas proliferem e iniciem uma neoplasia (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020), tornando-se uma importante ferramenta quimiopreventiva (HARRIS et al., 2021; PARK et al., 2021).

Agentes quimiopreventivos naturais apresentam como um dos seus principais mecanismos a indução da apoptose (ARUMUGAM et al., 2020) e o sulforafano tem demonstrado essa atividade em estudos *in vitro* e *in vivo*. Um ensaio realizado em células com extratos de brotos e flores de brócolis mostrou que ambos induziram a morte celular programada, sendo o extrato de flores com maior atividade indutora da apoptose (PASKO et al., 2018)(**Tabela 1**). Resultados semelhantes foram observados em animais, uma vez que ratos que ingeriram dietas com broto de brócolis apresentaram maior expressão de genes relacionados à indução da apoptose (YOSHIDA et al., 2015)(**Tabela 2**).

Durante o processo apoptótico ocorre uma sequência de alterações morfológicas, como formação de bolha na membrana, encolhimento celular e

fragmentação nuclear (OUYANG et al., 2012; GUAMAN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVITSKI, 2017). A condensação da cromatina, por exemplo, indica o estágio inicial da apoptose (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018) e é geralmente acompanhada pela degradação da membrana mitocondrial, levando a diminuição do seu potencial eletroquímico (REN et al., 2018). Essas e outras alterações morfológicas características do processo apoptótico foram observados em estudos realizados com o sulforafano e seu precursor em células HepG2, reforçando a ação do composto como indutor da apoptose (ZOU et al., 2016; KNTAYYA et al., 2018; REN et al., 2018; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019)(**Tabela 1**). Além disso, apesar de outros isotiocianatos também mostrarem capacidade de indução de apoptose, em alguns modelos experimentais, o sulforafano foi um indutor da morte celular programada mais eficiente do que o fenetil (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018).

A apoptose é mediada pela via de sinalização das caspases (REN et al., 2018) e duas vias principais podem induzi-la: a extrínseca e a intrínseca (OUYANG et al., 2012). A via intrínseca ou mitocondrial é a principal na indução de apoptose por compostos fitoquímicos em células tumorais (REN et al., 2018). Ela atua através da modulação de enzimas mitocondriais ocasionando redução do potencial de membrana, aumento de sua permeabilidade e liberação do citocromo c, proteína que inicia a cascata de sinalização das caspases (OUYANG et al., 2012).

O sulforafano atua de forma efetiva no controle de células do carcinoma hepatocelular humano via apoptose mediada por mitocôndrias (ZOU et al., 2016). Estudos mostraram que o composto bioativo, assim como outro isotiocianato benzil sulforafano, reduz o potencial da membrana mitocondrial (REN et al., 2018)(**Tabela 1**) em HepG2. Além disso, um outro estudo também realizado in vitro mostrou que glucorafanina aumentou a expressão das caspases 3, 7 e 9 (KNTAYYA et al., 2018)(**Tabela 1**), algumas das essenciais para o processo apoptótico (OUYANG et al., 2012; KNTAYYA et al., 2018)(**Figura 2**).

Outras proteínas chave na regulação da apoptose e da ativação das caspases são as da família Bcl-2 (OUYANG et al., 2012). Os componentes desta família estão amplamente distribuídos na membrana mitocondrial (REN et al., 2018) e desempenham um papel crítico na regulação da estrutura da organela (GENG et al.,

2017). Dentro dessa família há membros indutores de apoptose como BAX, que atuam modulando a fusão e fissão mitocondrial ocasionando perda do potencial de membrana e ativação das caspases; e há membros anti-apoptóticos, como BCL-2, que atuam mantendo a integridade mitocondrial (OUYANG et al., 2012; GENG et al., 2017). Em muitos tipos de câncer é comum a expressão desregulada dessas proteínas (OUYANG et al., 2012), tornando-as alvos importantes para controle e prevenção da carcinogênese. O sulforafano parece atuar também nessa via, uma vez que, um estudo realizado em células HepG2 tratadas com este isotiocianato resultou no aumento dos níveis de BAX e de caspase 3 (**Figura 2**), ao mesmo tempo que reduziu os níveis de BCL 2, pró caspases 9 e pró caspase 3 (REN et al., 2018)(**Tabela 1**). Resultados semelhantes também foram encontrados em células de câncer de pulmão tratadas com sulforafano (GENG et al., 2017).

Apesar da via intrínseca estar relacionada com a indução de apoptose por compostos bioativos (REN et al., 2018), há estudos que apontam que o sulforafano tem a capacidade de atuar também na via extrínseca. Nessa via, a sinalização de ativação das caspases ocorre pela ativação de receptores de morte de superfície celular, como o FAS e TNF-R (do inglês Tumor Necrosis Factor Receptor)(REN et al., 2018), que desencadeiam vias de sinalização pró apoptóticas (OUYANG et al., 2012)(**Figura 2**). Um estudo que utilizou células HepG2 apontou que o tratamento com sulforafano aumentou a expressão de *FAS* (DOS SANTOS et al., 2020), ativando a apoptose através da via extrínseca. Esse estudo também mostrou que o sulforafano aumentou a expressão de outros genes apoptóticos como *CASP8*, *TNFRSF10A*, *DUSP4* e diminui a expressão de genes anti-apoptóticos como *ANKHD1* (DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**).

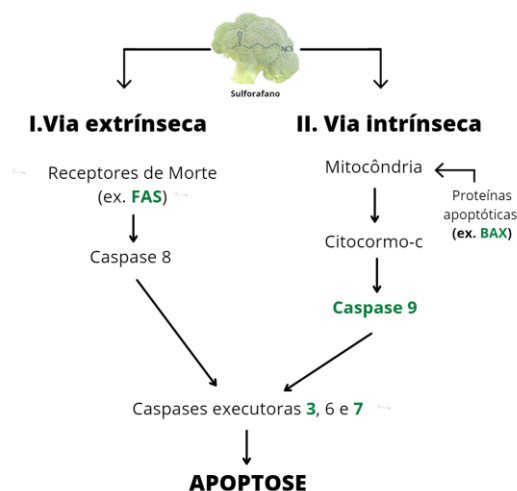


Figura 2: Ação do sulforafano na ativação da morte celular programada por apoptose. **(I) Via extrínseca:** O sulforafano aumenta a expressão do receptor FAS e das caspases executoras 3 e 7. **(II) Via intrínseca:** Sulforafano aumenta a expressão da proteína BAX e das caspases 9, 3 e 7.

Adaptado de Parolin, Reason, 2001.

A apoptose além de ser mediada pela cascata da caspase é também regulada pela via MAPK (DOS SANTOS et al., 2020). A via de sinalização do MAPK está envolvida em vários processos celulares como apoptose, proliferação e crescimento (DOS SANTOS et al., 2020), sendo a sua desregulação um evento comum no desenvolvimento do HCC (DOS SANTOS et al., 2020). Foi demonstrado que o sulforafano inibiu a ativação da via AKT/MAPK (REN et al., 2018), assim como inibiu a expressão de genes anti-apoptóticos envolvidos nessa via (DOS SANTOS et al., 2020)(**Tabela 1**).

Outro componente celular também envolvido na apoptose é o retículo endoplasmático, que é uma organela multifuncional dentro da qual ocorre o dobramento de proteínas, biossíntese de lipídios e armazenamento de cálcio (WEI; FANG, 2021). O estresse no retículo endoplasmático está associado com a indução da apoptose (ZOU et al., 2016). Um estudo mostrou que o sulforafano aumentou os níveis de proteínas marcadoras de estresse oxidativo no retículo endoplasmático em células HepG2 (ZOU et al., 2016)(**Tabela 1**). Além disso, sulforafano ativou caspase 12, enzima presente na organela, e aumentou a expressão de CHOP (do inglês C/EBP Homologous Protein), proteína envolvida na ativação do processo de morte celular programada (ZOU et al., 2016; WEI; FANG, 2021)(**Tabela 1**).

