



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Verônica Botelho Maciel Ikawa

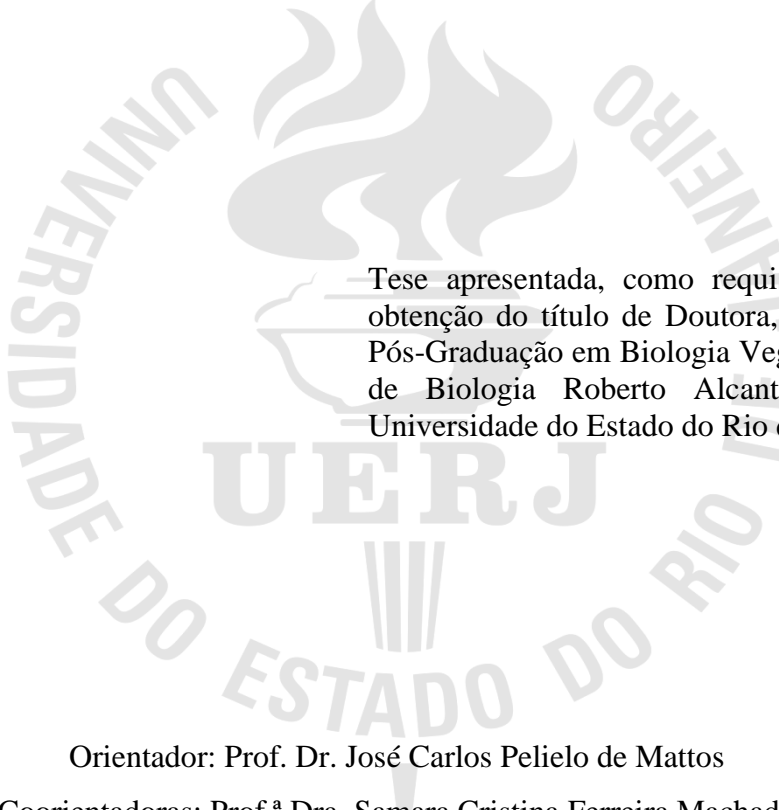
**Avaliação da toxicidade de polissulfetos de *Petiveria alliacea* L. em
associação à radiação ionizante, em DNA plasmidial e células tumorais**

Rio de Janeiro

2022

Verônica Botelho Maciel Ikawa

Avaliação da toxicidade de polissulfetos de *Petiveria alliacea* L. em associação à radiação ionizante, em DNA plasmidial e células tumorais



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Coorientadoras: Prof.^a Dra. Samara Cristina Ferreira Machado

Prof.^a Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

I26 Ikawa, Verônica Botelho Maciel.
Avaliação da toxicidade de polissulfetos de *Petiveria alliacea* L.
em associação à radiação ionizante, em DNA plasmidial e células
tumoriais / Verônica Botelho Maciel Ikawa. – 2022.
118 f. : il.


Orientador: José Carlos Pelielo de Mattos
Coorientadores: Samara Cristina Ferreira Machado, Rachel Fátima
Gagliardi Araujo
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do
Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. *Petiveria alliaceae* - Teses. 2. Toxicidade - Teses. 3. Agentes
antineoplásicos - Teses. 4. Plantas medicinais - Teses. I. Mattos, José
Carlos Pelielo de. II. Machado, Samara Cristina Ferreira III. Araujo,
Rachel Fátima Gagliardi. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. V. Título.

CDU 528.672

Patricia Bello Meijinhos CRB-7/ 5217- Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,
desde que citada a fonte


Assinatura

14 / 12 / 2022
Data

Verônica Botelho Maciel Ikawa

Avaliação da toxicidade de polissulfetos de *Petiveria alliacea* L. em associação à radiação ionizante, em DNA plasmidial e células tumorais

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de setembro de 2022.

Banca Examinadora:



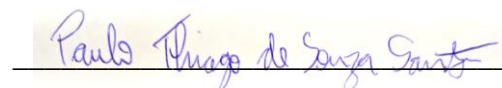
Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



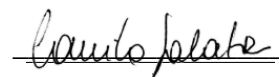
Prof.^a Dra. Claudia Simões Gurgel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ



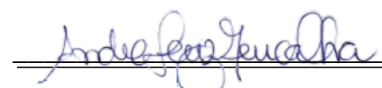
Prof. Dr. Paulo Thiago de Souza Santos

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ



Prof.^a Dra. Camila Salata

Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN



Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e depois a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, que me deu forças para lutar a cada adversidade, persistência para lidar com os obstáculos e saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais, Jorge (*in memoriam*) e Elizete obrigada pelo incentivo e por serem exemplo de vida e caráter. Sou extremamente grata a vocês. Amo vocês!

Ao meu irmão e cunhada, obrigada pela graça de ser madrinha do Franciso e sem dúvida essa foi a maior dádiva que eu poderia ter recebido. Francisco trouxe luz e alegria em nossa família. Obrigada pelo incentivo.

Ao meu esposo, Vitor Ikawa, mesmo com mais de 18460 km de distância demonstrou-se companheiro. Seu apoio, principalmente quando o desespero batia, e incentivo foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Amo te!

Ao Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo (*in memoriam*) por todos os ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. José Carlos Pelielo de Mattos, que desde a graduação estamos juntos nesta jornada. Agradeço pela paciência, confiança, amizade, por todos os ensinamentos e sempre respeitando e ouvindo as minhas vontades.

As minhas coorientadoras, Prof^a. Dra. Samara Cristina Ferreira Machado e Prof^a. Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo, pelas contribuições com suas experiências, correções e sugestões durante o trabalho.

À banca examinada e a revisora por terem aceitado o convite e por toda contribuição com o trabalho.

À equipe no LabAngio, em especial a prof^a Dr^a Verônica Morandi, pelas células concedidas e a utilização do espaço e alguns equipamentos. Marcella na ajuda com o ensaio de imuno-histoquímica. Chico e Laila pelas conversas e sugestões.

À equipe do Laboratório de Bioquímica Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais, que sempre estiveram de prontidão para realizar as leituras das placas no ELISA.

À equipe do Laboratório de Radio e Fotobiologia pelas sugestões, divisões de bancada, discussões e pelos momentos de descontração ao longo desta jornada. Que saudade do laboratório cheio de gente e das reuniões que eram motivo de comilança. Desde 2009 muitas pessoas passaram pelo LRF e todos foram importantes nessa jornada. Em especial a Marcia Betânia, Flávio José, Thaís, Mariana, Marjorie, PV e PT. Estendo meu agradecimento aos alunos que compartilham a sala de cultura, a troca de experiência do dia-a-dia na cultura celular é de grande valia.

Ao Maurício Moacir, que foi o meu “primogênito” no mundo acadêmico e hoje se tornou um grande amigo. É muito gratificante acompanhar sua trajetória e ver o seu crescimento acadêmico. Obrigada pelas conversas, certamente essa amizade fez tudo ficar mais agradável.

À Leslie Pereira, a física mais bióloga que conheço. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma. Este trabalho ficou mais completo graças aos seus toques especiais.

À Raphaela Tierno, quantas disciplinas que fizemos juntas, quantas conversas e desabafos ao longo desta trajetória. Obrigada pelo companheirismo que se iniciou no mestrado.

À equipe do DCR, pelas sugestões e discussões ao longo desta caminhada.

À Bianka Soares, pelas conversas e ajuda com a parte botânica do trabalho.

À Simone Simplicio pelos cuidados com a esterilização dos materiais do laboratório.

À Renata Sarkis, pela amizade e por ter me indicado o LRF, dando início a este trabalho. Tudo começou com seu incentivo. Eternamente grata a ti.

Ao PGBV/UERJ, pela oportunidade de realizar este trabalho e melhorar minha qualificação profissional.

A Vera Varejão, secretária da PGBV, pela colaboração nos momentos em que precisei.

Ao meu gato Fred, por ser tão companheiro, o meu colo foi o seu melhor abrigo enquanto escrevia este trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

Agradeço a todos aqueles que diretamente ou indiretamente me ajudaram a concretizar este trabalho, que por falha de memória eu possa ter esquecido de mencionar aqui. Obrigada!!

Aqueles que passam por nós,
não vão sós,
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós

Antoine de Saint-Exupery

RESUMO

MACIEL-IKAWA, Verônica Botelho. Avaliação da toxicidade de polissulfetos de *Petiveria alliacea* L. em associação à radiação ionizante, em DNA plasmidial e células tumorais. 2022. 118f. Tese. (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A planta *Petiveria alliacea* L. é tradicionalmente utilizada na medicina popular para tratar diversas doenças e sintomatologias, entre elas depressão, reumatismo, dor e câncer. Dentre os polissulfetos presentes na espécie vegetal o trissulfeto de dibenzil (DTS) é um dos compostos com inúmeros relatos na literatura com atividade antitumoral. O câncer é uma doença multifatorial que compreende vários tipos diferentes, sendo o câncer de mama um dos mais frequentes no mundo, excluindo os cânceres de pele não melanoma, com características próprias, manifestações e evoluções diversas, incluindo a sensibilidade celular que pode variar em relação ao tratamento. Atualmente, a maior parte dos cânceres é tratada por abordagens multimodais, seja quimioterapia, radioterapia e cirurgia, entre outras, para que, juntas, atuem de forma mais efetiva no tratamento oncológico. A busca por novas substâncias ou estratégias de tratamento com capacidades antitumorais é atual e de interesse para o bem-estar dos pacientes. Então, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos biológicos dos polissulfetos: monossulfeto de dibenzila (DMS), dissulfeto de dibenzila (DDS), trissulfeto de dibenzila (DTS) e dos três polissulfetos juntos (*mix*) oriundos da espécie *P. alliacea*, associados ou não à radiação ionizante (RI), em DNA plasmidial e na linhagem tumoral MCF-7, proveniente de adenocarcinoma mamário humano. O potencial genotóxico dos polissulfetos DMS, DDS, DTS e do *mix*, associado ou não à RI, foi avaliado utilizando-se técnica de eletroforese para análise da conformação de DNA plasmidial em gel de agarose. Em relação aos ensaios com a linhagem MCF-7, avaliou-se o potencial citotóxico dos polissulfetos através de testes de viabilidade celular (Cristal Violeta e WST-1). O efeito do DTS associado ou não à RI também foi avaliado através dos ensaios de recuperação clonogênica, ensaio de migração e imunomarcagem para γ H2AX. Os resultados obtidos sugerem que os polissulfetos e o *mix* conferem proteção ao DNA plasmidial. Todavia, os resultados com a linhagem tumoral MCF-7 que apenas o polissulfeto DTS, isoladamente, causou citotoxicidade, com redução da viabilidade celular. Em relação aos ensaios associados à RI, os polissulfetos DMS e DDS não atuaram como radiomodificadores, protegendo ou sensibilizando os efeitos radioinduzidos. Entretanto, o DTS associado à RI, no ensaio de recuperação clonogênica, foi capaz de inibir a formação de colônias, potencializando o efeito observado apenas com a RI. No ensaio de migração o DTS não estimulou e nem inibiu a migração celular e a detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência mostrou um aumento de quebras duplas no DNA. Esses resultados apontam, que ao contrário do DMS e DDS, o DTS foi capaz de atuar como um possível radiosensibilizador, aumentando o efeito letal quando administrado em combinação com RI.

Palavras-chave: Radioterapia. Raio-X. Monossulfeto de dibenzila (DMS). Dissulfeto de dibenzila (DDS). Trissulfeto de dibenzil (DTS). MCF-7. Câncer de mama.

ABSTRACT

MACIEL-IKAWA, Verônica Botelho. Evaluation of the toxicity of polysulfides from *Petiveria alliacea* L. in association with ionizing radiation, on plasmid DNA and tumor cells. 2022. 118f. Tese. (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The plant *Petiveria alliacea* L. is traditionally used in folk medicine to treat various diseases and symptoms, including depression, rheumatism, pain, and cancer. Among the polysulfides present in the plant species the dibenzyl trisulfide (DTS) is one of the compounds with numerous reports in the literature with antitumor activity. Cancer is a multifactorial disease that comprises several different types, breast cancer being one of the most frequent in the world, excluding non-melanoma skin cancers, with its own characteristics, manifestations and evolution, including cellular sensitivity that may vary in relation to treatment. Currently, most cancers are treated by multimodal approaches, whether chemotherapy, radiotherapy, and surgery, among others, so that together they act more effectively in oncological treatment. The search for new substances or treatment strategies with antitumor capabilities is current and of interest for the well-being of patients. Therefore, the aim of this study was to evaluate the biological effects of polysulfides: dibenzyl monosulfide (DMS), dibenzyl disulfide (DDS), dibenzyl trisulfide (DTS) and the three polysulfides together (mix) from the species *P. alliacea*, associated or not with ionizing radiation (IR), in plasmid DNA and in the human breast adenocarcinoma tumor line MCF-7. The genotoxic potential of polysulfides DMS, DDS, DTS and the mix, associated or not with IR, was evaluated using electrophoresis technique for analysis of plasmid DNA conformation in agarose gel. Regarding the assays with the MCF-7 lineage, the cytotoxic potential of polysulfides was evaluated through cell viability tests (Crystal Violet and WST-1). The effect of DTS associated or not with IR was also evaluated through clonogenic recovery assays, migration assay and immunolabeling for γ H2AX. The results obtained suggest that polysulfides and the mix confer protection to plasmid DNA. However, the results with the MCF-7 tumor line that only the DTS polysulfide alone caused cytotoxicity, with reduced cell viability. Regarding the assays associated with IR, the polysulfides DMS and DDS did not act as radiomodifiers, protecting or sensitizing the radioinduced effects. However, the DTS associated with IR, in the clonogenic recovery assay, was able to inhibit colony formation, potentiating the effect observed with IR alone. In the migration assay DTS neither stimulated nor inhibited cell migration and the detection of phosphorylated histones (γ H2AX) by immunofluorescence showed an increase of double breaks in DNA. These results point out, that unlike DMS and DDS, DTS was able to act as a possible radiosensitizer, increasing the lethal effect when administered in combination with IR.

Keywords: Radiation therapy. X-Ray. Dibenzyl monosulfide (DMS). Dibenzyl disulfide (DDS). Dibenzyl trisulfide (DTS). MCF-7. Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica da <i>P. alliacea</i>	17
Figura 2 -	<i>P. alliacea</i> L. cultivada em canteiro.....	18
Figura 3 -	Estruturas químicas de organosulfurados os polissulfetos, obtidos de <i>P. alliacea</i>	20
Figura 4 -	Esquema representativo da síntese dos polissulfetos.....	21
Figura 5 -	Capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de múltiplos passos dos tumores.....	26
Figura 6 -	Esquema representativo da ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de DNA.....	28
Figura 7 -	Representação das etapas desenvolvidas.....	36
Figura 8 -	Irradiador biológico com destaque para ampola de raios-X.....	39
Figura 9 -	Etapas de extração do DNA plasmidial utilizando o kit de extração plasmidial.....	40
Figura 10 -	Esquema da migração das três formas do plasmídeo no gel de agarose submetido a eletroforese.....	42
Figura 11 -	Esquema representativo de todas as etapas da avaliação do potencial genotóxico dos extratos em DNA plasmidial.....	43
Figura 12 -	Esquema representativo da ação da enzima Endonuclease VIII.....	44
Figura 13 -	Esquema representativo do desenho experimental dos ensaios para viabilidade celular.....	47
Figura 14 -	Esquema representativo do desenho experimental do ensaio de viabilidade celular pelo Cristal Violeta.....	48
Figura 15 -	Esquema representativo do desenho experimental do ensaio de viabilidade celular pelo WST-1.....	49
Figura 16 -	Esquema representativo do desenho experimental do ensaio clonogênico.....	50
Figura 17 -	Esquema representativo do desenho experimental do teste de lesão em monocamada.....	52
Figura 18 -	Esquema representativo do desenho experimental da imunohistoquímica para detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX).....	53
Figura 19 -	Espectro de absorção (200 a 800 nm) dos polissulfetos, <i>mix</i> e benzoato	56

	de sódio, antes e após exposição à radiação ionizante de 60 Gy.....	
Figura 20 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com benzoato de sódio (BS) e exposto à 60 Gy de RI.....	58
Figura 21 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Monossulfeto de dibenzila (DMS).....	59
Figura 22 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Monossulfeto de dibenzila (DMS) em associação à RI.....	60
Figura 23 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Dissulfeto de dibenzila (DDS).....	61
Figura 24 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Dissulfeto de dibenzila (DDS) associado à radiação ionizante 60 Gy.....	62
Figura 25 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Trissulfeto de dibenzila (DTS).....	63
Figura 26 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Trissulfeto de dibenzila (DTS) associado à radiação ionizante 60 Gy.....	64
Figura 27 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com a solução de <i>mix</i> de polissulfetos.....	65
Figura 28 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com a solução de <i>mix</i> de polissulfetos associado à radiação ionizante 60 Gy.....	66
Figura 29 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com enzima Endonuclease VIII e exposto à radiação ionizante.....	67
Figura 30 -	Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com enzima Endonuclease VIII associado com o <i>mix</i> e à radiação ionizante 60 Gy.....	69
Figura 31 -	Viabilidade por Cristal Violeta e WST-1 de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DMS	70
Figura 32 -	Viabilidade por Cristal Violeta e WST-1 de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DDS.....	71
Figura 33 -	Viabilidade por Cristal Violeta (CV) e WST-1 de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS.....	72