Elevadas concentrações de ROS podem então ser responsável por desencadear morte celular (LV et al., 2019; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020), sendo o estímulo do estresse oxidativo em células tumorais uma estratégia eficaz para sua eliminação (CHIKARA et al., 2018; VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020). A alta concentração dessas espécies reativas no meio intracelular por períodos prolongados causa oxidação dos seus componentes celulares, que gera prejuízos da função celular e conseqüentemente induz a morte da célula (LV et al., 2019; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019).

Como potentes indutoras da apoptose, as espécies reativas são capazes de ativar diferentes vias como a intrínseca, a extrínseca e a do estresse do retículo endoplasmático (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Na mitocôndria, ROS estimulam à perda da permeabilidade da membrana interna, interrompendo seu potencial eletroquímico e resultando na ativação das caspases 3, 6 e 7 (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020)(**Figura 2**).

Nos tumores, o estresse oxidativo pode estimular a senescência ou morte celular (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020) durante todos os estágios da carcinogênese, incluindo na metástase (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Estudos envolvendo melanoma e seus nódulos metastáticos no pulmão e no fígado, por exemplo, apontaram o estresse oxidativo como uma barreira para o processo metastático (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Apesar da terapia anticâncer baseada na produção excessiva de ROS também levar à morte de células normais, uma série de estudos atuais mostram possibilidades da ação dessas espécies ser direcionada às células tumorais, permitindo sua utilização até em combinação com a quimioterapia para promover aumento do efeito e redução dos eventos colaterais dos medicamentos anticâncer (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020).

Alguns estudos realizados em células HepG2 demonstraram que existe uma relação entre a produção de ROS e a atividade de indução da apoptose de isotiocianatos como sulforafano (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018; REN et al., 2018; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019)(**Tabela 1**). O transporte de elétrons na mitocôndria (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU,

2019) está relacionado com a defesa antioxidante das células e a apoptose (REN et al., 2018). Acredita-se que os isotiocianatos tenham a capacidade de modular os mecanismos envolvidos na regulação da cadeia de elétrons. Dessa forma, o sulforafano seria capaz de induzir apoptose nas células tumorais de hepatocarcinoma estimulando a produção de ROS (REN et al., 2018). Outros compostos naturais, parecem também promover a morte celular por meio deste mecanismo, como a aurículasina em câncer de próstata e glicosídeos triterpênicos em câncer colorretal (VOSTRIKOVA; GRINEV; GOGVADZE, 2020).

Pode parecer controverso que o sulforafano esteja relacionado com o estresse oxidativo uma vez que o composto apresenta efeitos antioxidantes. Entretanto, a ação de um composto depende de vários fatores, como de sua concentração (CHIKARA et al., 2018). Os isotiocianatos, quando em altas doses, atuam como pró-oxidantes (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019) e em menores doses causam um efeito antioxidante. A mesma lógica se aplica às próprias ROS, uma vez que influenciam a evolução do câncer de maneira dependente da concentração, induzindo a carcinogênese ou causando a morte das células tumorais (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020).

Além da apoptose outra via de morte celular é a necrose, processo que desencadeia inflamação (OUYANG et al., 2012) e que por isso não é considerado um mecanismo para controle do câncer (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019). Um estudo in vitro mostrou que brotos e flores de brócolis podem induzir necrose (PASKO et al., 2018)(**Tabela 1**). Quando a fonte de sulforafano foi os brotos de brócolis, metade das células sofreram necrose. Entretanto, no caso das flores, houve maior indução de apoptose do que de necrose nas células estudadas e a porcentagem de necrose induzida em células HepG2 foi menor do que a porcentagem de necrose induzida em outros tipos celulares analisados no estudo (PASKO et al., 2018). Outro estudo que utilizou sulforafano sintético também mostrou que o composto induziu mais apoptose do que necrose em células HepG2 (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019)(**Tabela 1**). Além disso, se comparado a outros isotiocianatos como alissina, iberina (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019) e aerolisina (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018) o sulforafano é o composto com menor

indução da necrose como morte celular. Sugere-se que a ativação da necrose pode também estar relacionada com a concentração de ROS que o composto é capaz de causar na célula. Em baixas concentrações, ROS pode desencadear a morte de células cancerosas por apoptose. Entretanto, altas concentrações dessas espécies oxidam aleatoriamente moléculas intracelulares, como DNA, lipídeos e aminoácidos, o que gera perda da integridade estrutural e funcional das células e conseqüentemente morte por necrose (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018). Dessa forma, o mecanismo que prevalece na indução de morte celular pelos isotiocianatos é dose dependente (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019).

4.7 Atuação anti-angiogênica e anti-metastática do sulforafano no HCC

Além da ativação de vias proliferativas e da resistência à morte celular, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, invasão e metástase também são alterações características da carcinogênese. Esses processos são comuns na progressão, etapa final do desenvolvimento do câncer, na qual as lesões pré neoplásicas evoluem para o câncer (HEIDOR et al., 2020a).

A metástase é um processo patológico complexo que é considerado uma causa importante da resistência ao tratamento e da morte em pacientes com neoplasia (WU et al., 2016; BAGHERI et al., 2020; LIN; LI, 2020). Durante a carcinogênese, células podem ter a capacidade de migrar e invadir locais distantes do tecido neoplásico de origem (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O estabelecimento de colônias de células neoplásicas nesses locais caracteriza a metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A metástase também está relacionada à morte em pacientes com hepatocarcinoma (SUN et al., 2020) e mesmo em tumores pequenos pode ser recorrente em cerca de 50% dos casos (LIN; LI, 2020). O HCC pode formar metástases intra ou extra-hepáticas. Os pulmões, linfonodos, ossos e glândulas renais são os principais sítios das metástases extra-hepáticas do carcinoma hepatocelular (YU et al., 2020).

Para se tornar metastática, as células tumorais adquirem propriedades agressivas em conjunto com o microambiente tumoral, que fornece estímulos para a

remodelação da matriz extracelular, proliferação, migração e invasão (GRAHAM; JIANG; MESNIL, 2018; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). As células perdem as junções que as conectam, assim como a polaridade apical - basal, tornando-se fusiformes e expressando moléculas promotoras de migração (FRIEDL; WOLF, 2003; BAGHERI et al., 2020). Esses eventos caracterizam a transição epitélio mesenquimal (EMT)(GRAHAM; JIANG;MESNIL, 2018), uma etapa crucial para a metástase de células tumorais em vários tipos de cânceres (BAGHERI et al., 2020). Na metástase, as células tumorais de origem epitelial invadem os vasos sanguíneos que se infiltram no local do tumor, aderem a suas paredes e assim são transportadas para locais distantes, onde saem da circulação para iniciar um novo carcinoma. Os tumores metastáticos são então estabelecidos quando capazes de sobreviver e crescer no novo microambiente (GRAHAM; JIANG; MESNIL, 2018).

Os processos de migração e adesão celular são então etapas essenciais para a metástase (FRIEDL; WOLF, 2003; GRAHAM; JIANG; MESNIL, 2018; LIU et al., 2018). A migração de células tumorais está relacionada com desequilíbrio entre sinais pró migratórios e inibitórios, tornando as capazes de migrar e invadir descontroladamente (FRIEDL; WOLF, 2003). Dado a importância do processo migratório nesse contexto, estudos avaliam e consideram a atividade anti-migratória de compostos para estabelecer a correlação com seu potencial anti-metastático (BAGHERI et al., 2020). Sendo assim, compostos que interferem na adesão e na migração de células cancerígenas podem ser considerados também promissores para o controle do câncer.