Figura 34 - Viabilidade pelo Cristal Violeta em células mamárias tumorais MCF-7 incubadas com DTS.....	73
Figura 35 - Viabilidade pelo WST-1 em células mamárias tumorais MCF-7 incubadas com DTS.....	73
Figura 36 - Curva dose-resposta para RI com células mamárias tumorais MCF-7.....	74
Figura 37 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DMS (0,5 μ M) em associação com RI.....	75
Figura 38 - Viabilidade por Cristal Violeta e células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DMS (15 μ M) em associação com RI.....	75
Figura 39 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DDS (0,5 μ M) em associação com RI.....	76
Figura 40 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DDS (15 μ M) em associação com RI.....	76
Figura 41 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS (0,5 μ M) em associação com RI.....	77
Figura 42 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS (15 μ M) em associação com RI.....	78
Figura 43 - Ensaio de recuperação clonogênica com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS e expostas à radiação ionizante.....	79
Figura 44 - Ensaio de recuperação clonogênica com células mamárias tumorais MCF-7 em associação a RI com diferentes concentrações de DTS.....	79
Figura 45 - Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i> com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI (2 e 6 Gy) por 0, 24 ou 48 horas.....	81
Figura 46 - Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i> com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI (0, 2 e 6 Gy), utilizadas em associação ao DTS (0,5 μ M) por 0, 24 ou 48 horas.....	81
Figura 47 - Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i> com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI (0, 2 e 6 Gy) utilizada em associação ao DTS (5 μ M) por 0, 24 ou 48 horas.....	82
Figura 48 - Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i> com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI utilizada em	83

	associação ao DTS (15 μ M).....	
Figura 49 -	Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i> com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas por 0 Gy com diferentes concentrações do DTS 0,5; 5 e 15 μ M.....	84
Figura 50 -	Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i> com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas a 2 Gy em associação com diferentes concentrações do DTS por 0, 24 ou 48 horas.....	85
Figura 51 -	Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i> com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com 6 Gy em associação com diferentes concentrações do DTS por 0, 24 ou 48 horas.....	86
Figura 52 -	Detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7 incubadas com diferentes concentrações de DTS, sem RI (0 Gy).....	89
Figura 53 -	Detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7 incubadas com diferentes concentrações de DTS e irradiadas (2 Gy).....	90
Figura 54 -	Focos de histona fosforilada ($x = 0$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7.....	91
Figura 55 -	Focos de histona fosforilada ($1 \leq x \leq 5$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7.....	92
Figura 56 -	Focos de histona fosforilada ($6 \leq x \leq 10$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7.....	93
Figura 57 -	Focos de histona fosforilada ($x \geq 11$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BS	Benzoato de sódio
CV	Cristal Violeta
DDS	Dissulfeto de dibenzila
DMS	Monossulfeto de dibenzila
DTS	Trissulfeto de dibenzila
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ENDO VIII	Enzima Endonuclease VIII
LabAngio	Laboratório de Biologia de Célula Endotelial e da Angiogênese
DCR	Departamento de Ciências Radiológicas
LRF	Laboratório de Radio e Fotobiologia
PMMA	Polimetilmetacrilato
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
RI	Radiação Ionizante
WST-1	<i>Water-Soluble Tetrazolium 1</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1	Plantas medicinais.....	16
1.2	<i>Petiveria alliacea</i> L.: distribuição geográfica e descrição.....	17
1.3	Uso popular da <i>P. alliacea</i>.....	18
1.4	Metabólitos secundários.....	19
1.4.1	<u>Polissulfetos</u>.....	20
1.5	Efeitos biológicos de extratos vegetais e dos polissulfetos observados em ensaios experimentais.....	22
1.6	Câncer.....	25
1.6.1	<u>Câncer de mama</u>.....	26
1.6.2	<u>Radioterapia</u>.....	27
1.6.2.1	Radiomodificadores.....	31
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Polissulfetos utilizados.....	37
4.2	Irradiação dos polissulfetos.....	37
4.3	Análise espectrofotométrica.....	39
4.4	Ensaio biológicos com plasmídeos.....	39
4.4.1	Obtenção dos plasmídeos a partir de culturas bacterianas.....	39
4.4.2	<u>Polissulfetos para os ensaios com DNA plasmidial</u>.....	40
4.4.3	<u>Avaliação do potencial genotóxico dos polissulfetos em DNA plasmidial</u>.....	41
4.4.4	<u>Enzima de reparo Endonuclease VIII</u>.....	43
4.5	Ensaio biológicos com linhagem celular.....	44
4.5.1	<u>Cultivo celular</u>.....	45
4.5.2	<u>Ensaio de viabilidade celular</u>.....	46
4.5.2.1	Ensaio de viabilidade celular por Cristal Violeta.....	47
4.5.2.2	Ensaio de viabilidade celular por WST-1.....	48
4.5.3	<u>Ensaio de recuperação clonogênica</u>.....	49

4.5.4	<u>Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i>.....</u>	51
4.5.5	<u>Deteccão de histonas fosforiladas (γH2AX) por imunofluorescência.....</u>	52
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
6	RESULTADOS.....	55
6.1	Análise espectrofotométrica.....	55
6.2	Ensaio com DNA plasmidial.....	57
6.2.1	<u>Eletroforese em gel de agarose.....</u>	57
6.3	Ensaio com cultura celular utilizando a linhagem tumoral MCF-7.....	70
6.3.1	<u>Ensaio de viabilidade celular.....</u>	70
6.3.2	<u>Ensaio de recuperação clonogênica.....</u>	78
6.3.3	<u>Teste de lesão em monocamada - <i>Scratch assay</i>.....</u>	80
6.3.4	<u>Deteccão de histonas fosforiladas (γH2AX) por imunofluorescência.....</u>	87
7	DISCUSSÃO.....	95
	CONCLUSÕES.....	102
	PERSPECTIVA.....	103
	REFERÊNCIAS.....	104

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais existe desde a antiguidade para tratar diferentes doenças e seus sintomas (TEIXEIRA et al., 2014). Porém, as indicações do uso popular das espécies vegetais nem sempre correspondem às comprovações científicas. Por esse motivo, torna-se de grande importância a necessidade de estudar e avaliar tanto os benefícios como os efeitos indesejáveis promovidos pelos, coletivamente denominados, produtos naturais.

A espécie *Petiveria alliacea* L. é uma planta nativa da floresta amazônica (CAMARGO, 2007a). Pertence à família Phytolaccaceae e se destaca pelo odor de alho liberado após a ruptura dos tecidos (DI STASI et al., 2002) é utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer (DUARTE & LOPES, 2005; LUZ et al., 2016; SILVA et al., 2018).

O câncer de mama é atualmente o câncer mais comumente diagnosticado no mundo, excluindo os cânceres de pele não melanoma. Sendo a principal causa de mortalidade entre as mulheres (SUNG et al., 2021). Durante o manejo do paciente podem ser necessária várias modalidades de tratamento oncológico de acordo com o estadiamento da doença, como: cirurgia, quimioterapia e radioterapia (DE SOUZA et al., 2018). Há relatos de pacientes que utilizam plantas medicinais concomitantemente com os medicamentos ou tratamentos prescritos pelo médico (DIAZ et al., 2012; FOSTER et al., 2017; ALMASDY et al., 2018; SEGUN, et al., 2018).

Os polissulfetos são moléculas presentes em *P. alliacea* e derivadas do metabolismo secundário dessa planta. Diversos estudos apontam um desses polissulfetos, o trissulfeto de dibenzila (DTS) como agente promissor no combate ao câncer (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2008; CIFUENTES et al., 2009; DIAZ et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2014; SALES et al., 2016; FOSTER et al., 2017). O dissulfeto de dibenzila (DDS) também foi previamente reportado por apresentar atividade citotóxica (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2008; CIFUENTES et al., 2009), enquanto o Monossulfeto de dibenzila (DMS) foi citotóxico em concentrações mais elevadas do que o DDS e o DTS (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2008).

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Plantas medicinais

A *World Health Organization* (WHO) define como planta medicinal qualquer espécie vegetal, cultivada ou não, capaz de aliviar ou curar enfermidades e com tradição de uso como remédio por população ou comunidade (WHO, 1998). O uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica está intimamente relacionado à própria evolução do homem. Mitos, lendas e tradições apontam para o emprego de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e em quase toda a humanidade (TEIXEIRA et al., 2014). Em 1979 a WHO, publicou que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, majoritariamente usando preparações obtidas a partir de plantas. A partir deste momento, a WHO tem exposto sua posição a respeito da importância da utilização de plantas medicinais nos segmentos sanitário e da atenção básica a saúde. Em 2006, no Brasil, o governo reconheceu a importância das plantas medicinais com a aprovação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (BRASIL, 2006).

O uso de plantas medicinais cultivadas em quintais ou coletadas é uma prática baseada no conhecimento popular, e na maioria das vezes, repassada de geração para geração. O conhecimento sobre ervas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002). A etnobotânica é responsável pelo estudo da relação entre plantas e pessoas (TONDO et al., 2015), incluindo usos terapêuticos e místicos na medicina popular (LUZ et al., 2016) que possibilita a descoberta de novas substâncias de interesse médico e farmacêutico. Estas pesquisas consistem na seleção de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos, em determinados contextos de uso, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito dos recursos naturais, e a aplicação delas nos sistemas de saúde (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

1.2 *Petiveria alliacea* L.: distribuição geográfica e descrição

Petiveria alliacea é uma planta nativa da floresta amazônica e das áreas tropicais, com destaque para a América do Sul, Central, África e Índia (CAMARGO, 2007a) (Figura 1). Pertence à família Phytolaccaceae seu epíteto específico da espécie, *alliacea*, está relacionado ao cheiro pungente de alho liberado após a ruptura dos tecidos (DI STASI et al., 2002).

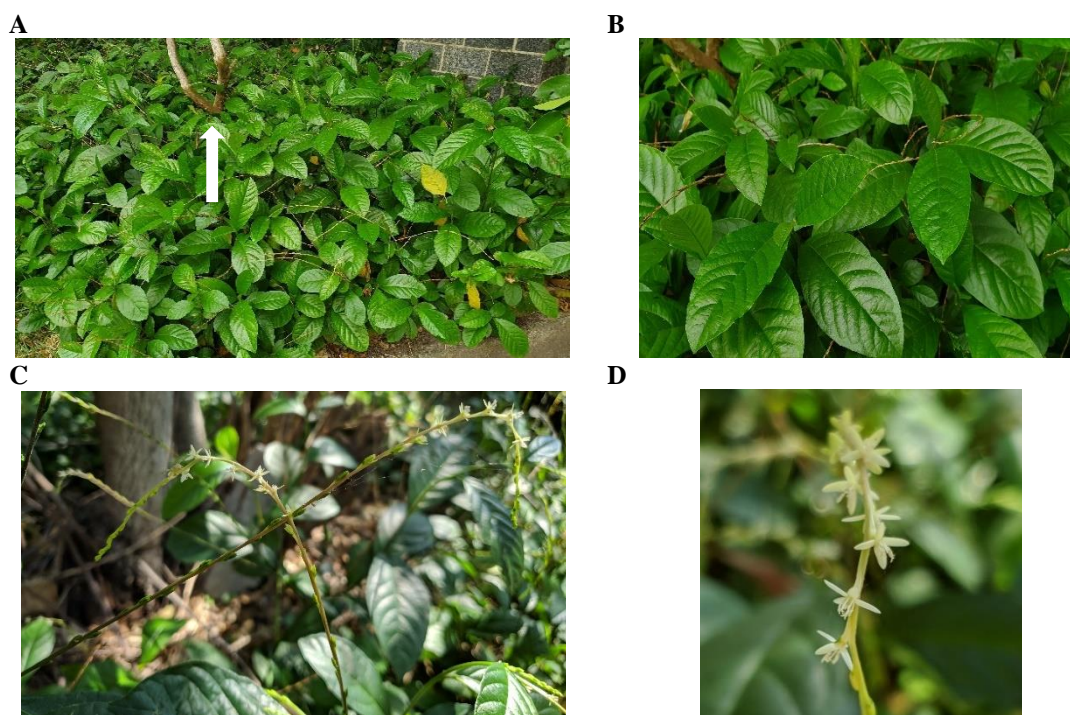
Figura 1 - Distribuição geográfica da *P. alliacea*



Legenda: Regiões assinaladas em preto no mapa representam a distribuição de *P. alliacea* pelo mundo.
Fonte: LUZ et al., 2016.

A espécie é descrita como um subarbusto perene, sublenhoso, ereto, ramificado com ramos compridos, delicados e ascendentes; folhas curto-pecioladas, alternas, estipuladas, membranosas, agudas no ápice e estreitas na base; flores sésseis pequenas, reunidas em inflorescências axilares e terminais espiciformes; androceu com 4 estames, gineceu unicarpelar com ovário súpero; fruto aquênio cilíndrico, achatado e crenado (Figura 2) (DUARTE & LOPES, 2005; LUZ et al., 2016; SILVA et al., 2018). A espécie apresenta diferentes nomes populares de acordo com a região, como amansa-senhor, anamu, tipi, cipó-de-alho, guiné, rabo de gambá, entre outros (CAMARGO, 2007b).

Figura 2 - *P. alliacea* L. cultivada em canteiro



Legenda: Canteiro localizado no Recreio dos Bandeirantes, Rio de Janeiro, RJ. Latitude 23°00'40.8"S e longitude 43°26'40.2"W. (A) A seta branca indica o caule de uma outra espécie, evidenciando o hábito de meia sombra da *P. alliacea*. (B) Folhas (C) Inflorescência (D) Flores

Fonte: A autora.

1.3 Uso popular da *P. alliacea*

No uso popular a *P. alliacea* tem sido usada com diferentes propósitos. São utilizados todos os órgãos da planta: folhas, caules e raízes, em infusões ou decocções, como antirreumático, anti-inflamatório, analgésico, abortivo e para tratar doenças respiratórias (DUARTE & LOPES, 2005; LUZ et al., 2016; SILVA et al., 2018). Seu uso é bastante difundido em rituais afro-brasileiros, com o objetivo de afastar mau-olhado, maus espíritos, quebranto e trazer proteção (CAMARGO, 2007a).

Petiveria alliacea tem seus efeitos conhecidos no Brasil desde o período colonial. No século XVII, escravos africanos costumavam usar preparações obtidas do vegetal para deixar seus mestres letárgicos e, por causa disso, a denominação “amansa senhor” (ALONSO, 2007; SILVA et al., 2018). Na medicina indígena, o pó da raiz e folhas tem sido associado com várias propriedades terapêuticas (DUARTE & LOPES, 2005; LUZ et al., 2016). O uso de plantas medicinais no Brasil emerge como uma alternativa terapêutica influenciada pela cultura indígena, pelas tradições africanas e pela cultura europeia trazida pelos colonizadores (SOUZA-MOREIRA, SALGADO & PIETRO, 2010).

Nos últimos anos, várias plantas medicinais foram administradas a fim de prevenir e tratar o câncer. Essas plantas tem sido utilizadas devido a seus ricos potenciais anticarcinogênicos e quimioprotetores. Além destas propriedades notáveis, algumas plantas têm agentes anticâncer, antitumoral e antiproliferação sendo menos tóxicos do que a terapêutica tradicional (GEZICI & ŞEKEROĞLU, 2019). Num contexto semelhante, um estudo foi realizado com objetivo de identificar e documentar espécies vegetais utilizadas para tratar vários tipos de câncer pelo grupo étnico Ijebu, localizado no sudoeste da Nigéria, que tem uma rica tradição de uso de plantas medicinais. O levantamento foi realizado entre maio e setembro de 2015, por meio de questionário. Dos entrevistados, em sua maioria do sexo masculino (72%), conheciam o manejo tradicional para o tratamento de câncer e *P. alliacea* foi citada por 18% dos entrevistados, sendo relatado que as raízes são o órgão vegetal de maior interesse (SEGUN, et al., 2018).