Como apresentado na **Tabela 1**, o sulforafano mostrou interferir tanto na adesão quanto na migração de células HepG2. O composto e seus metabólitos foram capazes de reduzir a migração celular e inibir a adesão das células HepG2 na fibronectina e no colágeno (LIU et al., 2018), componentes do microambiente importantes para a migração das células (FRIEDL; WOLF, 2003). A fibronectina, inclusive, está envolvida na remodelação da matriz extracelular durante a carcinogênese e é considerada um marcador da EMT, estando regulada positivamente em metástases de vários tipos de cânceres como mama, próstata e cólon (BAGHERI et al., 2020). Além disso, estudos realizados em modelos in vitro de câncer de mama mostraram que o sulforafano reduz a expressão de fibronectina nas células tumorais e que essa alteração coincide com a redução da migração celular (BAGHERI et al., 2020).

Além da migração celular, a angiogênese também é necessária para progressão e metástase do câncer (LIU et al., 2017; LIU et al., 2018). O oxigênio e os nutrientes são essenciais para a função e sobrevivência celular. Eles são fornecidos às células através dos vasos sanguíneos e durante a expansão de um tumor podem ser considerados recursos limitantes (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A angiogênese é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasculatura pré-existente, envolvendo células endoteliais maduras (LIU et al., 2018; MUNIR et al., 2020). Em ambientes fisiológicos, esse processo é transitório e altamente regulado (HANAHAN; WEINBERG, 2000), entretanto, em determinadas etapas da carcinogênese, as células tumorais apresentam a capacidade de ativar sinalizações pró angiogênicas de forma descontrolada (HANAHAN; WEINBERG, 2000; MUNIR et al., 2020). Assim, embora a angiogênese por si só não inicie a carcinogênese, ela é essencial para metástase (HAUGEN et al., 2018) por permitir a distribuição dos recursos necessários para proliferação das células malignas, levando nutrientes e retirando os metabólitos tóxicos. Além disso, esse processo também facilita a invasão das células tumorais à corrente sanguínea, pois os novos vasos formados são imaturos e hiper permeáveis (JIANG et al., 2020). Essas características inclusive, tornam a avaliação de vasos sanguíneos nos tumores um marcador importante para definição do estágio da doença (MUNIR et al., 2020).

No HCC a maioria dos casos de metástase ocorrem através dos vasos sanguíneos, sendo a metástase linfática a segunda via mais frequente (LIN; LI, 2020). A metástase hematogênica extra-hepática geralmente ocorre em estágio inicial da doença e cerca de 60% dos pacientes com HCC desenvolvem metástases por essa via (LIN; LI, 2020). O HCC é considerado um dos tumores sólidos mais vascularizados e por isso a angiogênese desempenha um papel tão crucial no seu desenvolvimento (LIU et al., 2017). Várias vias angiogênicas foram identificadas como desreguladas neste tipo de câncer (MORSE et al., 2018), e elas podem representar importantes alvos para a prevenção e controle do HCC (LIU et al., 2017; MUNIR et al., 2020).

O processo angiogênico é complexo e se caracteriza por uma série de alterações nas células endoteliais, como o remodelamento da matriz extracelular (LIU et al., 2017). Algumas evidências sugerem que durante a angiogênese há sinalizações diretas entre as células tumorais e as células endoteliais (LIU et al., 2017). Células

HepG2, por exemplo, estimulam a migração e adesão de células endoteliais e consequentemente a formação de tubos (LIU et al., 2017; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018). Estudos mostram que o sulforafano, além de atuar diretamente nas células endoteliais (LIU et al., 2018; POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018), diminuindo migração e adesão celular (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018), também apresenta ação nas próprias células HepG2. Como apresentado na **Tabela 1**, o tratamento com o sulforafano foi capaz de suprimir o recrutamento e estímulo de HepG2 às células endoteliais de maneira dose dependente (LIU et al., 2017), o que indica que o composto poderia inibir o efeito pró-migratório que as células HepG2 apresentam nas células endoteliais humanas (HUVECs)(LIU et al., 2017).

Além disso, a indução da angiogênese pode ser mediada por moléculas que são liberadas na corrente sanguínea, como o VEGF (do inglês Vascular Endothelial Growth Factor)(HAUGEN et al., 2018), que é considerado o mensageiro chave nesse processo (LIU et al., 2017; MUNIR et al., 2020). O VEGF é produzido por vários tipos celulares, por exemplo, células tumorais, fibroblastos e células inflamatórias. Eles interagem com VEGFR (do inglês Receptor Vascular endothelial growth factor) que se encontram principalmente nas células endoteliais (MUNIR et al., 2020). A interação de VEGF-VEGFR nas células endoteliais inicia a via de sinalização intracelular que resulta na maturação, sobrevivência, migração e proliferação das células endoteliais (MUNIR et al., 2020). VEGF também foi identificado como o sinal angiogênico principal na mediação parácrina do HCC (LIU et al., 2017) e muitos quimioterápicos indicados para essa patologia se baseiam na inibição desse fator (CHEN et al., 2020). Assim, regular a expressão de VEGF pode ser uma estratégia para controle da angiogênese no HCC.

A expressão de VEGF é amplamente controlada por dois ativadores de transcrição principais: STAT3 (do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription 3) e HIF-1 α (do inglês, Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha)(LIU et al., 2017)(**Figura 1**). STAT3 regula a proliferação, maturação e sobrevivência celular e é um ativador transcricional direto do gene VEGF. Além disso, STAT3 também induz a expressão de HIF1- α (TOLOMEO; CASCIO, 2021), um regulador importante para a angiogênese tumoral e para o controle da apoptose de células endoteliais, geralmente ativado nas condições de hipóxia dos tumores. A principal via envolvida na sua

ativação é a da PI3K (**Figura 1**). Quando ativado HIF-1 α migra do citosol para o núcleo, desencadeando uma cascata de sinalização que entre outros pontos culmina na expressão de VEGF (LEE; GOLDFINGER, 2014). STAT 3 e HIF1- α podem então ligar-se simultaneamente ao promotor de VEGF, levando à sua ativação transcricional (TOLOMEO; CASCIO, 2021).

Em vários cânceres, incluindo no HCC, esses fatores são regulados positivamente (LIU et al., 2017). O nível de STAT 3 está diretamente correlacionado com mau prognóstico do câncer (KUNNUMAKKARA et al., 2018). Além disso, já foi demonstrado que a supressão de fatores como STAT 3 e HIF-1 α inibe o crescimento do hepatocarcinoma (LIU et al., 2017). Como apresentado na **Tabela 1**, um estudo realizado em células HepG2 mostrou que o sulforafano e seus metabólitos foram capazes de diminuir a ativação de STAT 3 (LIU et al., 2017). Além disso, o composto também mostrou reduzir as concentrações de IL-6, citocina considerada a ativadora mais bem estabelecida de STAT 3 (ZHAO et al., 2018; AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020)(**Tabela 1**). Um outro estudo realizado in vivo, com embrião de galinha, mostrou resultados semelhantes. Nele, sulforafano foi capaz de reduzir o volume dos tumores, provavelmente como consequência da sua atuação na redução dos níveis de HIF1- α e VEGF nos tecidos tumorais (LIU et al., 2017)(**Tabela 2**). A atuação do sulforafano nesses fatores transcricionais então reforça seu potencial em agir no controle da angiogênese.