1.4 Metabólitos secundários

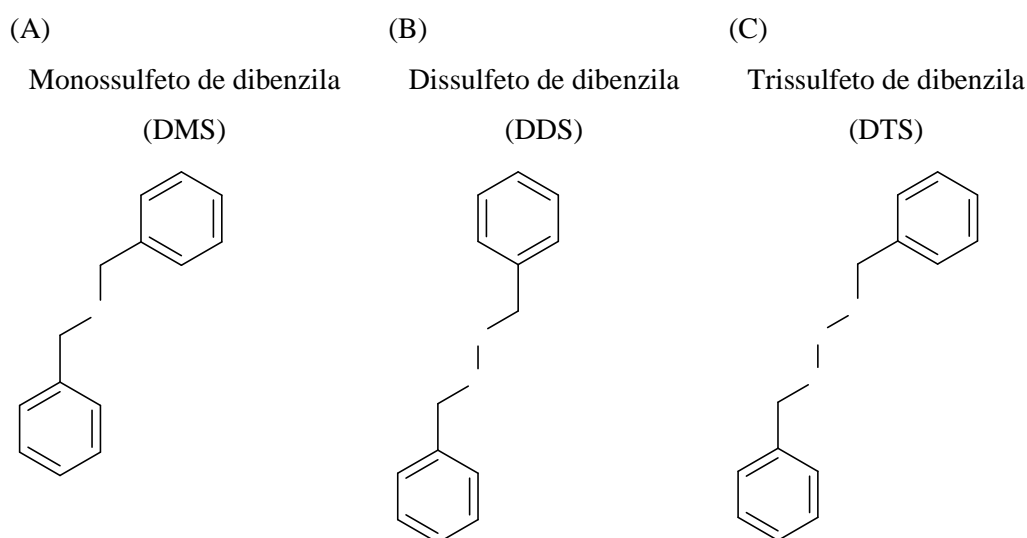
As plantas produzem uma grande quantidade e variedade de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são indispensáveis ao desenvolvimento do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes. Os metabólitos secundários aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta, mas, desempenham uma interação planta/ambiente garantindo a sobrevivência das espécies no ecossistema (MARASCHIN & VERPOORTE, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2013). Existem diversos fatores que influenciam a variedade e a concentração de metabólitos secundários, tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBONETO & LOPES, 2007).

Os produtos do metabolismo secundário representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas (TAIZ & ZEIGER, 2013). Alguns compostos isolados e identificados a partir de diferentes órgãos de *P. alliacea* incluem flavonoides como petiveral, leridal e mircetina; triterpenos como isoarborinol e carvacrol; esteroides como o daucosterol; lipídios como ácido lignocérico; ácido oleico composto como alantoína e cumarina; aminoácidos e derivados como petiverina A e petiverina B (LUZ

et al., 2016; SILVA et al., 2018). Os ácidos fenólicos como ácido hidroxibenzóico, ácido salicílico e ácido benzóico também foram identificados em partes aéreas do vegetal (NAVARRO et al., 2017).

Além disso, organosulfurados de *P. alliacea* farmacologicamente ativos, que incluem polissulfetos como monossulfeto de dibenzila (Figura 3 A), dissulfeto de dibenzila (Figura 3 B). O bis (4-fluorobenzil) trissulfeto (fluorapacina) e o trissulfeto de dibenzila (Figura 3 C), são citados na literatura por suas atividades anticâncer (SILVA et al., 2018).

Figura 3 - Estruturas químicas de organosulfurados os polissulfetos, obtidos de *P. alliacea*



Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2018.

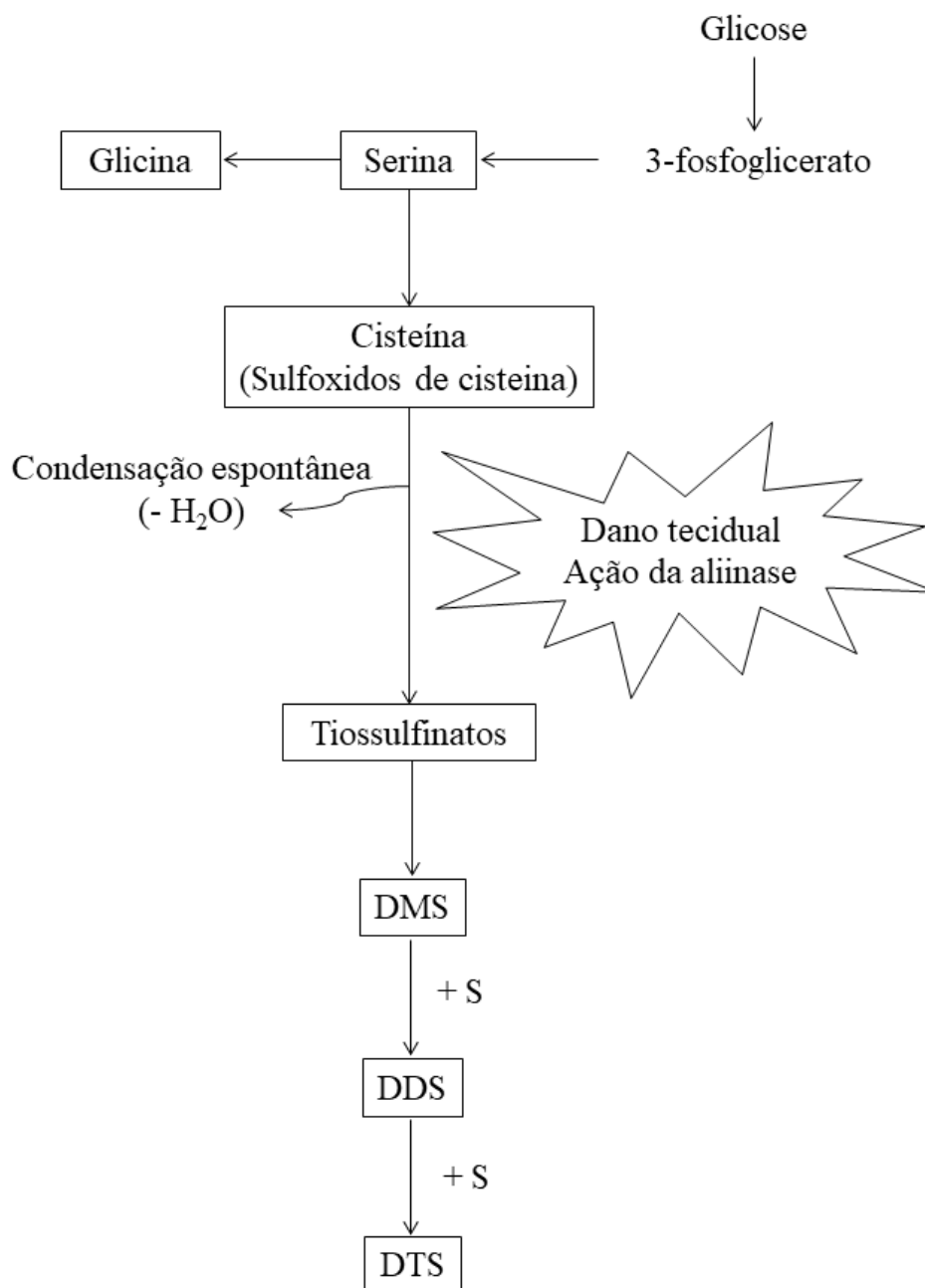
1.4.1 Polissulfetos

Os polissulfetos são uma classe de compostos organosulfurados que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, tais como antimicrobianas, acaricidas, inseticidas, imunomoduladores, atividades antiproliferativas e citotóxicas. Eles representam os principais constituintes isolados de *P. alliacea* (SILVA et al., 2018). Diversas substâncias contendo enxofre, produtos do metabolismo da cisteína, têm sido detectadas principalmente nas raízes de *P. alliacea*, em concentrações elevadas (SILVA et al., 2018).

A síntese dos metabólitos que apresentam enxofre ocorre a partir do metabolismo da cisteína (SILVA et al., 2018). Os polissulfetos apresentam um ciclo de

ativação através da reação a um estímulo, como por exemplo a ruptura do tecido vegetal. Quando ocorre o dano tecidual, a enzima (aliinase) converte os precursores (sulfoxidos de cisteína) em tiossulfinaos. Os tiossulfinaos passam por transformações adicionais para produzir os polissulfetos (HE, CHAMBERS & MUSAH, 2018).

Figura 4 - Esquema representativo da síntese dos polissulfetos



Fonte: A autora.

1.5 Efeitos biológicos de extratos vegetais e dos polissulfetos observados em ensaios experimentais

Os efeitos decorrentes do uso das plantas medicinais sobre diversos organismos variam em função do tempo de consumo ou exposição, concentração, local da coleta do vegetal, tipo de extração e os tipos de organismos ou células utilizadas como modelo biológico. Já foram descritos diferentes efeitos de *P. alliacea*, como por exemplo, antirreumático, analgésico, para o tratamento de doenças respiratórias (ALONSO-CASTRO et al., 2011; VOLPATO et al., 2009) e anticâncer (DIAZ et al., 2012; FOSTER et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2014; SALES et al., 2016). Investigações farmacológicas têm destacado o potencial terapêutico da espécie como analgésico, antidepressivo e ativador da memória (ANDRADE et al., 2012), antimicrobiano (KERDUDO et al., 2015; OKE & OLURANTI, 2019) entre outros. Entretanto, a *P. alliacea* também apresenta efeitos tóxicos (PÉREZ-LEAL et al., 2006; SOARES et al., 2014).

Arceo-Medina e colaboradores (2020), observaram que o DTS e o DDS foram capazes de inibir o ciclo biológico da ovogênese no carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*, o que é promissor para o controle deste ectoparasita.

Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2008) estudaram o efeito do óleo essencial de cebolinha (*Allium schoenoprasum*), que contém polissulfetos com estrutura química semelhante aos presentes em *P. alliacea*. O óleo contendo os polissulfetos foi testado em bactérias causadoras de intoxicação alimentar e apresentou um efeito inibitório sobre todas as cepas bacterianas utilizadas, sugerindo uma ação antimicrobiana tanto contra microrganismos gram negativos quanto gram positivos.

Soares e colaboradores (2014) compararam o potencial genotóxico do extrato aquoso de folhas de *P. alliacea* coletadas a campo em diferentes regiões e de plantas propagadas *in vitro*. Os resultados indicam que o extrato foi genotóxico nas maiores concentrações testadas. Os autores também concluíram que a intensidade do efeito dos extratos sobre o DNA plasmidial variou de acordo com a origem das plantas.

Utilizando extrato etanólico bruto de folha de *P. alliacea* em modelo biológico de bactérias, foi possível observar diminuição da sobrevivência bacteriana. Essas mortes podem estar relacionadas a uma ação genotóxica. Além disso, é possível que ocorra uma biotransformação de um ou mais compostos presentes no extrato, uma vez que o efeito genotóxico não foi evidente (MACIEL, 2017).

A infusão de *P. alliacea* preparada a 1% foi administrada oralmente à vontade em três grupos de camundongos C57BL/6, (controle de melanoma, tratamento preventivo e tratamento curativo) nos grupos preventivo 15 dias antes e ao tratamento curativo no momento da inoculação. Foi observado aumento da sobrevida, diminuição da perda de peso e do crescimento do tumor. No tratamento curativo e, no preventivo, o extrato aquoso de talos de *P. alliacea* apresentou propriedades antitumorais e imunoestimuladoras (CORREA e al., 2016).

Empregando teste antimicrobiano em diferentes cepas bacterianas o extrato metanólico de raízes teve mais efeito sobre as bactérias do que os extratos metanólicos de folhas. Enquanto o extrato clorofórmico de folhas foi mais eficaz na inativação bacteriana do que os extratos de raiz. Nos testes para avaliar atividade antifúngica, extratos preparados a partir de folhas se mostraram mais eficazes do que os extratos de raízes (OKE & OLURANTI, 2019).

Petiveria alliacea é utilizada em rituais afro-brasileiros sob a forma de fumo. Em pesquisas etnobotânicas o vegetal é relatado como tendo “propriedades harmônicas” (efeito ansiolítico). A partir destas informações pesquisadores investigaram os potenciais efeitos ansiolíticos e tóxicos em ratos Wistar machos expostos à fumaça, oriunda da queima das folhas do vegetal. Os resultados indicaram que a exposição à fumaça não tem efeito sobre a atividade locomotora ou comportamento semelhante à ansiedade avaliada pelo campo aberto e labirinto em cruz elevado. A morfometria pulmonar sugeriu uma possível toxicidade em todos os grupos de animais expostos à fumaça, indicando que o hábito do fumo ritualístico pode causar efeitos prejudiciais (ALVES et al, 2019).

A atividade antitumoral de *P. alliacea* tem sido baseada no pressuposto de que extratos complexos de plantas atuam diretamente sobre a regulação do crescimento de célula tumoral. Também podem interferir no metabolismo energético, a fim de reduzir o crescimento tumoral e até mesmo induzir a morte celular, que consequentemente, ativaria a resposta imune adaptativa. Essa multiplicidade de funções fitoterápicas poderia explicar os benefícios observados ao longo dos anos e abrir novas questões sobre a complexidade das doenças crônicas, como o câncer (FIORENTINO & URUEÑA, 2018).

Folhas secas e trituradas foram submetidas à extração de Soxhlet com metanol por 24 horas. O extrato metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos. Para avaliação dos efeitos biológicos foi realizado o teste do MTT com células de macrófago, U937. As frações hexano e diclorometano

apresentaram boa atividade antitumoral além de baixa toxicidade. Essa atividade antitumoral se dá pela presença dos esteroides. Os resultados indicam o potencial de *P. alliacea* como fonte de agentes antitumorais (SALES et al., 2016).

Células de tumor de mama incubadas com extrato etanólico de folhas e caules de *P. alliacea* apresentaram redução na expressão de β -F1-ATPase, resultando na diminuição do fluxo glicolítico e da atividade mitocondrial, queda na concentração de ATP intracelular e baixo consumo de oxigênio (HERNÁNDEZ et al., 2017). Ainda de acordo com Hernandez e colaboradores (2017), em camundongos BALB/c transplantados com adenocarcinoma mamário, houve uma diminuição do tumor primário e uma maior sobrevivência dos animais tratados com *P. alliacea*.

O dissulfeto de dibenzila (DDS) também foi previamente reportado por apresentar atividade citotóxica em células leucêmicas NB-4 e K562 (CIFUENTES et al., 2009). Frações obtidas de um extrato de *P. alliacea* foram capazes de induzir apoptose, ativação da caspase-3, fragmentação do DNA e diminuir a capacidade proliferativa em células de adenocarcinoma de mama metastático (4T1) (HERNÁNDEZ et al., 2014).

Estudos mostraram que o DTS foi capaz de inibir a proliferação celular na linhagem HN30, de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço humano. Além disso, o DTS também induziu apoptose, possivelmente através de mecanismos que envolvem a inibição do Akt e a ativação da p53 (XU; QIAN & SUN, 2021).

Rösner e colaboradores (2001) estudaram seus efeitos em cultura de células e tecidos neuronais. Os autores mostraram que o DTS é capaz de inibir a proliferação de células de neuroblastoma e o crescimento de neuritos de explantes de medula espinhal, indicando que esse polissulfeto de *P. alliacea* possui ação citostática e neurotóxica, além de atividade imunomoduladora (RÖSNER et al., 2001).

Wooten e colaboradores (2022) avaliaram o mecanismo de ação antitumoral do DTS em células de câncer de mama triplo negativo. Os resultados apontam que o DTS inibiu a viabilidade, migração e proliferação de câncer de mama triplo negativo de forma dose-dependente. Os dados obtidos pelos pesquisadores indicam que o DTS confere eficácia antitumoral promissora no tratamento do câncer de mama triplo negativo, em parte por meio de morte celular independente de caspase.

1.6 Câncer

A palavra câncer tem origem do termo grego *Karkinos*, que significa caranguejo, devido seu modo de desenvolvimento de forma infiltrante, uma vez que os caranguejos se aderem a lama ou até mesmo a areia, dificultando sua remoção (INCA, 2020).

Câncer engloba um grupo de doenças complexas e multifatoriais que se manifestam de maneira diferente dependendo do órgão afetado ou o mecanismo molecular envolvido. Em termos gerais, há uma alteração nos mecanismos que regulam o crescimento celular, que pode ser por uma lesão genética, alguma mutação e/ou alterações epigenéticas no DNA. Essas alterações geram proliferação descontrolada das células, e conseqüentemente causam a desregulação da homeostase normal do organismo, afetando, não apenas o órgão alvo, mas o indivíduo como um todo (FIORENTINO & URUEÑA, 2018). Quando o tumor se dá por crescimento do número de células, ele é chamado neoplasia, que pode ser benigna ou maligna. Ao contrário do câncer, que é neoplasia maligna, as neoplasias benignas têm seu crescimento de forma organizada, em geral lento, e apresentam limites bem nítidos. Tampouco invadem os tecidos vizinhos ou desenvolvem metástases (INCA, 2020).

Para que as células cancerosas se tornem independentes de sinais proliferativos, elas adquirem habilidades fisiológicas fundamentais. Em 2011, Hanahan & Wainberg listaram 10 principais características das células tumorais, relacionadas as capacidades biológicas adquiridas por essas células durante as múltiplas etapas de desenvolvimento dos tumores. Dentre elas podem ser citadas: alta taxa de proliferação celular e replicação contínua (ultrapassando do controle do ciclo celular); resistência à morte celular (evadindo o processo de apoptose), capacidade de invasão e metástase (ativando a neovascularização); instabilidade genômica com acúmulo de mutações; desregulação do metabolismo energético; evasão do sistema imune e infiltração inflamatória.

Como o câncer é uma doença multifatorial e a todo momento novos estudos estão sendo realizados para melhor elucidar o seu desenvolvimento, Hanahan (2022) incluiu quatro novas características na mandala dos marcadores do câncer: desbloqueio da plasticidade fenotípica (capacidade para evadir ou escapar do estado de diferenciação terminal); reprogramação epigenética não mutacional (refere-se a mudanças na expressão gênica que são puramente reguladas por fatores epigenéticos); microbiomas polimórficos (capacidade de contribuir ou interferir na aquisição de outras capacidades funcionais, além da imunomodulação e mutação do genoma); senescência celular (estimulam o desenvolvimento de tumores e a progressão maligna) (Figura 5)

Figura 5 - Capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de múltiplos passos dos tumores



Legenda: As quatro novas características estão destacadas com setas vermelhas.

Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

1.6.1 Câncer de mama

O câncer de mama é atualmente o câncer mais comumente diagnosticado no mundo, excluindo os cânceres de pele não melanoma. Os números mais recentes em âmbito global estimam que houve 2,26 milhões de casos de câncer de mama em 2020, sendo a principal causa de mortalidade das mulheres em todo o mundo (SUNG et al., 2021). Apesar dos avanços farmacológicos e tecnológicos, o câncer de mama ainda é um problema clínico importante, causando alta taxa de morbidade e mortalidade e apresentando subtipos moleculares diferenciais que determinam seu prognóstico e tratamento. O sucesso do tratamento depende parcialmente da sua especificidade e da classificação molecular adequada dos tumores (LOSADA-ECHEBERRIA et al., 2017).

O câncer de mama é um tumor maligno que se desenvolve no seio, a partir do crescimento rápido e desordenado de células com potencial invasivo. Os cânceres de mama podem surgir em qualquer lugar da mama, porém, a maioria dos tumores se desenvolve no quadrante superior externo, região na qual o tecido glandular está mais presente. O segundo local mais comum é o mamilo, onde convergem os ductos

mamários. O tumor pode começa a se espalhar para outras partes do corpo através da circulação linfática ou sanguínea (BOUNDY, 2004).

Diversos fatores estão relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama. Ser mulher e envelhecer são os principais fatores que aumentam o risco. Mas, também há fatores ambientais, hormonais e genéticos. Os ambientais são: obesidade e sobrepeso principalmente após a menopausa; sedentarismo; consumo de bebida alcoólica e exposição frequente à radiações ionizantes (Raios-X). Os hormonais incluem: primeira menstruação (menarca) antes de 12 anos; não ter tido filhos; primeira gravidez após os 30 anos; não ter amamentado; parar de menstruar (menopausa) após os 55 anos e ter feito reposição hormonal pós-menopausa, principalmente por mais de cinco anos. Os fatores genéticos estão relacionados a história familiar de câncer de mama e ovário, principalmente em parentes de primeiro grau antes dos 50 anos e alteração genética. A mulher que possui esses fatores genéticos tem risco elevado para câncer de mama (DA SILVA & RIUL, 2011).

Em torno de 60 a 70% dos cânceres diagnosticados, podem ser curados com estratégias terapêuticas que envolvem uma ou mais formas de tratamento. Os principais tipos de tratamentos são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia (DE SOUZA et al., 2018).

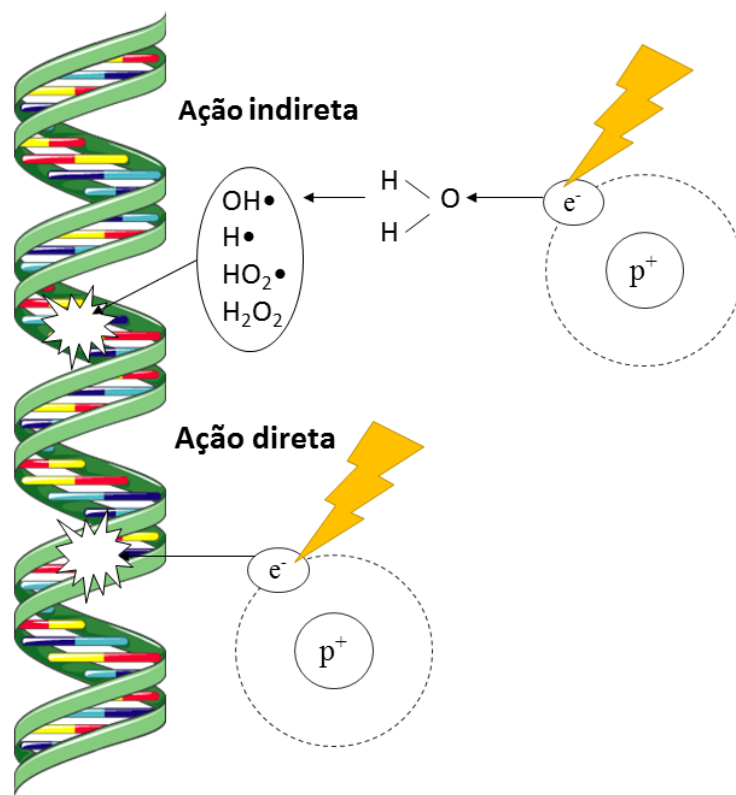
1.6.2 Radioterapia

A radioterapia é uma modalidade de tratamento oncológico que consiste em utilizar radiação ionizante, com o objetivo de eliminar, ao máximo, as células neoplásicas. Essas células são consideradas mais radiosensíveis por apresentarem uma frequência de divisão celular superior as células normais (MUKHERJEE et al., 2014). Esse tratamento pode ser realizado com fontes de radiação internas ao paciente, em contato direto ou próximo do tumor, fazendo com que o mesmo receba uma dose maior (braquiterapia); ou então com uma fonte externa, a uma distância de 80-100 cm do paciente, emitindo um feixe colimado de radiação que alcança o tumor (teleterapia) (DE SOUZA et al., 2018).

A radiação ionizante tem energia suficiente para causar ionização da matéria, ejetando elétrons de sua estrutura atômica, e os fótons de raios X e os raios gama são os mais utilizados no radiodiagnóstico e na radioterapia (OKUNO, 2013). A radiação ionizante pode causar lesão celular por dano indireto ao DNA, através da produção de

radicais livres, mas também pode promover danos diretamente no DNA e em outras macromoléculas importantes da célula (Figura 6) (HALL & GIACCIA, 2006). Os danos induzidos pela radiação ionizante especificamente nas bases nitrogenadas, bem como as quebras em uma das fitas do DNA são, em geral, reparadas rápida e adequadamente através do sistema de reparo por excisão de base, resultando em reparo completo do DNA. Em contraste, o reparo de quebras duplas no DNA induzida por radiação é muito mais complexo e o reparo inadequado pode levar à morte celular. O reparo desse tipo de quebra é feito por recombinação homóloga, onde as quebras são reparadas usando uma cromátide irmã ou um cromossomo homólogo como molde. As quebras duplas também podem ser reparadas pelo sistema de reparo de junção de extremidade não homóloga. Nesse tipo de reparo, as duas extremidades do DNA de fita dupla quebradas pela radiação são ligadas sem usar qualquer informação de um molde e, como é menos preciso, muitas vezes resulta na formação de aberrações cromossômicas que levam a morte celular (DROOGER et al., 2015).

Figura 6 - Esquema representativo da ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de DNA



Fonte: Adaptado de HALL & GIACCIA, 2006.

A vulnerabilidade das células à radiação ionizante depende em grande parte da taxa de proliferação celular, da dose total de radiação, da taxa de dose, do esquema de fracionamento e da capacidade das células de reparar danos no DNA. Como consequência, as células tumorais, que em geral têm uma divisão celular acelerada e frequentemente uma capacidade de reparo do DNA prejudicada, são mais sensíveis à radiação ionizante em comparação com o tecido saudável (DROOGER et al., 2015).

Na radioterapia utilizam-se os conceitos da radiobiologia para aperfeiçoar o tratamento oncológico no que diz respeito a dose total, número de frações, tempo total do tratamento, probabilidade de controle tumoral e probabilidade de complicações no tecido normal (HARRINGTON; JANKOWSKA & HINGORANI, 2007). Existem diversos protocolos de dose e fracionamento utilizados para o câncer de mama. A radioterapia convencional consiste em fracionar a radiação com 1,8-2,0 Gy por dia, em torno de 25-30 frações até atingir a dose total de 45-50 Gy (TRIALISTS' GROUP, 2008; DAYES et al, 2012; NG et al., 2012; CAMPOS et al., 2021). Entretanto, na radioterapia hipofracionada há um aumento da dose por fração, consequentemente diminuindo o número de sessões e uma moderada redução da dose total. No hipofracionamento utilizam-se doses acima de 2 Gy (CAMPOS et al., 2021). Há dois tipos de protocolo para o hipofracionamento: (1) hipofracionamento moderado, de 2 Gy a 3,5 Gy por fração, ou (2) ultra hipofracionamento, de 5,0 Gy ou mais por fração (NAHUM, 2015; FREITAS et al, 2018).

A justificativa das aplicações em pequenas frações diárias de radiação durante o tratamento tem fundamentação nos “5Rs” da Radiobiologia que são reparo, redistribuição, repopulação, reoxigenação e radiosensibilidade (HARRINGTON; JANKOWSKA & HINGORANI, 2007; MADAN & KHOSLA, 2020). Recentemente, foi sugerido o sexto R denominado de resposta imune tumoral local e à distância. A radiação induz sinais inflamatórios e a liberação de antígenos tumor-específico que estimulam a imunidade local e sistêmica (MADAN & KHOSLA, 2020).

Os tecidos não tumorais de resposta lenta, em geral, apresentam maior eficácia de reparo em relação às lesões subletais. As células precisam reconhecer o dano para ativar via de reparo e a parada do ciclo celular. Células tumorais geralmente são ineficientes nessas vias. Células não tumorais são capazes de reparar o dano subletal no intervalo entre as frações de radiação ionizante recebidas (HARRINGTON; JANKOWSKA & HINGORANI, 2007; MADAN & KHOSLA, 2020).

A redistribuição relaciona a sensibilidade das células à radiação ao ciclo celular. De acordo com o ciclo celular as células apresentam radiosensibilidade e

radiorresistência. Por exemplo, células nas fases G1 e S são majoritariamente radiorresistentes, enquanto as fases G2 e M são mais sensíveis. Após a morte das células mais sensíveis, as células sobreviventes progridem no ciclo celular para as fases de maior radiosensibilidade, aumentando a chance de morte no próximo fracionamento. A redistribuição aumenta a sensibilização de células proliferativas, como as tumorais, e poupa aquelas não proliferativas, como as de tecido de resposta lenta (HARRINGTON; JANKOWSKA & HINGORANI, 2007; MADAN & KHOSLA, 2020).

De acordo com a repopulação, as células tumorais podem resistir a morte radioinduzida, devido a sua capacidade de crescimento. Ao mesmo tempo que o fracionamento é importante para o tecido normal de resposta rápida se recuperar e repopular a região afetada pela radiação, evitando uma reação aguda; no tumor, aumenta-se a chance do recrutamento de células para a proliferação. Por isso, é necessário que a radioterapia se complete dentro do tempo estabelecido após o seu início (HARRINGTON; JANKOWSKA & HINGORANI, 2007; MADAN & KHOSLA, 2020).

Os tumores podem apresentar, em maior ou menor proporção, células em hipóxia, que são mais radiorresistentes, e com maior potencial para reparo e repopulação do tumor. O fracionamento permite induzir morte nas células tumorais bem oxigenadas, próximas aos capilares, que são mais sensíveis à radiação. As células tumorais que estão em hipóxia antes da irradiação, se tornam oxigenadas depois, se tornando mais radiosensíveis. Isso acontece porque a população de células tumorais diminui e, portanto o aporte de oxigênio aumenta para as células em hipóxia que ao longo do fracionamento vão se reoxigenando (HARRINGTON; JANKOWSKA & HINGORANI, 2007; MADAN & KHOSLA, 2020).

A radiosensibilidade inclui características moleculares intrínsecas das células, capacidade de reparo, programação genética, entre outros fatores, que as tornam mais sensíveis ou resistentes à radiação (HARRINGTON; JANKOWSKA & HINGORANI, 2007).

Em suma, a radiobiologia aplicada à radioterapia tem como objetivo entender os mecanismos envolvidos nas respostas das células tumorais e não tumorais. Escolher uma dose ou tipo de fracionamento capaz de lesar menos as células não tumorais e ocasionar maiores danos às células tumorais, é foco de estudo constante. Aumentar a razão entre a probabilidade de cura do tumor e a probabilidade de complicações é o propósito primário para se obter uma razão terapêutica favorável. Essa melhora da razão

terapêutica pode ser obtida de diferentes formas, incluindo a utilização de radiomodificadores.

1.6.2.1 Radiomodificadores

São substâncias sintéticas ou naturais capazes de modificar os efeitos biológicos gerados pela radiação ionizante nos tecidos biológicos. Existem dois tipos distintos de radiomodificadores: os radioprotetores e os radiosensibilizadores (VICTÓRIO et al., 2022).

Os radioprotetores são substâncias que previnem ou reduzem os danos causados pela exposição à radiação ionizante aos tecidos biológicos, principalmente o estresse oxidativo. Tais substâncias podem ser administradas antes ou após a radioterapia. Algumas características são importantes para uma substância se tornar um radioprotetor como, induzir o reparo do DNA e de danos celulares; possuir atividade de imunomodulação; combater os radicais livres e diminuir o estresse oxidativo (VICTÓRIO et al., 2022). O radioprotetor ideal deveria alcançar todos os tecidos que precisam ser protegidos, reduzindo a toxicidade radioinduzida, e não proteger os tumores com o mesmo grau de proteção dos tecidos normais.

Um exemplo de substância com atividade radioprotetora é o acemanana, um polissacarídeo encontrado nas folhas de *Aloe vera*. O acemanana é capaz de regular o sistema imunológico e induzir a proliferação de células hematopoiéticas em camundongos machos suíços albinos (YI et al., 2021).

A epigallocatequina galato (EGCG) é uma catequina, substância presente no chá verde (*Camellia sinensis*). Nas células de carcinoma hepatocelular de murino (H22), essa substância exerceu função de sensibilização à radiação através da regulação da via de sinalização miR-34a/Sirt1/p53. Por outro lado, apresentou atividade radioprotetora regulando as atividades antioxidantes e imunomoduladoras em camundongos machos da linhagem Kunming (YI et al., 2021).

Radiosensibilizadores são agentes químicos utilizados para aumentar o efeito da radiação quando administrados em combinação. As características ideais para um bom radiosensibilizador são: aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; esgotar a seletividade das células tumorais por antioxidantes e enzimas antioxidantes; aumentar a peroxidação lipídica; inibir o reparo e a síntese do DNA; induzir apoptose e parada do ciclo celular (VICTÓRIO et al., 2022).

Uma molécula radiosensibilizadora é o ácido elágico, um polifenol sintetizado por algumas espécies vegetais. Em células de câncer de mama (MCF-7) esta substância melhorou a sensibilidade apoptótica das células à radiação gama, acompanhada pela parada do ciclo celular, desregulação mitocondrial e danos nucleares (YI et al., 2021).

O Resveratrol é um polifenol, de propriedade antioxidante, encontrado principalmente em sementes de uvas. Em ratos machos, Wistar albinos, o resveratrol regulou a proteína quinase C e a transcrição de enzimas antioxidantes, se comportando como um radioprotetor. Já em células humanas de câncer de mama o resveratrol ativou apoptose, afetou o metabolismo celular oxidativo e aumentou a expressão da p53, agindo como um radiosensibilizador (YI et al., 2021).