4.8 Cenário geral: biodisponibilidade, segurança e perspectivas do sulforafano

A quimioprevenção pela alimentação é uma abordagem com baixo custo, facilmente aplicável e acessível que pode prevenir o surgimento de doenças crônicas como o câncer (STURM; WAGNER, 2017). Entretanto, para avaliação da viabilidade da utilização de um composto bioativo como agente quimiopreventivo, além da compreensão da sua atividade, a discussão sobre sua biodisponibilidade e segurança é de extrema importância (LA MARCA et al., 2012).

Nos vegetais crucíferos encontram-se os precursores do sulforafano, os glucosinolatos. Os glucosinolatos são metabólitos secundários estáveis, solúveis em

água, produzidos em várias plantas da família *Brassicaceae* (gênero *Brassica*). Eles contêm enxofre em suas estruturas e quando hidrolisados dão origem aos isotiocianatos (KIM et al., 2018). Há uma série de precursores dessa classe, porém a glucorafanina (4-metilsulfnilbutilglucosinolato)(LIU et al., 2019) é a mais estudada do grupo (GAO et al., 2021).

A hidrólise desses precursores acontece pela ação da enzima mirosinase, que está presente nas células vegetais e nas bactérias da microbiota intestinal humana (KIM et al., 2018). A maioria dos isotiocianatos absorvidos por mamíferos pela alimentação são formados pela ação de mirosinase de bactérias do trato gastrointestinal (LA MARCA et al., 2012). Nos vegetais, a enzima está presente na parede das células e os glucosinolatos em um compartimento fisicamente separado. Apenas quando as células vegetais sofrem algum tipo de estresse, como rompimento da parede celular por trituração ou aquecimento do vegetal, os glucosinolatos são modificados pela mirosinase (LA MARCA et al., 2012; KAMAL et al., 2020; GAO et al., 2021; KRAJKA-KUŹNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021).

A mirosinase cliva a beta-tio-ligação de glucosídeo da molécula de glucosinolato, produzindo glicose, sulfato e um intermediário aglucon instável. Este aglucon se reorganiza espontaneamente para formar um isotiocianato específico (MATUSHESKI; JEFFERY, 2001), sofrendo influência de fatores como pH, temperatura e o próprio tipo de precursor (MATUSHESKI; JEFFERY, 2001; KAMAL et al., 2020; GAO et al., 2021). No brócolis, o glucosinolato primário é a glucorafanina que é convertida em sulforafano (MATUSHESKI; JEFFERY, 2001; KENSLER et al., 2005). A inativação da enzima causada pelo cozimento de brócolis frescos ou pelo procedimento de branqueamento-congelamento, mostrou reduzir a biodisponibilidade de isotiocianatos em seres humanos (STURM; WAGNER, 2017). Após esses procedimentos a hidrólise dos glucosinolatos fica dependente apenas da atividade das enzimas da flora entérica. Assim, nesses casos, a variação interindividual da microbiota humana se torna determinante para formação dos isotiocianatos (KENSLER et al., 2005).

Estudos relataram perfil cinético favorável de isotiocianatos de ocorrência natural (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018). No organismo, os isotiocianatos são absorvidos pelas células intestinais por difusão passiva. Os compostos são

conjugados a GSH pela enzima GST, gerando os metabólitos sulforafano-GSH (SFN-GSH). Eles sofrem uma sequência de reações enzimáticas da via do ácido mercaptúrico, formando produtos ditiocarbamatos ao sofrer conjugação com cisteína glicina (SFN-CG), cisteína (SFN-Cys) e N-acetilcisteína (SFN-NAC) (Figura 3) (STURM; WAGNER, 2017; LIU et al., 2018). Após metabolização os produtos são transportados para os rins para serem excretados pela urina (KENSLEER et al., 2005; STURM; WAGNER, 2017).

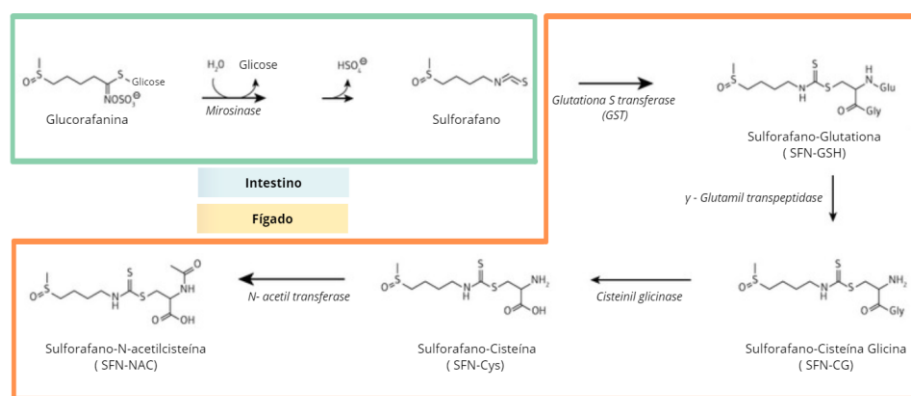


Figura 3: Metabolismo do sulforafano no organismo humano. A glucorafanina, precursora do sulforafano, pode ser metabolizada pela enzima mirosinase presente na microbiota intestinal. Em seguida, o sulforafano sofre metabolismo de primeira passagem no fígado, através da via do ácido mercaptúrico, formando assim os ditiocarbamatos (SFN-CG, SFN-Cys e SFN-NAC) que serão eliminados na urina.

Adaptado de Linus Pauling Institute, 2021.

Os isotiocianatos sofrem metabolismo de primeira passagem, ou seja, após absorção gastrointestinal passam pelo sistema porta hepático (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019). Esse processo rapidamente produz metabólitos e reduz a concentração do isotiocianato ingerido antes da distribuição para outros tecidos do corpo (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019). Eles também são encontrados em concentrações mais baixas na circulação sistêmica (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2018). O metabolismo dos isotiocianatos tem como característica a meia vida curta dos compostos no organismo (KENSLEER et al., 2005). Um estudo realizado em seres humanos que receberam 200 μM de isotiocianatos de brócolis, contendo principalmente sulforafano, mostrou que a meia vida dos compostos é de aproximadamente 1,8 horas (YE et al., 2002). Já, por exemplo, resveratrol, composto bioativo que não sofre extenso metabolismo entero-

hepático, apresenta meia vida aproximada de 9,2 horas em seres humanos (WANG; SANG, 2018). Em contrapartida, os isotiocianatos apresentam concentrações hepáticas significativas após administração oral, tornando-os uma opção importante para estudos de quimioprevenção do HCC (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019).

Muito se questiona sobre os efeitos desejáveis dos compostos bioativos só serem observados em doses elevadas, que não são viáveis para o consumo humano. Alguns agentes quimiopreventivos dietéticos mostram atividades anticancerígenas quando testados *in vitro*, mas quando testados *in vivo* não conseguem demonstrar eficácia comparável, devido, muitas vezes, à questão de dose do composto avaliado (KRAJKA-KUŹNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021). Ao contrário de outros compostos bioativos, os glucosinolatos estão presentes em concentrações relativamente altas em porções habitualmente consumidas de vegetais crucíferos (LINUS PAULING INSTITUTE, 2021), apresentando também alta biodisponibilidade oral (TELANG; JI; MORRIS, 2009). Além disso, estudos demonstram que as concentrações de sulforafano necessárias para citoproteção são reduzidas, na ordem de 10 μM , o que é possível ser alcançado *in vivo*, inclusive em seres humanos (GAN et al., 2010). Ademais, devido ao metabolismo de primeira passagem, as concentrações hepáticas dos isotiocianatos são maiores que as plasmáticas (POCASAP; WEERAPREEYAKUL; THUMANU, 2019), favorecendo assim a observação de efeitos citoprotetores no fígado (AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020).