Outro composto extraído de um vegetal, a curcumina, é um derivado da cúrcuma e isolado principalmente das raízes da *Curcuma longa* L. Sua principal propriedade radioprotetora é sequestrar os radicais livres, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio induzida pela radiação. Entretanto, na linhagem celular MCF-7 (câncer de mama) a curcumina induziu a morte de células irradiadas pela via fator nuclear- κ B, apresentando ação radiosensibilizadora (YI et al., 2021).

De modo geral, radiomodificadores naturais combinados com a radioterapia é uma opção promissora para o tratamento do câncer, para confirmar sua segurança são necessário ensaios *in vivo* e *in vitro*, incluindo avaliação clínica. Alguns produtos naturais já são bem estabelecidos comercialmente, são fáceis de serem adquiridos e podem ser utilizados como radiomodificadores.

2 JUSTIFICATIVA

Na literatura, estudos evidenciam o uso de Medicina Complementar e Alternativa para diversos tipos de câncer e trabalhos apontam *P. alliacea* como um vegetal que apresenta um excelente efeito antitumoral. Dessa forma, averiguou-se a relação existente entre pacientes submetidos ao tratamento convencional para câncer de mama, e o uso de plantas medicinais, especificamente *P. alliacea*. Foram encontrados dois artigos, baseados em questionários submetidos aos pacientes que frequentavam a terapia ambulatorial. Os artigos foram realizados na Colômbia e na Jamaica, países situados entre o trópico de câncer e trópico de Capricórnio, onde a espécie vegetal em questão ocorre naturalmente.

De um questionário aplicado em pacientes que frequentavam o Centro Javeriano de Oncologia do Hospital Universitário San Ignacio, em Bogotá na Colômbia, entre junho e dezembro de 2011, pode-se destacar que 56% dos pacientes fizeram uso de alguma medicina tradicional. Onde 65% dos pacientes tiveram uma percepção positiva de usar plantas medicinais e cerca de 55% dos pacientes utilizaram tratamento alopático simultaneamente. De modo geral, o trabalho relata que o método mais comum de ingestão das plantas medicinais é fresco ou em forma de suco (50,8%), bem como infusão de folhas (DIAZ et al., 2012).

Outro levantamento foi realizado nas clínicas de oncologia e urologia do Hospital Universitário das Índias Ocidentais em Kingston, Jamaica, entre janeiro e julho de 2016. Dos pacientes entrevistados, 80% envolveu alguma planta medicinal durante o tratamento prescrito pelo médico. O uso de ervas foi articulado no sentido das tradições e perspectiva positiva da eficácia à base de plantas (88%), alimentada por relatos de outros pacientes. A maioria desses usuários (74,7%) estava sob tratamento concomitante com um medicamento prescrito e, preocupantemente, apenas 15% dos pacientes informaram seus oncologistas. Os métodos de preparo citados foram infusão e decocção, utilizando planta inteira, raízes, folhas e ramos (FOSTER et al., 2017).

Então, é essencial estudar as interações entre plantas comumente usados por pacientes com câncer conjuntamente com tratamentos prescritos pelo oncologista. Apesar das crenças da população, de que o uso da planta é sempre um tratamento de baixo risco, isso não é necessariamente verdade, elas podem interagir antagonisticamente ou sinergicamente com terapias convencionais. O exemplo de interações antagônicas é observado na infusão da erva de São João (*Hypericum perforatum* L.) usada para tratar câncer e depressão. A associação de drogas como a

dogoxina e a infusão citada acima, pode induzir a expressão de enzimas do complexo do citocromo p450 e glicoproteína-P, causando uma redução da ação da dogoxina no plasma sanguíneo (CHRUBASIK-HAUSMANN, VLACHOJANNIS & MCLACHLAN, 2019). Em contrapartida, a curcumina presente na *Curcuma longa* aumenta as atividades antitumorais, e pode ser usada como agente terapêutico, isoladamente ou em combinação com outros agentes convencionais, para tratar o câncer (LI et al., 2007).

De um modo geral, a razão para o uso da Medicina Complementar e Alternativa é a crença positiva da ajuda no combate ao câncer. Segundo Almasdy e colaboradores (2018), família e amigos são as fontes mais comuns de informações e incentivo ao uso da Medicina Complementar e Alternativa. A partir do levantamento bibliográfico foi possível observar uma percentagem de pacientes que utilizam planta medicinal sem consentimento médico. Vale ressaltar que durante a busca não foram encontrados trabalhos que investigam os efeitos biológicos, do uso da *P. alliacea* ou dos seus polissulfetos juntamente com o tratamento prescrito pelos médicos, como a radioterapia. Na literatura ainda faltam novos estudos para avaliar os efeitos sinérgicos ou antagônicos das terapias tradicionais contra o câncer da mama. Salienta-se que novas políticas de triagem de novos medicamentos estimulam ensaios com vários seres vivos, procariotos e eucariotos, bem como indicam a incorporação de testes *in vitro* no processo (VARGESSON, 2015). Dessa forma, se justifica o presente trabalho, a fim de investigar os efeitos causados por polissulfetos presentes na espécie vegetal, *P. alliacea*, juntamente com radiação ionizante, para avaliar a segurança e eficácia de compostos dessa planta comumente usada em diversos países.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos biológicos de polissulfetos (DMS, DDS, DTS e dos três polissulfetos juntos (*mix*) de *P. alliacea*, associados ou não à radiação ionizante, em DNA plasmidial e na linhagem tumoral MCF-7, proveniente de adenocarcinoma mamário humano.

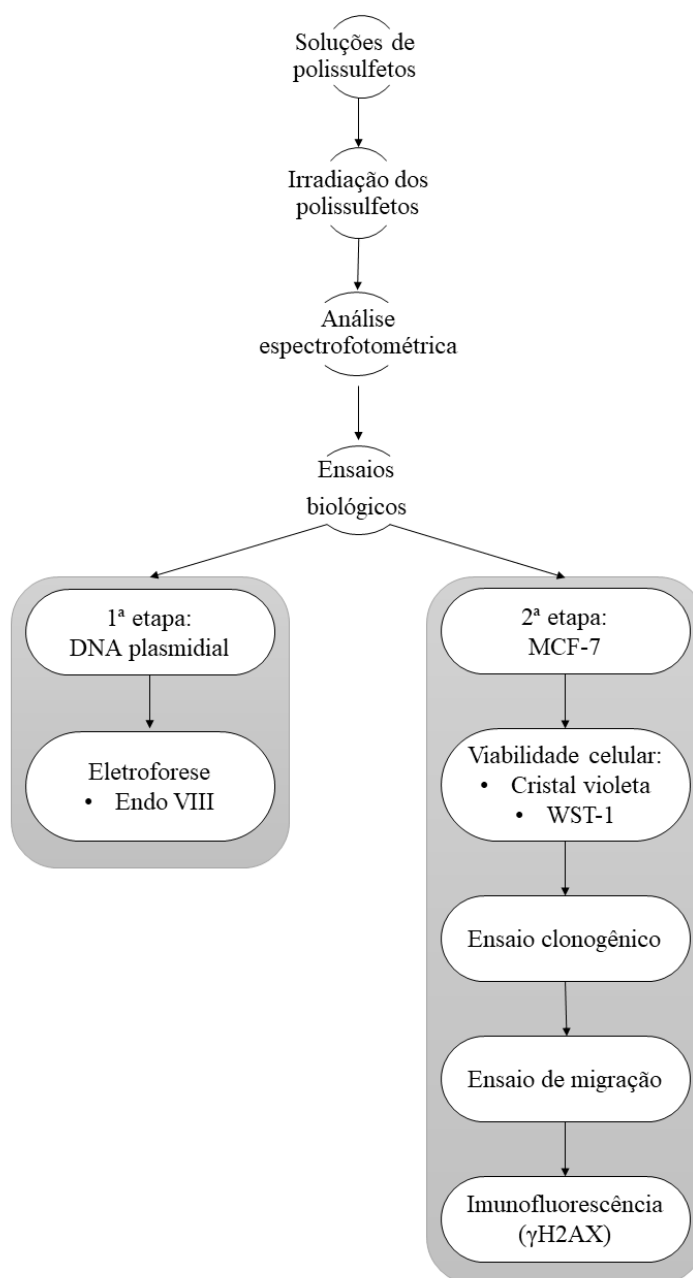
3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o potencial genotóxico dos polissulfetos (DMS, DDS, DTS e *mix*), em DNA plasmidial através de eletroforese de DNA de plasmídeos em gel de agarose;
- Averiguar a ação da radiação ionizante em DNA plasmidial, associada ou não aos polissulfetos (DMS, DDS, DTS e *mix*);
- Determinar a citotoxicidade dos polissulfetos (DMS, DDS, DTS), associado ou não à radiação ionizante, na linhagem celular MCF-7.
- Avaliar a recuperação clonogênica da linhagem celular MCF-7 incubada com o polissulfeto DTS, associado ou não à radiação ionizante;
- Investigar a potencialidade de migração da linhagem celular MCF-7 incubada com o polissulfeto DTS, associado ou não à radiação ionizante;
- Determinar o potencial genotóxico do polissulfeto DTS, associado ou não à radiação ionizante, na linhagem celular MCF-7, através da marcação de histonas fosforiladas (γ H2AX).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi dividido em duas etapas, a dos ensaios com DNA plasmidial, e outra com as células tumorais MCF-7. Entretanto, antes de iniciar os ensaios biológicos foi necessário realizar análises como solubilidade dos polissulfetos e avaliação espectrofotométrica dos polissulfetos. Na figura 7 estão esquematizadas as etapas desenvolvidas no presente trabalho.

Figura 7 - Representação das etapas desenvolvidas



4.1 Polissulfetos utilizados

Os padrões de polissulfetos foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados em diferentes concentrações preparadas na hora do uso.

Monossulfeto de dibenzil (DMS) (33820);

Dissulfeto de dibenzil (DDS) (W361704) e

Trissulfeto de dibenzil (DTS) (265039).

Foi realizada uma etapa de padronização com solvente metanol, uma substância orgânica da família dos álcoois, polar e muito solúvel (TEPHLY, 1991). Como é sabido, o metanol apresenta alta toxicidade para uso humano e animal, bem como é tóxico para o meio ambiente. Contudo, ele oferece excelente solubilização das substâncias orgânicas (TEPHLY, 1991). Por isso ele foi escolhido, mas se fez necessário realizar uma avaliação inicial para verificar se o metanol promovia quebras ao DNA plasmidial. Como o resultado do presente trabalho não indicou lesões ao DNA plasmidial, o metanol foi utilizado na concentração de 70%, que foi a menor concentração a solubilizar os polissulfetos estudados.

Para a solubilidade dos polissulfetos uma massa de 0,001 g de cada polissulfeto foi diluído em diferentes concentrações de metanol (Proquímios): 70; 40; 20 e 10% do referido álcool em água ultrapura. Após as testagens da solubilidade dos polissulfetos, a concentração de 70% do solvente foi escolhida. Nesta concentração foi obtida a melhor solubilidade dos polissulfetos em metanol.

Desse modo, as soluções foram preparadas a partir da solubilização de 0,001 g de polissulfeto em 700 µL de metanol absoluto. A amostra foi submetida ao ultrassom (UltraCleaner 1400) durante 5 minutos, foram adicionados 300 µL de água ultrapura à solução e o processo de sonificar foi repetido mais uma vez. A solução era acomodada em microtubos de 1,5 mL, para utilização imediata.

4.2 Irradiação dos polissulfetos

O equipamento emissor de raios X (RAD SOURCE; RS 2000 ProBiological Irradiator) (Figura 8), localizado no Departamento de Ciências Radiológicas (DCR) da UERJ, foi utilizado para irradiação das amostras. Os parâmetros técnicos selecionados foram: tensão de 150 kV, corrente de 20 mA e filtração total, que foi composta de filtros

de alumínio (1,75 mm) sobre filtros de cobre (0,3 mm). Um colimador de chumbo foi empregado para direcionar o feixe de raio-X.

Na irradiação dos microtubos a prateleira foi utilizada na posição 4, sobre uma base de 0,5 cm de PMMA. Com estes parâmetros foi obtida uma taxa de dose de aproximadamente 25 mGy/s (1,5 Gy/min). Foi usada uma dose de 60 Gy, medida através do monitor PTW NOMEX (Multimeter; T11049).

Foi realizada uma busca bibliográfica com o intuito de saber qual a dose aplicada nos ensaios com *Escherichia coli*, foi constatado que Jiang e colaboradores (1997) utilizaram as doses de 45, 90, 135, 180, 225 e 270 Gy para identificar a sensibilidade aos raios-X. Entretanto, Bruckbauer e colaboradores (2020) utilizaram doses de 0, 10, 100 e 1000 Gy para investigar a oxidação proteômica induzida por radiação ionizante em ensaio com *E. coli*. Utilizando várias taxas de doses os autores observaram que a exposição à radiação ionizante com fótons de raios-X induziu uma transição progressiva de DNA superhelicoidizado (Forma I) para DNA linearizado (Forma III) (KUMAR et al., 1999; IACOMINO et al., 2014). Iacomino e colaboradores (2014) identificaram a partir da dose de 10,8 Gy bandas no gel correspondente à forma círculo aberto (Forma II). As doses encontradas na literatura variaram muito e por isso, no presente trabalho foram testadas 2, 5, 10, 20, 40 e 60 Gy. A dose escolhida para dar prosseguimentos aos ensaios foi de 60 Gy, que mantém cerca de 75% do DNA plasmidial na forma I.

Figura 8 - Irradiador biológico com destaque para ampola de raios-X



Legenda: Irradiador biológico RAD SOURCE - RS 2000 Biological Irradiator.

Fonte: Irradiador biológico <www.radsorce.com> acessado em 03/08/2022. Ampola de raio-x <www.cirurgicaamorim.com.br> acessado em 03/08/2022.

4.3 Análise espectrofotométrica

Para obtenção dos espectros de absorção das soluções dos três polissulfetos isolados (DMS, DDS e DTS), da solução formada pelos três polissulfetos juntos (chamada de *mix*) e do benzoato de sódio (Sigma-Aldrich; B-3375), que é um acceptor específico de radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), usado como controle antioxidante. Foi utilizado o espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 A), na faixa espectral de 200 a 800 nm. As soluções foram expostas a 60 Gy de RI. Foram selecionados dois grupos de amostras para leitura, grupo não irradiado e irradiado.

4.4 Ensaios biológicos com plasmídeos

4.4.1 Obtenção dos plasmídeos a partir de culturas bacterianas

Plasmídeos são moléculas de DNA circular extra cromossômico, dupla fita, que possuem capacidade de replicação autônoma. Ocorrem naturalmente em bactérias e alguns organismos eucarióticos como leveduras e geralmente codificam genes de resistência. O plasmídeo pUC 9.1, utilizado neste estudo, possui um gene de

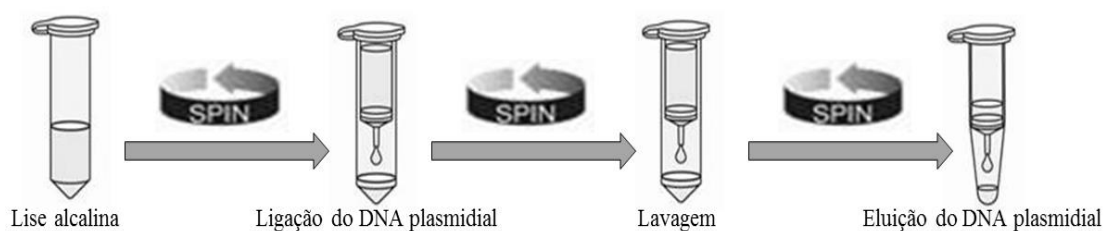
resistência a ampicilina e o gene da origem de replicação de DNA está ligado ao gene da β -galactosidase de *E. coli*.

A cepa de *Escherichia coli* utilizada para estocar os plasmídeos foi DH5 α F'IQ+pUC 9.1, deficiente em reparo por recombinação (*rec A*⁻) e resistente ao antibiótico canamicina. Para conservação da cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo pUC 9.1 utilizou-se volumes iguais de cultura bacteriana em fase estacionária de crescimento e glicerol estéril (100%). Estes estoques foram acondicionados em microtubos e armazenados a -20°C, sendo renovados a cada quatro meses.

Para obtenção dos plasmídeos purificados, uma alíquota (200 μ L) do estoque em glicerol foi colocado em *erlenmeyer* estéril, contendo 6 mL de meio LB acrescido dos antibióticos ampicilina (50 μ g/mL) e canamicina (10 μ g/mL). O frasco foi então incubado a 37°C, sob agitação de 120 rpm, por 15 a 18 horas em incubadora do tipo *shaker* (Nova Ética, modelo 430 - DBE), para a cultura atingir a fase estacionária de crescimento (10⁹ células/mL).