Um estudo demonstrou que o consumo de uma refeição rica em vegetais crucíferos proporciona uma concentração fisiológica de sulforafano que varia de 1 a 7 μM no plasma (LIU et al., 2017). Foi demonstrado em seres humanos que o consumo de 200 μM de isotiocianato de brócolis (aproximadamente 35 mg de sulforafano) pode resultar em cerca de 2 μM de sulforafano no plasma após cerca de 2 horas (YE et al., 2002; AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020). Outro estudo clínico demonstrou a concentração de até 7,3 μM de sulforafano no plasma após o consumo de 100 g de brócolis contendo 345 μM (aproximadamente 60 mg) de sulforafano e seus metabólitos (GASPER et al., 2005; AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020).

A quantidade de sulforafano no brócolis depende de muitos fatores como espécie, forma de cultivo e parte do vegetal considerada (LINUS PAULING INSTITUTE, 2021). Neste sentido, brotos de brócolis são considerados uma fonte rica de sulforafano

que se diferenciam da planta madura por conter até 50 vezes mais glucorafanina (KENSLEER et al., 2005). Além disso, eles apresentam também concentrações de sulforafano 10 vezes maiores do que as encontradas nas flores do vegetal (PASKO et al., 2018). Entre as mesmas estruturas do brócolis também existe variação. Foi demonstrado que o brócolis apresenta 60 mg de sulforafano a cada 100g do vegetal (GASPER et al., 2005). Porém, a quantidade de sulforafano pode variar de 113 mg (PASKO et al., 2018) até 1153 mg (NAKAGAWA, K. et al., 2006) a cada 100g de broto de brócolis seco. Assim, considerando a menor quantidade de sulforafano no brócolis (60 mg/100 g) e a menor correlação entre sulforafano consumido e quantidade no plasma (200 μ M/ 2 μ M), cerca de 300 g de brócolis já forneceria aproximadamente 175 mg de sulforafano. Essa quantidade resultaria em, aproximadamente, 10 μ M do isotiocianato no plasma, viabilizando dessa forma a sua atividade biológica, inclusive como agente quimiopreventivo.

Mais estudos são necessários para explorar questões de dosagens adequadas destes compostos. Entretanto, mesmo que a biodisponibilidade do sulforafano presente nos alimentos seja o ponto limitante para seu uso como agente quimiopreventivo, alternativas ainda podem ser exploradas. Técnicas de cultivo podem ser utilizadas para aumentar a concentração de sulforafano nos vegetais crucíferos. Já foi demonstrado, por exemplo, que a couve cultivada em condições controladas apresenta concentrações de sulforafano mais altas do que aquelas cultivadas em campo aberto (KIM et al., 2018).

Em relação à segurança, é importante para a quimioprevenção a utilização de agentes que tenham toxicidade reduzida (LIU et al., 2018). Resultados do ensaio de viabilidade de um estudo in vitro indicaram que células tratadas com sulforafano em até 32 μ M não foram associadas a nenhum efeito tóxico (AL-BAKHEIT; ABU-QATOUSEH, 2020). Extrato de semente de brócolis não mostrou atividade mutagênica no teste de Ames (ZHOU et al., 2015), ensaio bacteriano desenhado especificamente para detecção de substâncias que causam danos ao DNA (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Em animais, foi observado que a administração de 30-60 mg/kg de glucorafanina foi segura (LAI et al., 2008) e nenhuma evidência de potencial genotóxico foi observada em ensaios in vivo com doses de até 10 g de extrato de semente de brócolis por kg de peso corporal (ZHOU et al., 2015). Esse mesmo estudo realizado em ratos apontou

como NOAEL (do inglês No Observed Adverse Effect Level) a ingestão de 3000 mg /kg/ dia de extrato de semente de brócolis (ZHOU et al., 2015). Em seres humanos, os dados são escassos, entretanto, em um ensaio clínico não foram observados efeitos adversos com a ingestão de 30 mg de glucorafanina (KIKUCHI, 2015). Mais estudos em seres humanos são necessários para avaliação dos efeitos de maiores concentrações de sulforafano no organismo. Mesmo assim, de acordo com FDA, a extrapolação das doses de NOAEL entre espécies através da normalização da área de superfície corporal é considerada um método adequado (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2005) e para esse caso do sulforafano, a ingestão de 480 mg/kg/dia de extrato de semente de brócolis, com 15% de glucosinolato, pode ser considerada segura. Neste sentido, mesmo que de forma pouco precisa, caso comparado às quantidades mínimas de sulforafano a ser consumida para ser observado efeitos citoprotetores (aproximadamente 175 mg), o composto se mostraria seguro.

A utilização do sulforafano também pode ser explorada em outros cenários. A combinação de agentes quimiopreventivos, que diferem em seus mecanismos de ação, fornece maior eficácia por potencializar os efeitos antineoplásicos (THAKKA et al., 2013; RIZEQ et al., 2020; KRAJKA-KUŹNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2021). Já foi observado, por exemplo, que a associação do sulforafano com outros compostos bioativos, como a quercetina e a epigalocatequina, resulta em maior atividade quimiopreventiva do câncer de pâncreas e reduz a quimiorresistência em modelo experimental de câncer de ovário (CHEN et al., 2013; APPARI et al., 2014). Essa é uma alternativa que também pode ser mais estudada no cenário do HCC. Além disso, a combinação de compostos bioativos com terapias anticâncer tem se mostrado uma alternativa com vantagens importantes. A abordagem, além de ser um meio de combate à resistência as terapias, reduz a dose dos fármacos e contribui para diminuição da toxicidade e do custo do tratamento (CHAN; CHEN; FONG, 2018; CHAMBERLIN et al., 2019). Em modelos in vivo de câncer de cabeça e pescoço, o sulforafano permitiu uso de doses mais baixas de cisplatina e 5-fluorouracil por aumentar a citotoxicidade dos fármacos (ELKASHTY; TRAN, 2020). Além disso, ele mostrou aumentar a sensibilidade à radioterapia em modelos in vitro e in vivo do HCC (REN et al., 2017), reforçando seu potencial para o controle da patologia.

5. CONCLUSÃO

A análise dos resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* considerados para elaboração desta revisão mostrou que o sulforafano modula vias envolvidas em diferentes fases da carcinogênese (**Figura 4**), que são classicamente desreguladas no câncer de fígado. Dessa forma, o composto se mostrou um agente quimiopreventivo eficaz em diferentes modelos experimentais de HCC. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para avaliar dosagem e fonte adequada para o composto desempenhar seus efeitos quimiopreventivos de forma segura.

A utilização do sulforafano para controle do HCC se mostra promissora. Diferente das alternativas utilizadas atualmente contra essa patologia, por ser uma abordagem quimiopreventiva utilizando compostos da alimentação, ela apresenta baixo custo e toxicidade reduzida. Se comparado a outros isotiocianatos, o composto também se mostrou mais seletivo para as células tumorais do que para células normais. Além disso, o alcance das concentrações fisiológicas mínimas para sua ação como agente quimiopreventivo se mostra potencialmente seguro e viável. Diferente de outros compostos bioativos, os isotiocianatos estão presentes em concentrações relativamente altas, em porções comumente consumidas de vegetais crucíferos e, seus metabólitos também apresentam atividade biológica. Esses e outros benefícios do sulforafano podem ainda ser melhores explorados através de estratégias como: a combinação do composto com diferentes compostos bioativos da dieta, aumentando a eficácia da abordagem e/ou a sua associação em terapias antineoplásicas, reduzindo custos e efeitos colaterais dos tratamentos.

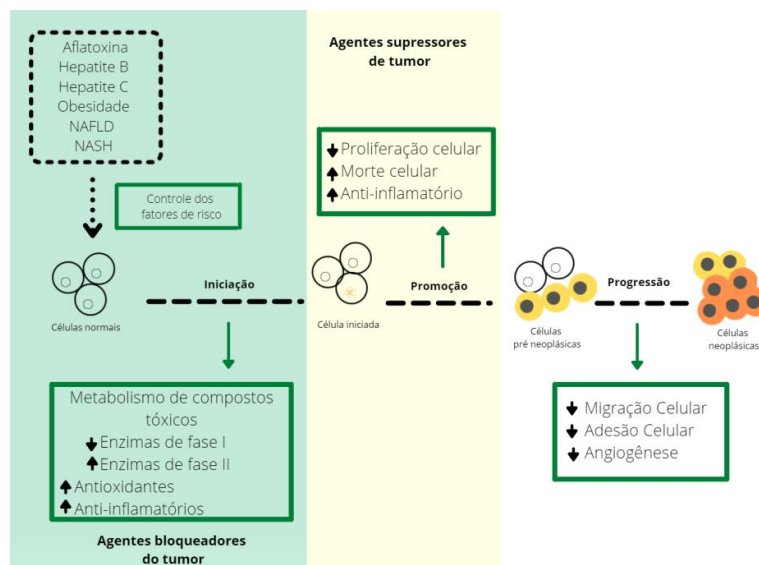


Figura 4: Sulforafano como agente quimiopreventivo em diferentes etapas da hepatocarcinogênese. Ao atuar na inativação da aflatoxina, no combate das infecções virais da hepatite B e C e na redução da obesidade, de NAFLD e NASH, o sulforafano controla o desenvolvimento dos fatores de risco do hepatocarcinoma e conseqüentemente protege a transformação de células normais às células iniciadas. Por apresentar efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e atuar no metabolismo de compostos tóxicos, reduzindo a expressão de enzimas de fase I e aumentando a expressão de enzimas de fase II, o sulforafano bloqueia o início da carcinogênese. Compostos como sulforafano que atuam prevenindo a iniciação do câncer são denominados agentes bloqueadores do tumor. Uma vez que reduz a proliferação celular, induz a morte celular e controla o microambiente inflamatório, o sulforafano atua também como agente supressor do câncer inibindo a promoção de células iniciadas às células pré-neoplásicas. Por promover a redução da angiogênese, migração e adesão celular, ele contribui para que células pré-neoplásicas não evoluam para neoplasia.

Adaptado de Trejo-Solís et al., 2013; Saeidni, Abdollahi, 2014; Singh, Suman, Shukla, 2014.

6. BIBLIOGRAFIA

AL-BAKHEIT, A.; ABU-QATOUSEH, L. Sulforaphane from broccoli attenuates inflammatory hepcidin by reducing IL-6 secretion in human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104210, 2020.

APPARI, M. et al. Sulforaphane, quercetin and catechins complement each other in elimination of advanced pancreatic cancer by miR-let-7 induction and K-ras inhibition. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 4, p. 1391–1400, 2014.

ARNOLD, M. et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. **Gastroenterology**, v. 159, n. 1, p. 335-349, 2020.

ARUMUGAM, A. et al. Induction of Apoptosis by Gluconasturtiin-Isothiocyanate (GNST-ITC) in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells and Human Breast Adenocarcinoma MCF-7 Cells. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1240, 2020.

BAILON-MOSCOSO, N. et al. Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 106–131, 2017.

BAGHERI M. et al. Sulforaphane Modulates Cell Migration and Expression of β -Catenin and Epithelial Mesenchymal Transition Markers in Breast Cancer Cells. **Iranian journal of public health**, v. 49, n. 1, 2020.

BERTI, E.; BARTSCH, H.; GERHAUSER, C. Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. **American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 3, p. 1538-8514, 2006.

BIELECKA, Z.; CZARNECKA, A.; SZCZYLIK, C. Genomic Analysis as the First Step toward Personalized Treatment in Renal Cell Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 4, 2014.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 294-424, 2018.

CARBONE, M. et al. Tumour predisposition and cancer syndromes as models to study gene–environment interactions. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 9, p. 533–549, 2020.

CARRILHO, F. J. et al. Epidemiology of Liver Cancer in Latin America: Current and Future Trends. **Seminars in Liver Disease**, v. 40, n. 02, p. 101–110, 2019.

CHAMBERLIN, S. R. et al. Natural Product Target Network Reveals Potential for Cancer Combination Therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

CHAN, M. M.; CHEN, R.; FONG, D. Targeting cancer stem cells with dietary phytochemical - Repositioned drug combinations. **Cancer Letters**, v. 433, p. 53–64, 2018.

CHANG, M. H. et al. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. **Gastroenterology**, v. 151, n. 3, p. 472-480, 2016.

CHEN, C.; KAO, C.; LIU, C. The Cancer Prevention, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation of Bioactive Phytochemicals Targeting the TLR4 Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2729, 2018.

CHEN, J. S. et al. PIK3CD induces cell growth and invasion by activating AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling in colorectal cancer. **Cancer Science**, v. 110, n. 3, p. 997–1011, 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**, v. 319, n. 5, p. 697–706, 2013.

CHEN, Y. J.; WALLIG, M. A.; JEFFERY, E. H. Dietary Broccoli Lessens Development of Fatty Liver and Liver Cancer in Mice Given Diethylnitrosamine and Fed a Western or Control Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 3, p. 542–550, 2016.

CHEN, Z. et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 9, p. 2993–3036, 2020.

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

CHOI, K. M. et al. Sulforaphane attenuates obesity by inhibiting adipogenesis and activating the AMPK pathway in obese mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 201–207, 2014.

CRAIG, A. J.; FELDEN, J. V.; GARCIA-LEZANA, T.; SARCOGNATO, S.; VILLANUEVA, A. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 3, p. 139–152, 2019.

DOS 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**, v. 136, p. 111047, 2020.

D'SOUZA, S. et al. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 38, p. 5759–5783, 2020.

ELKASHTY, O. A.; TRAN, S. D. Broccoli extract increases drug-mediated cytotoxicity towards cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 123, n. 9, p. 1395–1403, 2020.

FISHBEIN, A. et al. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 218, p. 107670, 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers**. Estados Unidos, 2005. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers>> Acesso em: 1 Agosto de 2021.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–374, 2003.

GABBIA, D.; CANNELLA, L. ; DE MARTIN, S. The Role of Oxidative Stress in NAFLD–NASH–HCC Transition—Focus on NADPH Oxidases. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, p. 687, 2021.

GAN, N. et al. Sulforaphane protects Microcystin-LR-induced toxicity through activation of the Nrf2-mediated defensive response. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 247, n. 2, p. 129–137, 2010.

GAO, L. et al. Identification of sulforaphane regulatory network in hepatocytes by microarray data analysis based on GEO database. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 2, 2021.

GAONA-GAONA, L. et al. Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. **Toxicology**, v. 286, n. 1-3, p. 20–27, 2011.

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

GENG, Y. et al. Sulforaphane Induced Apoptosis via Promotion of Mitochondrial Fusion and ERK1/2-Mediated 26S Proteasome Degradation of Novel Pro-survival Bim and Upregulation of Bax in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 13, p. 2456–2470, 2017.

GILLMAN, R. et al. The role of DNA damage and repair in liver cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1875, n. 1, p. 188493, 2021.

GRAHAM, S.; JIANG, J.; MESNIL, M. Connexins and Pannexins: Important Players in Tumorigenesis, Metastasis and Potential Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1645, 2018.