A partir dessa cultura foi realizada a extração de DNA plasmidial, de acordo com o protocolo do kit Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitek) (Figura 9). A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio do equipamento NanoVue (GE, HealthCare) em 200 ng.

Figura 9 - Etapas de extração do DNA plasmidial utilizando o kit de extração plasmidial



Fonte: Adaptado de Invitek do kit Invisorb® Spin Plasmid Mini Two

4.4.2 Polissulfetos para os ensaios com DNA plasmidial

As concentrações dos polissulfetos isolados foram testadas durante os experimentos são de 180; 1085 e 2714 μ M. O preparo das soluções está descrito no item 4.1. Uma solução misturando os três polissulfetos (solução mix) foi preparada adicionando-se uma alíquota de mesmo volume de cada amostra de polissulfeto. Nos ensaios de genotoxicidade a solução *mix* foi utilizada nas concentrações de 60, 358 e

904 μM . A solução *mix* foi preparada e testada com o objetivo de simular a ação conjunta dos três polissulfetos, uma vez que eles ocorrem de forma natural em *P. alliacea* e podem estar presentes de forma simultânea na espécie vegetal.

4.4.3 Avaliação do potencial genotóxico dos polissulfetos em DNA plasmidial

A técnica usada neste trabalho permite verificar a genotoxicidade (DE MATTOS et al., 2004; HAMEDT et al., 2014; SOARES et al., 2014), avaliando a ação dos polissulfetos de *P. alliacea* e da RI, através da visualização e quantificação de quebras no DNA plasmidial.

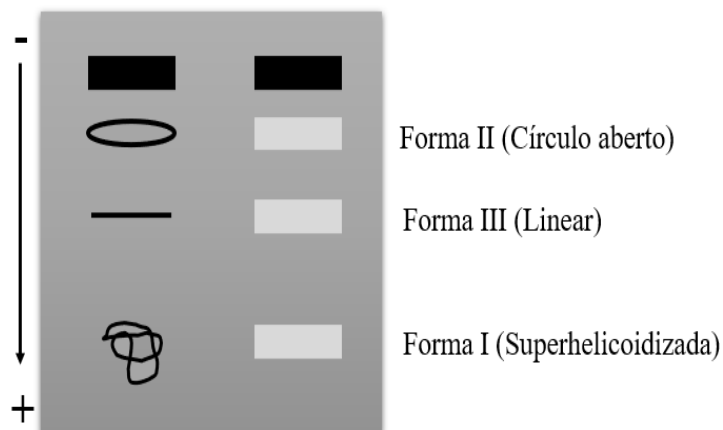
É baseada na separação de moléculas de DNA plasmidial em função da migração diferenciada das três formas estruturais do plasmídeo, durante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico, ou seja, quando submetida à eletroforese em gel de agarose, a estrutura tridimensional das moléculas influencia na migração, uma vez que estas moléculas com quebras apresentam migração diferente do DNA íntegro, pois apresentam maior dificuldade em passar pelos poros da rede de agarose.

De acordo com a sua integridade, é possível encontrar formas estruturais do DNA plasmidial que podem ser de três tipos:

- i) forma superhelicoidizada, também chamada de forma I, correspondente ao plasmídeo sem quebras;
- ii) forma círculo aberto ou forma II, resultante de quebras simples e
- iii) forma linear ou forma III, resultante de quebras duplas.

Essas 3 formas migram com velocidades diferenciadas no gel de agarose, conforme representado na figura 10.

Figura 10 - Esquema da migração das três formas do plasmídeo no gel de agarose submetido a eletroforese



Legenda: Forma I (superhelicoidizada), correspondente ao plasmídeo sem quebras; Forma II (círculo aberto), resultante de quebras simples; Forma III (linear), resultante de quebras duplas. A seta indica o sentido da corrida das moléculas no gel, de acordo com a polaridade.

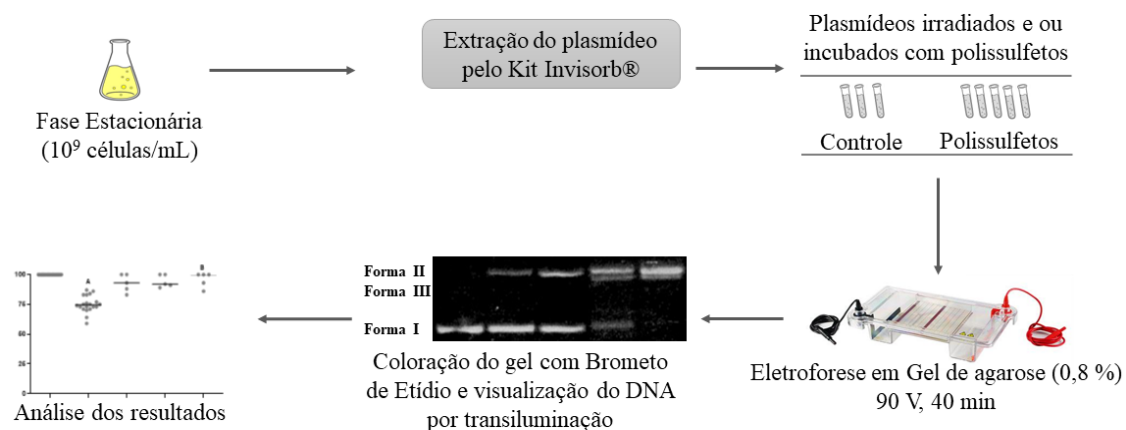
Fonte: DE MATTOS et al., 2004.

Após a extração, os plasmídeos foram incubados, nas seguintes condições: o volume da reação foi de 50 μL , com 4 μL de DNA plasmidial (200 ng) (DE MATTOS et al., 2004). O volume restante ocorreu pela adição de água ultra-pura e solução dos padrões de polissulfetos DMS, DDS, DTS nas concentrações de 180, 1085 e 2714 μM , respectivamente, e para o *mix*, 60, 358 e 904 μM nos volumes adequados. O controle consistiu em apenas DNA plasmidial e água ultra-pura e em alguns experimentos foi utilizado a RI com dose de 60 Gy. Ao final de 60 minutos de incubação foi preparado um gel de agarose *NMP* (0,8%) e 10 μl de cada uma das amostras foram misturados a 2 μl de tampão de carregamento 6x concentrado (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%) e o volume total aplicado nos *slots* (pequenos poços com capacidade de até 20 μl de solução) do gel.

A solução de agarose *NMP* 0,8% foi preparada em tampão TAE 1X concentrado, sendo aquecida até sua completa homogeneização. Após leve resfriamento, a solução foi depositada em uma cuba horizontal (GIBCO BRL - Life technologies, Horizon 58), onde se encaixou o pente para a formação dos *slots*, nos quais foram aplicadas as amostras plasmidiais. A cuba de eletroforese foi preenchida com tampão TAE (1X) e aplicada uma tensão de 90 V, por 55 minutos, fonte de eletroforese (*PWSys, PW300*). Concluída a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por aproximadamente 15 minutos e as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia, LTB 21x26 ST), sendo o gel, então, digitalizado em um sistema de captura de imagens (Canon Power Shot S2IS).

A metodologia descrita com todas as etapas da avaliação do potencial genotóxico dos extratos em DNA plasmidial está representada na figura 11.

Figura 11 - Esquema representativo de todas as etapas da avaliação do potencial genotóxico dos extratos em DNA plasmidial



Fonte: A autora

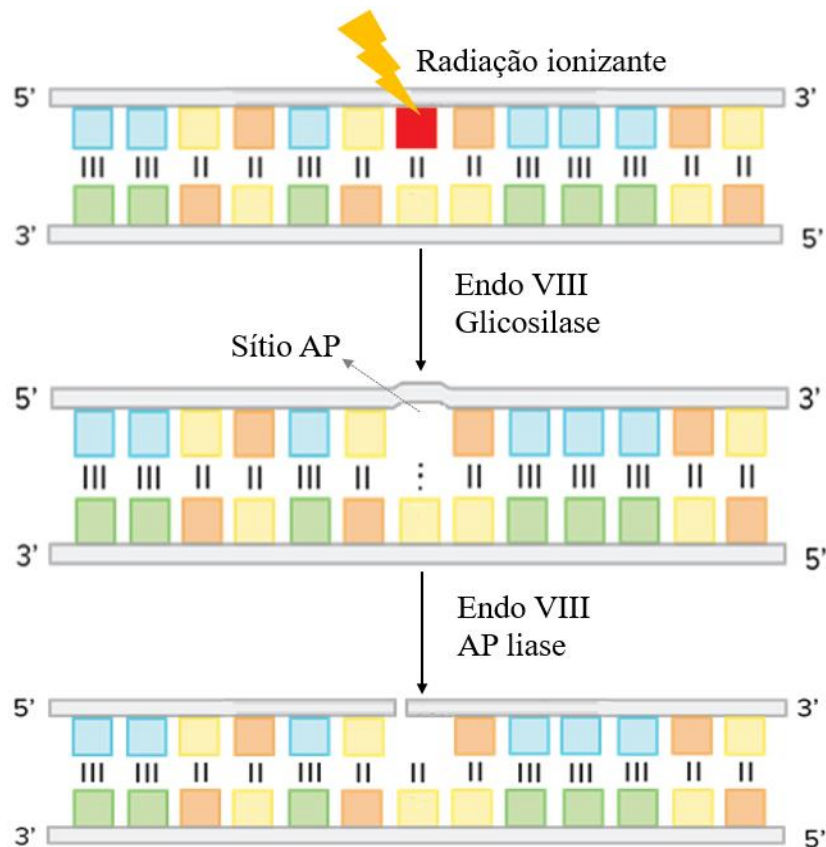
4.4.4 Enzima de reparo Endonuclease VIII

Com o objetivo de verificar a existência de lesões produzidas pela radiação ionizante em bases nitrogenadas, mas que não resultem em quebras diretamente, foi avaliada a ação da enzima Endonuclease VIII (Endo VIII) (BioLabs; M0299) de *Escherichia coli* é uma DNA glicosilase que atua como N-glicosilase e AP-liase. A atividade da N-glicosilase libera pirimidinas danificadas na fita dupla de DNA, gerando um sítio apurínico (sítio AP). A endonuclease VIII tem atividade bifuncional, cliva a ligação fosfodiéster no lado 3' da lesão (β - eliminação) e também atua no lado 5' fosfato da lesão (δ - eliminação) do DNA (KLADOVA et al., 2017) (Figura 12).

Em amostras contendo DNA plasmidial incubado com o *mix* de polissulfetos, irradiados ou não, foram acrescentadas 2 unidades da enzima Endo VIII e o tampão apropriado (1X). As amostras foram então mantidas por 60 minutos a 37°C para a ação da enzima, o padrão de migração no gel de eletroforese foi avaliado e o número de quebras determinado pela análise estatística.

Foi utilizado uma solução de benzoato de sódio (Sigma-Aldrich; B-3375) (100 mM) em água ultra-pura como controle. Este é um aceptor específico de radicais hidroxila (\bullet OH) (DANTAS et al., 1999), um tipo de radical livre gerado pela interação da RI com o meio (DROOGER et al., 2015).

Figura 12 - Esquema representativo da ação da enzima Endonuclease VIII



Fonte: A autora.

4.5 Ensaio biológicos com linhagem celular

A linhagem celular tumoral de adenocarcinoma da mama, MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), foi estabelecida por Sule e colaboradores a partir da efusão pleural em 1973 de uma paciente com câncer de mama, mulher caucasiana de 69 anos com doença metastática. Caracteriza-se por expressar altos níveis de receptores de estrogênio ER α e baixos níveis de ER β , apresentando alta sensibilidade ao estradiol (E2), dependendo deste hormônio para sua proliferação. Na ausência de estrogênio, estas células aumentam a expressão dos receptores de estrogênio (COMÇA, CÎMPEAN & RAICA, 2015).

A célula MCF-7 apresenta característica aderente quando em cultura celular e foi cultivada com meio Dulbecco MEM (DMEM) (Gibco; 12800-058), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma; F0804), 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco; 15240096). As células foram gentilmente cedidas pela prof^a Dr^a Verônica Morandi, do Laboratório de Biologia de Célula Endotelial e da Angiogênese

(LabAngio), Departamento de Biologia Celular da UERJ e foram adquiridas do American Types Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Inicialmente foram realizadas expansões nas células cedidas para posterior congelamento e assim ter esta linhagem celular em estoque, em freezer com temperatura de -80°C (Indrel Scientific; IULT -86° -Laboratório de Biologia do Câncer DBB/UERJ). As células foram congeladas em tubos criogênicos (2 mL) com uma solução contendo 5% de crioprotetor, o DMSO (Dimetilsulfóxido) (Proquímios) em SFB. Este por sua vez evita a formação de cristais de gelo, permitindo manter a integridade da membrana celular (GOUVEIA & SOBRAL, 2020).

4.5.1 Cultivo celular

As células foram mantidas em garrafas de cultura celular na estufa à 37°C e 5% de CO_2 (Thermo Electron Corporation; RCC3000T-5ABC) com meio DMEM suplementado. Para realizar os experimentos as garrafas estavam com confluência de 80%. Como as células MCF-7, apresentam características aderentes foi necessária a utilização da tripsina (Gibco; 25200-072), que é uma enzima que degrade as proteínas de adesão celular. Quando as garrafas atingem a confluência de 80%, estas são lavadas com PSB (1X) (Laborclin; 590338), em seguida foi adicionado tripsina e a garrafa foi colocada por 4 minutos a 37°C . Com o auxílio de um microscópio óptico invertido (Bel Equipamentos; INV-100) foi possível confirmar que as células não estavam mais aderidas à parede da garrafa. Adicionou-se meio de cultura suplementado com SFB na garrafa de cultivo. O meio de cultura contém proteínas que inativam a ação da tripsina, desta forma impede que a tripsina degrade outras proteínas da membrana celular. No tubo cônico (15 mL) foi transferido todo o conteúdo da garrafa e centrifugado por 3 minutos à 1000 rpm (Excelsa Baby II; 206-R). O sobrenadante foi descartado, e adicionado 1 mL de meio para solubilizar o *pellet*. Então, foi retirada uma alíquota (10 μL) para a realização da contagem.

A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer com 10 μL da solução homogeneizada que continha 10 μL do corante azul de tripan a 0,4% (INLAB; 2420) e 10 μL da solução com as células. Abaixo está descrito a fórmula necessária para o cálculo que resulta na quantidade de células presentes em 1 mL. Em seguida, foi realizado outro cálculo, para saber quantos μL correspondiam a quantidade necessária de células para serem semeadas nas placas de acordo com o experimento, realizando uma regra de três

simples. A fórmula utilizada para contagem de células na Câmara de Neubauer (GOUVEIA & SOBRAL, 2020).

$$\frac{(\text{Somatório das células dos 4 quadrantes})}{4} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição} = \text{Células/mL}$$

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{Volume}_{\text{Final}} (\text{Solução})}{\text{Volume}_{\text{Inicial}} (\text{Células})}$$

4.5.2 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular das células expostas aos polissulfetos e/ou RI foram utilizadas duas técnicas colorimétricas diferentes, empregando o corante Cristal Violeta (Synth; C.I. 42555) e WST-1 (Sigma- Aldrich; 05015944001).

O desenho experimental de ambos os ensaios foi igual, alterando somente as etapas de coloração para cada um deles. Em placas de 96 poços, foram semeadas 3×10^3 células/por poço e acrescido 100 μL de meio de cultura. Após 24 horas de incubação em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 , iniciou-se o tratamento das células, consistindo de duas condições diferentes:

- (1) adicionou-se os polissulfetos e após 2 horas a placa de cultura foi irradiada (polissulfetos + radiação).
- (2) a placa de cultura foi irradiada e após 30 minutos adicionou-se os polissulfetos (radiação + polissulfetos).