GUAMAN-ORTIZ, L.; ORELLANA, M.; RATOVITSKI, E. Natural Compounds As Modulators of Non-apoptotic Cell Death in Cancer Cells. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 132–155, 2017.

GUERRA, C. et al. Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. **Cancer Cell**, v. 11, n. 3, p. 291–302, 2007.

GURPINAR, E.; GRIZZLE, W. E.; PIAZZA, G. A. COX-Independent Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anti-Inflammatory Drugs. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R.; BOCK, P. M. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**, v. 37, n. 3, p. 203–213, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell Press**, v.100, n. 1, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARRIS, C. et al. Effects of in vivo treatment of mice with sulforaphane on repair of DNA pyridyloxylbutylation. **Toxicology**, v. 454, p. 152753, 2021.

HAUGEN, B. et al. Granulin Secreted by the Food-Borne Liver Fluke *Opisthorchis viverrini* Promotes Angiogenesis in Human Endothelial Cells. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 2018.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, 2020.

HEIDOR, R. et al. Nutrition and Liver Cancer Prevention In: ONG, T. P.; MORENO, F. S. **Nutrition and Cancer Prevention: From Molecular Mechanisms to Dietary Recommendations**. São Paulo: The Royal Society of Chemistry, 2020. p. 337-350.

HEIDOR, R. et al. Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables and Cancer Prevention In: ONG, T. P.; MORENO, F. S. **Nutrition and Cancer Prevention: From Molecular Mechanisms to Dietary Recommendations**. São Paulo: The Royal Society of Chemistry, 2020. p. 13-23.

HUANG, D. Q.; EL-SERAG, H. B.; LOOMBA, R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 4, p. 223–238, 2020.

HU, R. et al. Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. **Cancer Letters**, v. 243, n. 2, p. 170–192, 2006.

HOU, Y.; WU, B. Atezolizumab plus bevacizumab versus sorafenib as first-line treatment for unresectable hepatocellular carcinoma: a cost-effectiveness analysis. **Cancer Communications**, v. 40, n. 12, p. 743-745, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Câncer de fígado**. Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-figado>> Acesso em: 7 dezembro 2020.

LINUS PAULING INSTITUTE. **Isothiocyanates**. Disponível em: <<https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates#metabolism-bioavailability>>. Acesso em: 6 setembro 2021.

JAMES, D. et al. Novel concepts of broccoli sulforaphanes and disease: induction of phase II antioxidant and detoxification enzymes by enhanced-glucoraphanin broccoli. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 11, p. 654–665, 2012.

JIANG, X. et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, 2020.

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**, v. 43, n. 4, p. 371–384, 2020.

KANWAL, F.; SINGAL, A. G. Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: Current Best Practice and Future Direction. **Gastroenterology**, v. 157, n. 1, p.54-64, 2019.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. C375–C391, 2021.

KENSLER, T. W. et al. Effects of Glucosinolate-Rich Broccoli Sprouts on Urinary Levels of Aflatoxin-DNA Adducts and Phenanthrene Tetraols in a Randomized Clinical Trial in He Zuo Township, Qidong, People's Republic of China. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 11, p. 2605–2613, 2005.

KIKUCHI, M. Sulforaphane-rich broccoli sprout extract improves hepatic abnormalities in male subjects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 43, p. 12457, 2015.

KIM, S. et al. Exposure of kale root to NaCl and Na₂SeO₃ increases isothiocyanate levels and Nrf2 signalling without reducing plant root growth. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

KIM, S. et al. Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 516–524, 2009.

KIM, S. et al. PI3K/Akt contributes to increased expression of Toll-like receptor 4 in macrophages exposed to hypoxic stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 419, n. 3, p. 466–471, 2012.

KNTAYYA, S. et al. Induction of Apoptosis and Cytotoxicity by Isothiocyanate Sulforaphane in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 718, 2018.

KRAJKA-KUŹNIAK, V.; BAER-DUBOWSKA, W. Modulation of Nrf2 and NF-κB Signaling Pathways by Naturally Occurring Compounds in Relation to Cancer Prevention and Therapy. Are Combinations Better Than Single Compounds? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8223, 2021.

KUNNUMAKKARA, A. et al. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, 2018.

- LAI, R. et al. Evaluation of the safety and bioactivity of purified and semi-purified glucoraphanin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 195–202, 2008.
- LA MARCA, M. et al. Structural influence of isothiocyanates on expression of cytochrome P450, phase II enzymes, and activation of Nrf2 in primary rat hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2822–2830, 2012.
- LEE, S.; GOLDFINGER, L.E. RLIP76 regulates HIF-1 activity, VEGF expression and secretion in tumor cells, and secretome transactivation of endothelial cells. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 9, p. 4158–4168, 2014.
- LIN, Y.; LI, Y. Study on the hepatocellular carcinoma model with metastasis. **Genes & Diseases**, v. 7, n. 3, p. 336–350, 2020.
- LIU, P. et al. Sulforaphane exerts anti-angiogenesis effects against hepatocellular carcinoma through inhibition of STAT3/HIF-1 α /VEGF signalling. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- LIU, P. et al. Antioxidant effects of sulforaphane in human HepG2 cells and immortalised hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 129–136, 2019.
- LIU, P. et al. Chemopreventive Activities of Sulforaphane and Its Metabolites in Human Hepatoma HepG2 Cells. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 585, 2018.
- LIU, P. et al. NOD-like receptor signaling in inflammation-associated cancers: From functions to targeted therapies. **Phytomedicine**, v. 64, p. 152925, 2019.
- LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, 2021.
- LOSSON, H. et al. Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1608, 2016.
- LV, H. et al. Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–16, 2019.
- MARONGIU, F.; SERRA, M.; LACONI, E. Development versus Evolution in Cancer Biology. **Trends in Cancer**, v.4, n.5, p.342-348, 2018.
- MATUSHESKI, N. V.; JEFFERY, E. H. Comparison of the Bioactivity of Two Glucoraphanin Hydrolysis Products Found in Broccoli, Sulforaphane and Sulforaphane Nitrile. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5743–5749, 2001.
- MAZARAKIS, N. et al. The potential use of l-sulforaphane for the treatment of chronic inflammatory diseases: A review of the clinical evidence. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 3, p. 664–675, 2020.

MCGLYNN, K. A.; PETRICK, J. L.; ERAG, H. B. E. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, v. 73, n.1, p. 4-13, 2021.

MEJIA, J. C.; PASKO, J. Primary Liver Cancers Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 3, p. 535–549, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução –RE nº 2.887, de 6 de AGOSTO de 2020. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ed. 152, p.73, 10 agosto 2020. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-2.887-de-6-de-agosto-de-2020-271229694>>. *Online*. Acesso em: 8 Dezembro 2020.

MORENO, F. S.; HEIDOR, R.; POGRIBNY, I. P. Nutritional Epigenetics and the Prevention of Hepatocellular Carcinoma with Bioactive Food Constituents. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 5, p. 719-733 , 2016.

MORSE, M. et al. The Role of Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 3, p. 912–920, 2018.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, EI. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29–60, 2000.

MUNIR, S. et al. Anti-angiogenesis Potential of Phytochemicals for the Therapeutic Management of Tumors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 2, p. 265–278, 2020.

NAKAGAWA, K. et al. Evaporative Light-Scattering Analysis of Sulforaphane in Broccoli Samples: Quality of Broccoli Products Regarding Sulforaphane Contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2479–2483, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Dictionary of Cancer Terms**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/histone>>. Acesso em: 22 Agosto 2021.

ORANRATNACHAI, S. et al. Efficacy of First Line Systemic Chemotherapy and Multikinase Inhibitors in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

PARK S. Y. et al. Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. **Oncology reports**, v. 18, n. 1, 2021.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138–144, 2001.

PAŠKO, P. et al. Comparative Study of Predominant Phytochemical Compounds and Proapoptotic Potential of Broccoli Sprouts and Florets. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 95–100, 2018.

PEARSON, H.; MARSHALL, L. V.; CARCELLER, F. Sorafenib in pediatric hepatocellular carcinoma from a clinician perspective. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 37, n. 5, p. 412–423, 2020.

PÉREZ-TORRES, I. et al. Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1786, 2021.

PITOT, H. C. Adventures in Hepatocarcinogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 2, n. 1, p. 1–29, 2007.

POCASAP, P.; WEERAPREEYAKUL, N.; THUMANU, K. Alyssin and Iberin in Cruciferous Vegetables Exert Anticancer Activity in HepG2 by Increasing Intracellular Reactive Oxygen Species and Tubulin Depolymerization. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 540–552, 2019.

POCASAP, P.; WEERAPREEYAKUL, N.; THUMANU, K. Structures of isothiocyanates attributed to reactive oxygen species generation and microtubule depolymerization in HepG2 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 698–709, 2018.

REN, J. et al. Benzyl sulforaphane is superior to sulforaphane in inhibiting the Akt/MAPK and activating the Nrf2/ARE signalling pathways in HepG2 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 12, p. 1643–1653, 2018.

REN, K. et al. Sulforaphane enhances radiosensitivity of hepatocellular carcinoma through suppression of the NF- κ B pathway. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 8, p. e21917, 2017.

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

ROTHER, E. T. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. **Acta Paul Enferm**, v.20, n. 2, p. 1, 2007.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Perspective Studies on Novel Anticancer Drugs from Natural Origin: A Comprehensive Review. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 90-108, 2014.

SAHASRABUDDHE, V. et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use, Chronic Liver Disease, and Hepatocellular Carcinoma. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 23, p. 1808–1814, 2012.

SATHIPATI, S. Y.; HO, S. Y. Novel miRNA signature for predicting the stage of hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

SATO, A. et al. Anticancer Strategy Targeting Cell Death Regulators: Switching the Mechanism of Anticancer Floxuridine-Induced Cell Death from Necrosis to Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5876, 2020.

SATO S. et al. Sulforaphane Inhibits Liver Cancer Cell Growth and Angiogenesis. **Cancer Research**, v. 06, n. 04, 2018.

SEYYEDEBRAHIMI, S. et al. The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Acta Diabetologica**, v. 55, n. 4, p. 341–353, 2018.

SINGH, M.; SUMAN, S.; SHUKLA, Y.R. New Enlightenment of Skin Cancer Chemoprevention through Phytochemicals: In Vitro and In Vivo Studies and the Underlying Mechanisms. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–18, 2014.

STURM, C.; WAGNER, A. E. Brassica-Derived Plant Bioactives as Modulators of Chemopreventive and Inflammatory Signaling Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1890, 2017.

SUN, W. et al. Growing Evidence of Exosomal MicroRNA-Related Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–6, 2020.

SUN, X. et al. Sulforaphane prevents microcystin-LR-induced oxidative damage and apoptosis in BALB/c mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, n. 1, p. 9–17, 2011.

SUVARNA, V. et al. Phytochemicals and PI3K Inhibitors in Cancer—An Insight. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017.

SU, X. et al. Anticancer Activity of Sulforaphane: The Epigenetic Mechanisms and the Nrf2 Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-10, 2018.

TELANG, U.; JI, Y.; MORRIS, M. E. ABC transporters and isothiocyanates: potential for pharmacokinetic diet-drug interactions. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 30, n. 7, p. 335–344, 2009.

THAKKAR, A. et al. The molecular mechanism of action of aspirin, curcumin and sulforaphane combinations in the chemoprevention of pancreatic cancer. **Oncology Reports**, v. 29, n. 4, p. 1671–1677, 2013.

TOLOMEO, M.; CASCIO, A. The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 603, 2021.

- TREJO-SOLÍS, C. et al. Multiple Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Lycopene in Cancer Inhibition. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–17, 2013.
- TROSKO, J.E. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. S326–S331, 2005.
- VOSTRIKOVA, S. M.; GRINEV, A. B.; GOGVADZE, V. G. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Carcinogenesis and Tumor Therapy. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 10, p. 1254–1266, 2020.
- WANG, P.; SANG, S. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. **BioFactors**, v. 44, n. 1, p. 16–25, 2018.
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 1–8, 1985.
- WEI, J.; FANG, D. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and the Pathogenesis of Hepatocarcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1799, 2021.
- WU, G. et al. Sulforaphane: Expected to Become a Novel Antitumor Compound. **Oncology Research**, v. 28, p. 439-446, 2020.
- WU, J. et al. Sulforaphane inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells via the reactive oxygen species-dependent pathway. **Oncology Reports**, v. 35, n. 5, p. 2977–2983, 2016.
- WU, Y. et al. PI3K/AKT/mTOR pathway-related long non-coding RNAs: roles and mechanisms in hepatocellular carcinoma. **Pharmacological Research**, v. 160, p. 105195, 2020.
- YANG, J. D. et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 10, p. 589–604, 2019.
- YARMOHAMMADI, F.; REZAEI, R.; KARIMI, G. Natural compounds against doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review on the involvement of Nrf2/ ARE signaling pathway. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1163–1175, 2020.
- YE, L. et al. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. **Clinica Chimica Acta**, v. 316, n. 1-2, p. 43–53, 2002.

YOSHIDA, K. et al. Broccoli sprout extract induces detoxification-related gene expression and attenuates acute liver injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 35, p. 10091–10103, 2015.

YOUN, H. et al. Sulforaphane Suppresses Oligomerization of TLR4 in a Thiol-Dependent Manner. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 1, p. 411–419, 2009.

YU, J. S. et al. Sulforaphane Suppresses Hepatitis C Virus Replication by Up-Regulating Heme Oxygenase-1 Expression through PI3K/Nrf2 Pathway. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152236, 2016.

YU, Y. et al. Colon metastasis from hepatocellular carcinoma: a case report and literature review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 18, n. 1, 2020.

ZHANG, K et al. The dichotomous role of TGF- β in controlling liver cancer cell survival and proliferation. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 47, n. 9, p. 497–512, 2020.

ZHANG, L. et al. Aflatoxin B1 enhances pyroptosis of hepatocytes and activation of Kupffer cells to promote liver inflammatory injury via dephosphorylation of cyclooxygenase-2: an in vitro, ex vivo and in vivo study. **Organ Toxicity and Mechanisms**, v. 93, n. 11, p. 3305–3320, 2019.

ZHANG, W.; FENG, C.; JIANG, H. Novel target for treating Alzheimer's Diseases: Crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy. **Ageing Research Reviews**, v. 65, p. 101207, 2021.

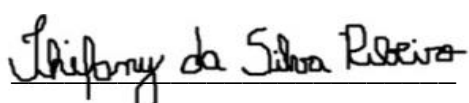
ZHAO, J. et al. LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 30, p. 4094–4109, 2018.

ZHENG, J. et al. Preventive effects of combinative natural foods produced by elite crop varieties rich in anticancer effects on N -nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 339–355, 2018.


ZHOU, Y. et al. Broccoli seed extract: Genotoxicity and subchronic toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 442–451, 2015. (ZHOU et al., 2015)

ZOU, X. et al. Endoplasmic reticulum stress mediates sulforaphane-induced apoptosis of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 1, p. 331–338, 2016.

São Paulo, 19 de outubro de 2021



Aluna: Thifany da Silva Ribeiro



Dr. Renato Heidor