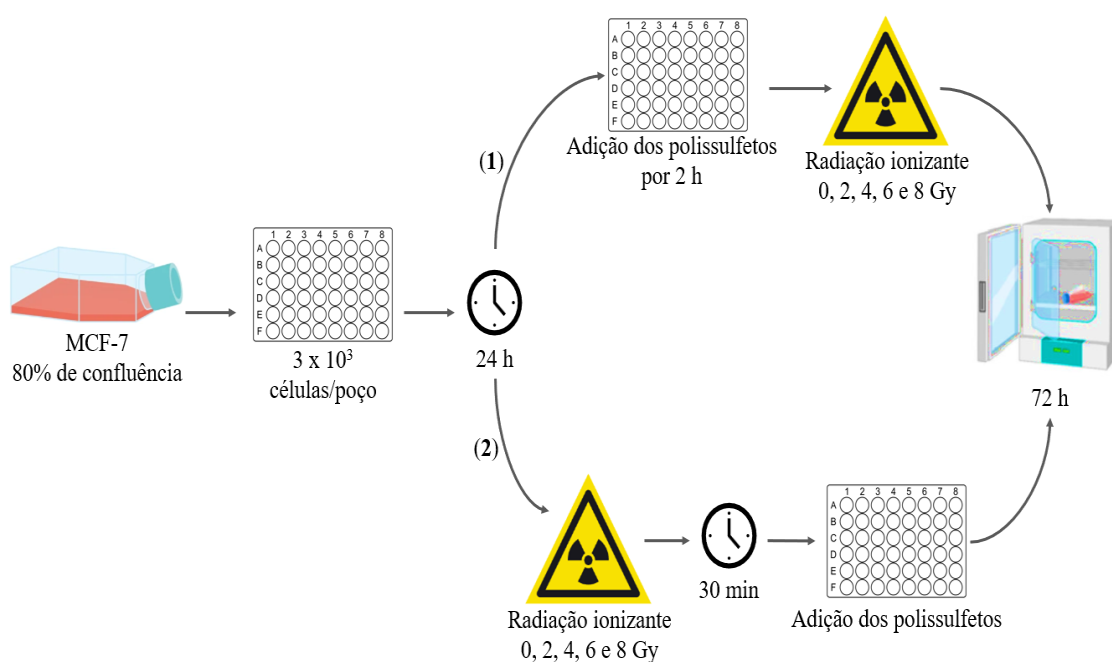
As placas foram mantidas por 72 horas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 . Após as 72 horas iniciou-se a coloração específica para cada metodologia. Para a viabilidade celular foram utilizados os três polissulfetos, DMS, DDS e DTS. O desenho experimental dos ensaios para a viabilidade celular está esquematizado na figura 13.

Para os ensaios utilizando DNA plasmidial foi utilizado o metanol para solubilizar os polissulfetos. Em contra partida o metanol é tóxico para as células eucarióticas, foi necessário substituir esse álcool pelo álcool etílico absoluto (Proquímios), um solvente menos citotóxico. Contudo, o etanol não pode exceder a concentração de 2% nas culturas celulares (RÖSNER et al., 2001). Os polissulfetos foram pesados e solubilizados em álcool etílico absoluto, com o objetivo de preparar soluções de mesma concentração, correspondendo a 10 mM. Posteriormente as três

soluções foram submetidas à diluição em série em água ultrapura, até atingirem as concentrações de interesse. As concentrações de trabalho foram escolhidas com base na literatura, sendo 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 15 e 20 μM . Essas concentrações variaram de acordo com o desenho experimental de cada ensaio.

A dose de radiação utilizada nos diferentes ensaios com células foi obtida variando o tempo de exposição e os parâmetros estão descritos no item 4.2. Sabe-se que em células eucarióticas a dose utilizada de radiação ionizante, no hipofracionamento convencional na clínica, é em torno de 2 Gy (DAYES et al, 2012; CAMPOS et al., 2021), podendo haver subdivisões: hipofracionamento moderado, de 2 Gy a 3,5 Gy por fração, ou ultra hipofracionamento, de 5,0 Gy ou mais por fração (NAHUM, 2015; FREITAS et al, 2018). Por isso as doses de radiação utilizadas foram de 2, 4, 6 e 8 Gy.

Figura 13 - Esquema representativo do desenho experimental dos ensaios para viabilidade celular



Fonte: A autora.

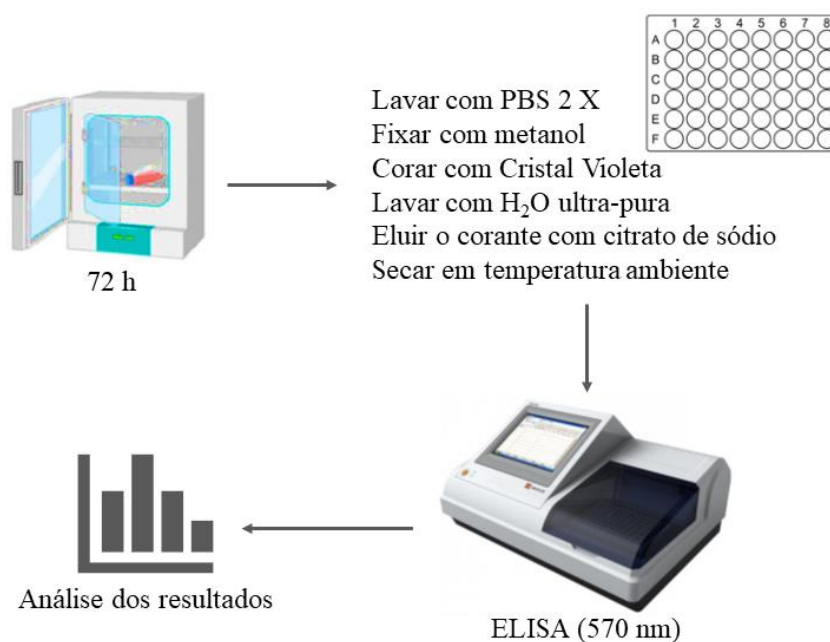
4.5.2.1 Ensaio de viabilidade celular por Cristal Violeta

O corante Cristal Violeta foi utilizado para determinar a viabilidade celular. O corante é um intercalante de ligação ao DNA. Eluindo o corante, este pode ser mensurado espectrofotometricamente, utilizando um leitor de placa ELISA (VEGA-

AVILA & PUGSLEY, 2011). Na figura 14 está esquematizado o desenho experimental da viabilidade celular pelo Cristal Violeta, cuja metodologia está descrita a seguir.

Após 72 horas de incubação o meio de cultura contendo os polissulfetos (DMS, DDS e DTS) foi retirado e as células lavadas 2 vezes com PBS (1X) e fixadas com metanol 10% em PBS (1X) por 10 minutos. Em seguida as células foram coradas com Cristal Violeta (0,2% em 2% de álcool etílico) por 20 minutos. O corante foi retirado e os poços lavados com água destilada e secos em temperatura ambiente. Para eluir o corante foi utilizado a solução de citrato de sódio (0,1 M) em 50% de álcool etílico. As placas de culturas, com as células fixadas e coradas, foram submetidas ao leitor de microplacas, na absorvância de 570 nm (Polaris, Celer). Essas leituras foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica da UERJ.

Figura 14 - Esquema representativo do desenho experimental do ensaio de viabilidade celular pelo Cristal Violeta



Fonte: A autora.

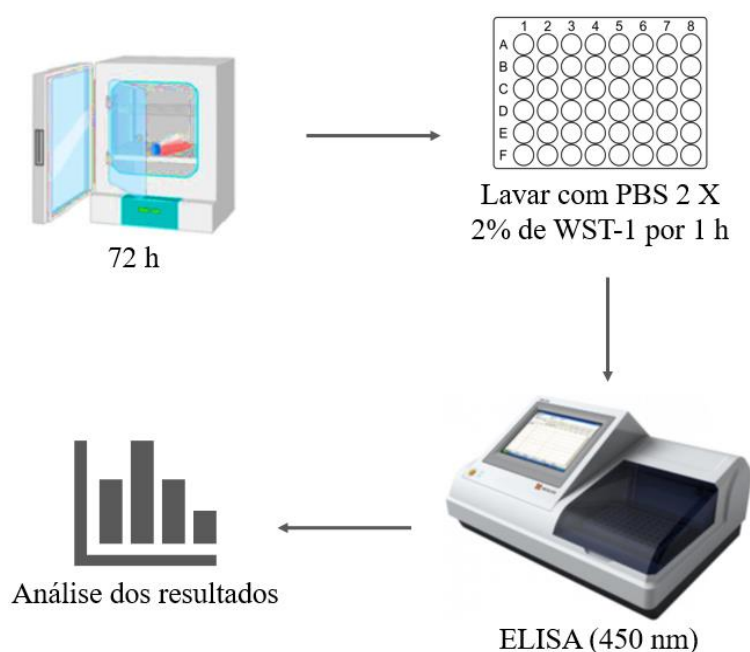
4.5.2.2 Ensaio de viabilidade celular por WST-1

É uma técnica colorimétrica que avalia o metabolismo celular, medindo, de forma indireta, a viabilidade das células. A técnica é baseada na clivagem do WST-1 (sal de tetrazólio) por desidrogenases mitocondriais e é uma medida de avaliação da

respiração celular e, conseqüentemente da taxa metabólica. O produto originado da reação entre as células e o WST-1 é o formazan, que tem cor amarelo-alaranjado, é estável e quantificado a 450 nm, utilizando um leitor de microplacas ELISA (KOYANAGI, KAWAKABE & ARIMURA, 2015).O procedimento do ensaio está resumidamente apresentado abaixo e o desenho experimental de viabilidade celular pelo WST-1 está esquematizado na figura 15.

Após 72 horas de incubação o meio de cultura contendo os polissulfetos (DMS, DDS e DTS) é retirado e as células são lavadas 2 vezes com PBS (1X). Meio de cultura fresco contendo 2% de WST-1 é adicionado a cada poço e as placas de 96 poços são incubadas em estufa, 37 °C por 1 hora. Em seguida absorvância é medida no leitor de microplacas, a 450 nm (Polaris, Celer). Essas leituras foram realizadas no Laboratório de Radio e Fotobiologia, do Departamento de Biofísica e Biometria da UERJ.

Figura 15 - Esquema representativo do desenho experimental do ensaio de viabilidade celular pelo WST-1



Fonte: A autora.

4.5.3 Ensaio de recuperação clonogênica

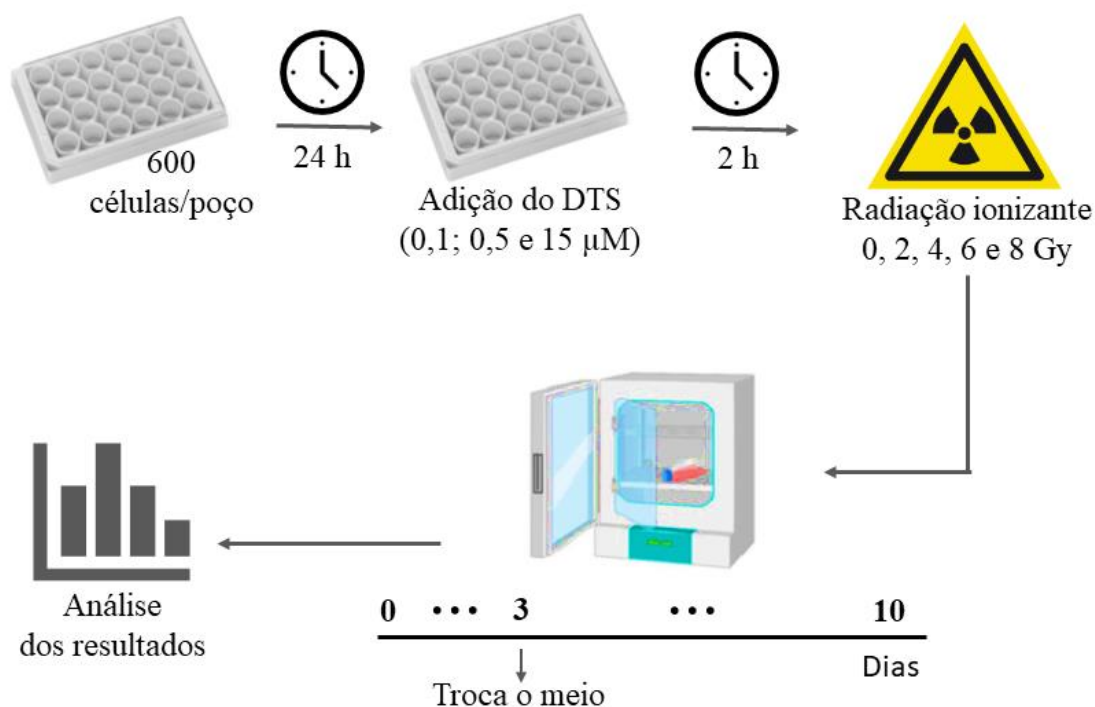
Esse ensaio foi utilizado para avaliação da capacidade mitótica das linhagens celulares, após a incubação com o DTS associado ou não à radiação (RAFEHI et al.,

2011). O desenho experimental do ensaio clonogênico está esquematizado na figura 16, após a breve descrição da técnica.

Células da linhagem MCF-7 foram semeadas em placas de 24 poços (6×10^2 células/poço) e mantidas em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO_2 durante 24 horas. Em seguida foi adicionado DTS nas concentrações de 0,1; 0,5 e 15 μM e as células incubadas por 2 horas antes das placas serem submetidas à RI de 2, 4, 6 e 8 Gy. As células permaneciam em meio contendo DTS por 72 horas (3 dias). Ao final desse tempo, o meio de cultura era retirado, adicionava-se novo meio (sem DTS) e as placas voltavam à estufa para completar os 10 dias de incubação depois da RI.

Após esse período, o meio de cultura foi desprezado e as colônias de células formadas foram coradas. Os poços da placa de cultura foram lavados 2 vezes com PBS (1X) e as células fixadas com álcool metílico 10% em PBS (1X) por 10 minutos. A solução fixadora foi descartada e as células coradas com Cristal Violeta (0,2% em 2% de álcool etílico) por 20 minutos. Em seguida, o corante foi retirado, os poços com água destilada e deixados para secar em temperatura ambiente. Ao final foi realizada a contagem manual das colônias que continham mais de 50 células.

Figura 16 - Esquema representativo do desenho experimental do ensaio clonogênico



Fonte: A autora.

4.5.4 Teste de lesão em monocamada - Scratch assay

O potencial do polissulfeto, DTS, associado ou não à RI, de inibir a migração das células, foi investigado através do ensaio de lesão em monocamada celular. Neste ensaio é possível acompanhar a migração celular para os espaços vazios gerados por uma lesão realizada na monocamada de células (ALMEIDA et al, 2020). O procedimento experimental está descrito de forma resumida a seguir, e na figura 17 está esquematizado o desenho experimental do teste de lesão em monocamada.

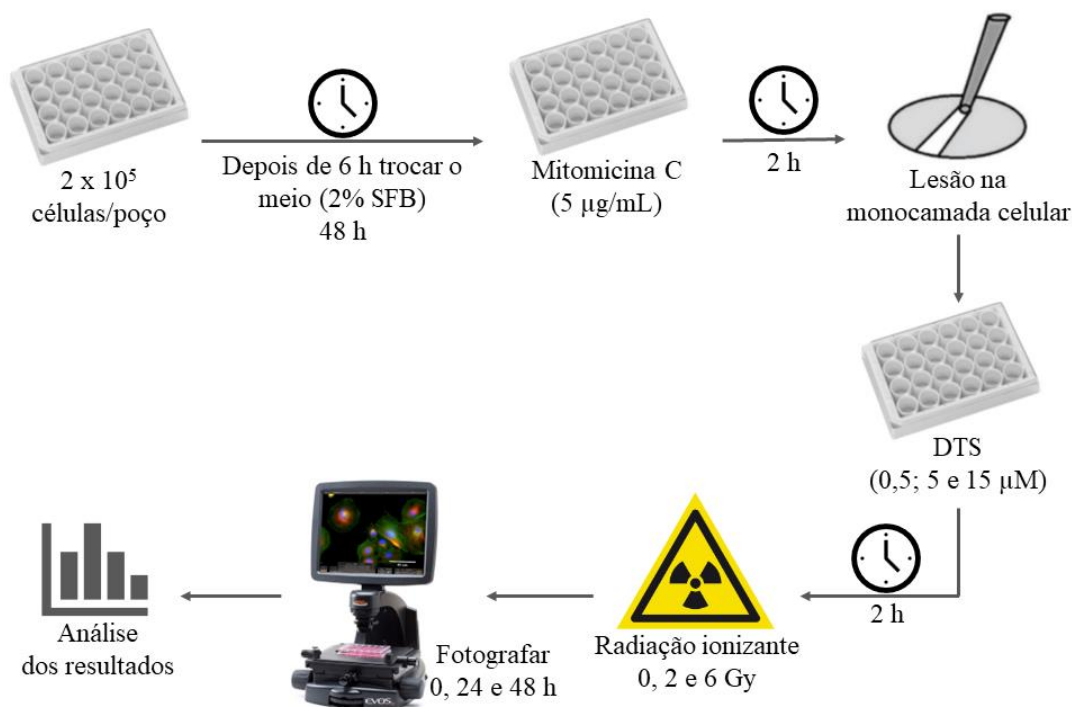
Células da linhagem MCF-7 foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^5 células/poço) e mantidas em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO_2 . Após 6 horas de incubação em meio com 10% de soro fetal bovino o meio de cultura foi trocado por outro suplementado somente com 2% de SFB e as placas foram mantidas nas mesmas condições de incubação até completar 48 horas, formando a monocamada de células.

Em seguida, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se Mitomicina C ($5\mu\text{g/mL}$ - Sigma-Aldrich; M0440), em meio sem SFB, por 2 horas. Posteriormente, o meio de cultura com mitomicina C foi retirado e adicionado meio fresco, suplementado com 2% de SFB e, então, a monocamada de células foi riscada com uma ponteira de plástico estéril de $10\mu\text{L}$. Em seguida os poços foram lavados três vezes com PBS, para retirar as células que ficaram em suspensão.

As placas de cultura foram incubadas por 2 horas com DTS nas concentrações de 0,5; 5 e $15\mu\text{M}$, em meio de cultura suplementado com 2% de SFB. Em seguida cada placa de cultura foi irradiada com 2 e 6 Gy. Após a irradiação as placas foram mantidas em estufa (37°C ; 5% de CO_2) e fotografadas sob microscópio Evos-fl (Termo Scientific, M5000) nos tempos de 0, 24 e 48 horas, no LabAngio. A área da lesão formada na monocamada celular foi medida com o software Image J (domínio público) para posterior análise de migração celular. A fórmula utilizada para calcular a área da ranhura é demonstrada abaixo, onde $A(0)$ é a área no tempo zero e $A(t)$ é a área após o tempo de incubação.

$$\% \text{ da área de fechamento da ranhura} = \frac{A(0) - A(t)}{A(0)} \times 100$$

Figura 17 - Esquema representativo do desenho experimental do teste de lesão em monocamada



Fonte: A autora.

4.5.5 Deteccção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência

Trata-se de uma análise microscópica de focos de histonas fosforiladas (γ H2AX) que são formados em resposta a quebras duplas no DNA (VASIREDDY et al., 2010; PEREIRA et al., 2021) de células incubadas com o polissulfeto DTS, associado ou não a RI. O desenho experimental do ensaio de imuno-histoquímica para deteção de γ H2AX está esquematizado na figura 18 e descrito a seguir. Essa etapa foi realizada no LabAngio.

Células da linhagem MCF-7 (3×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços contendo, em cada poço, uma lamínula redonda (\varnothing 13 mm) revestida com 2% de gelatina de pele de porco (Sigma-Aldrich; G2500). Após 24 horas de crescimento celular foi adicionado DTS nas concentrações de 0,5; 5 e 15 μ M e as placas incubadas por 2 horas. Posteriormente, as placas foram submetidas a uma dose de 2 Gy de RI. As células foram fixadas com álcool metílico absoluto por 10 minutos, nos tempo de 30 minutos e 24 horas após à RI. Após a fixação os poços da placa foram lavados com PBS (1 X) por 3 vezes e as lamínulas incubadas com anticorpo primário anti- γ H2AX

(pSer¹³⁹) (Sigma-Aldrich; SAB4300213) 1:200 em 50 mM de Tris contendo 0,9% de NaCl e 1% de BSA (Albumina de Soro Bovino) por 40 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS (1 X) e incubadas por 40 minutos com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 produzido em cabra, anti-IgG de coelho, (Invitrogen; A11008) 1:400 em 50 mM de Tris contendo 0,9% de NaCl e 1% de BSA com 10% de soro de jumento (Sigma-Aldrich; G9023). Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS (1 X) e preparadas em lâminas para visualização em microscópio com ProLong® Gold contendo DAPI (Life Technologies; P36935).

As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz, até completa secagem. As lamínulas foram visualizadas em microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000). De cada condição experimental foram fotografados 100 núcleos celulares, sob aumento de 100 vezes, e o número de focos de lesão por célula determinado.

Com base no número de focos observados em núcleos individuais, foi escolhido o seguinte critério de classificação: núcleos sem lesão ($x = 0$); núcleos com até de 5 focos de lesão ($1 \leq x \leq 5$); núcleos com 6 a 10 focos de lesão ($6 \leq x \leq 10$); e núcleos com 11 ou mais focos ($x \geq 11$).

Figura 18 - Esquema representativo do desenho experimental da imuno-histoquímica para detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX)



Fonte: A autora.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos durante a realização do presente trabalho foram submetidos a testes de normalidade. Para os ensaios com DNA plasmidial, o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, apontou que as amostras não deveriam ser analisadas por teste paramétrico. A comparação das amostras foi então realizada através do teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn. Para os ensaios com as células tumorais, o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov mostrou que as amostras eram aptas para serem analisadas por testes paramétricos, sendo então realizados testes ANOVA *one-way* com pós-teste Tukey. Em todos os testes foram consideradas significativas às diferenças para valores de $p < 0,05$. Os experimentos foram repetidos 5 vezes, em triplicata para cada um, com exceção dos ensaios de migração (repetidos 3 vezes, em triplicata) e o ensaio da detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX), com apenas o resultado de um experimento apresentado neste manuscrito. Os testes estatísticos foram executados no software GraphPad Prism 8.4.

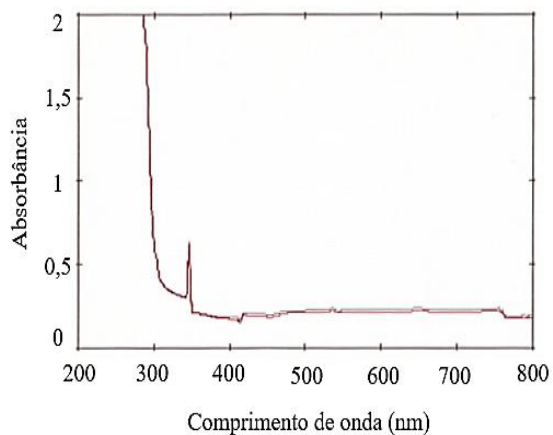
6. RESULTADOS

6.1 Análise espectrofotométrica

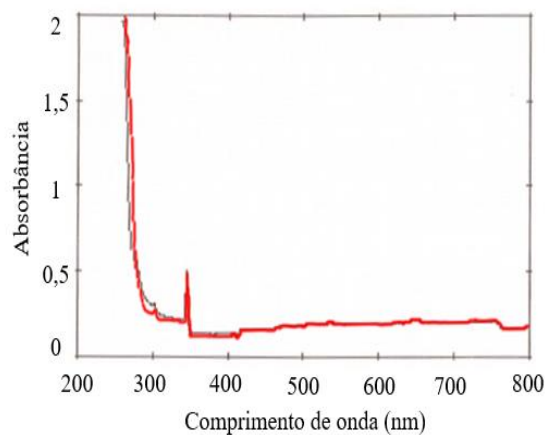
Inicialmente foi realizado um ensaio para verificar se a radiação ionizante poderia modificar o espectro de absorção dos polissulfetos DMS, DDS e DTS. A varredura espectrofotométrica dos polissulfetos indicou que a radiação ionizante não promoveu modificação no padrão de absorção, sugerindo a não ocorrência de alterações estruturais nas moléculas dos agentes utilizados no presente trabalho. Também não houve modificação na absorção das soluções *mix* e de benzoato de sódio expostas à RI (Figura 19).

Figura 19 - Espectro de absorção (200 a 800 nm) dos polissulfetos, *mix* e benzoato de sódio, antes e após exposição à radiação ionizante de 60 Gy

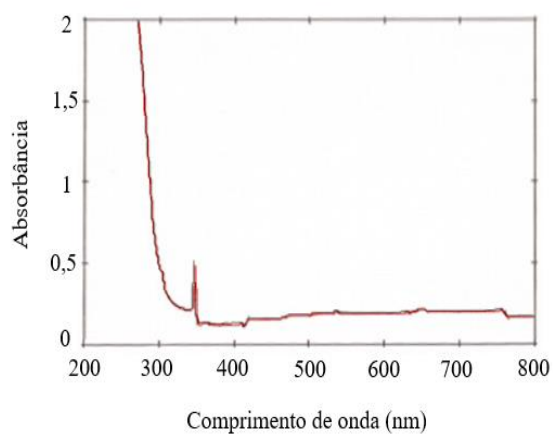
A. Benzoato de sódio (BS)



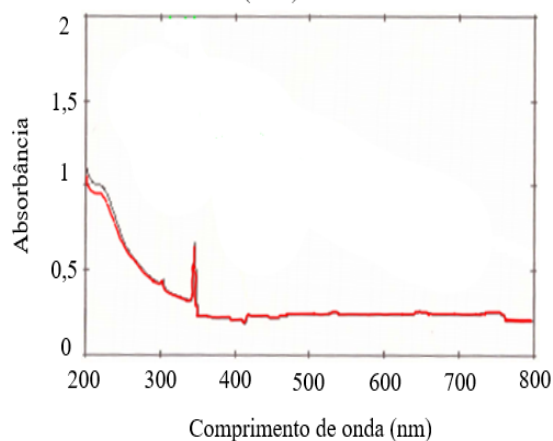
B. Monossulfeto de dibenzila (DMS)



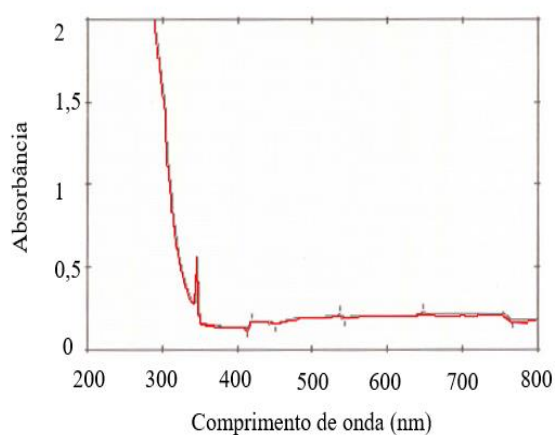
C. Dissulfeto de dibenzila (DDS)



D. Trissulfeto de dibenzila (DTS)



E. MIX



Legenda: **A.** Benzoato de sódio (BS); **B.** Monossulfeto de dibenzila (DMS); **C.** Dissulfeto de dibenzila (DDS); **D.** Trissulfeto de dibenzila (DTS) e **E.** *Mix*. Em preto substância não irradiada e em vermelho substância irradiada com 60 Gy de radiação ionizante.

6.2 Ensaio com DNA plasmidial

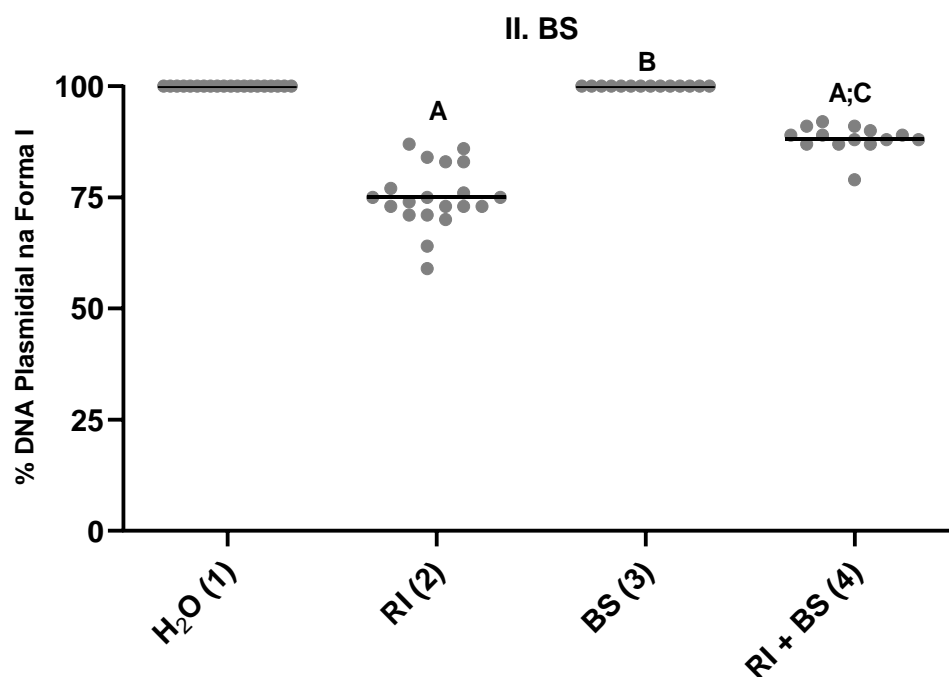
6.2.1 Eletroforese em gel de agarose

Os resultados são mostrados na figura 20, onde na raia 2 (radiação ionizante de 60 Gy) apresentou maior quebra ao DNA plasmidial quando comparado com a raia 1 (H₂O). Na raia 3 (benzoato de sódio), o percentual de DNA plasmidial na forma I apresentou diferença quando comparado com a raia 2 (radiação ionizante de 60 Gy). Entretanto a raia 4, benzoato de sódio em associação com a radiação ionizante promoveu proteção no DNA plasmidial quando comparado com a raia 2 (radiação ionizante de 60 Gy), apresentando diferença estatística significativa quando comparado com as raias 1 (H₂O) e 3 (benzoato de sódio).

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com benzoato de sódio (BS) e exposto à 60 Gy de RI



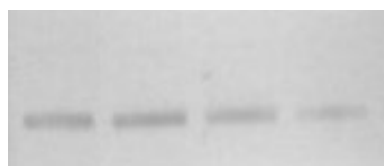
I. (1) (2) (3) (4)



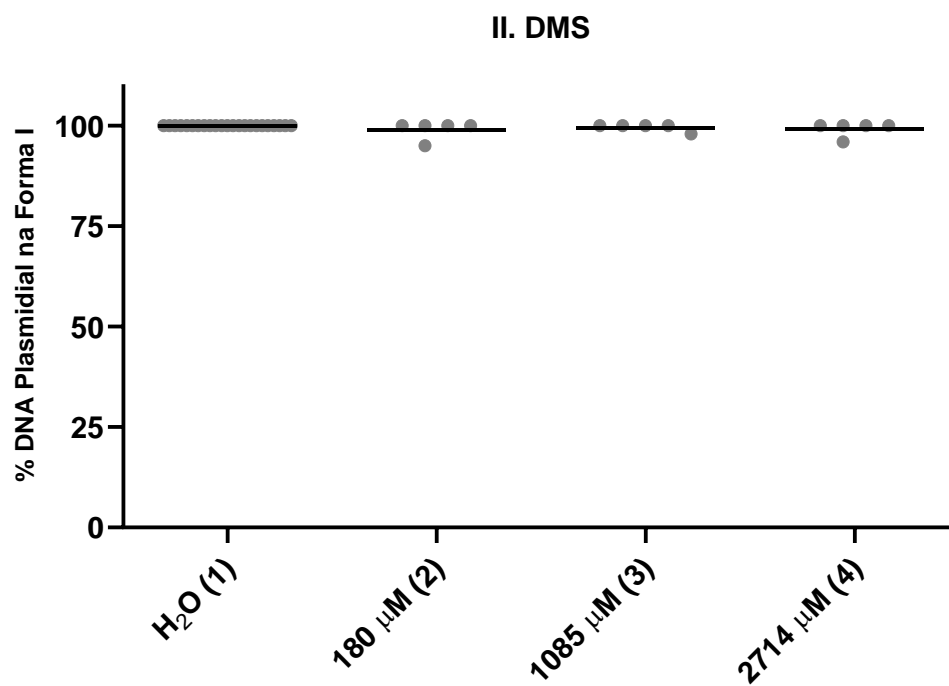
Legenda: (I) Foto da eletroforese em gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) Radiação ionizante de 60 Gy; (3) Benzoato de sódio; (4) Benzoato de sódio em associação com radiação ionizante de 60 Gy. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn). (**BS**) = Benzoato de sódio, 100 mM, (**RI**) = 60 Gy, (**A**) \neq H₂O, (**B**) \neq RI e (**C**) \neq BS.

Em seguida, foi avaliada a potencialidade genotóxica da radiação ionizante associada aos polissulfetos (DMS, DDS, DTS e *mix*), por meio da eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial. As concentrações testadas de DMS (180; 1085 e 2714 μ M) não promoveram lesões do tipo quebra no DNA plasmidial (Figura 21, raias 2, 3 e 4).

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Monossulfeto de dibenzila (DMS)



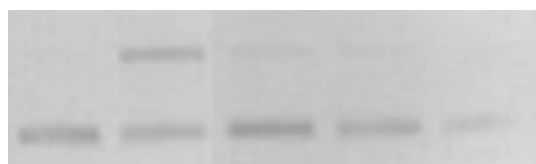
I. (1) (2) (3) (4)



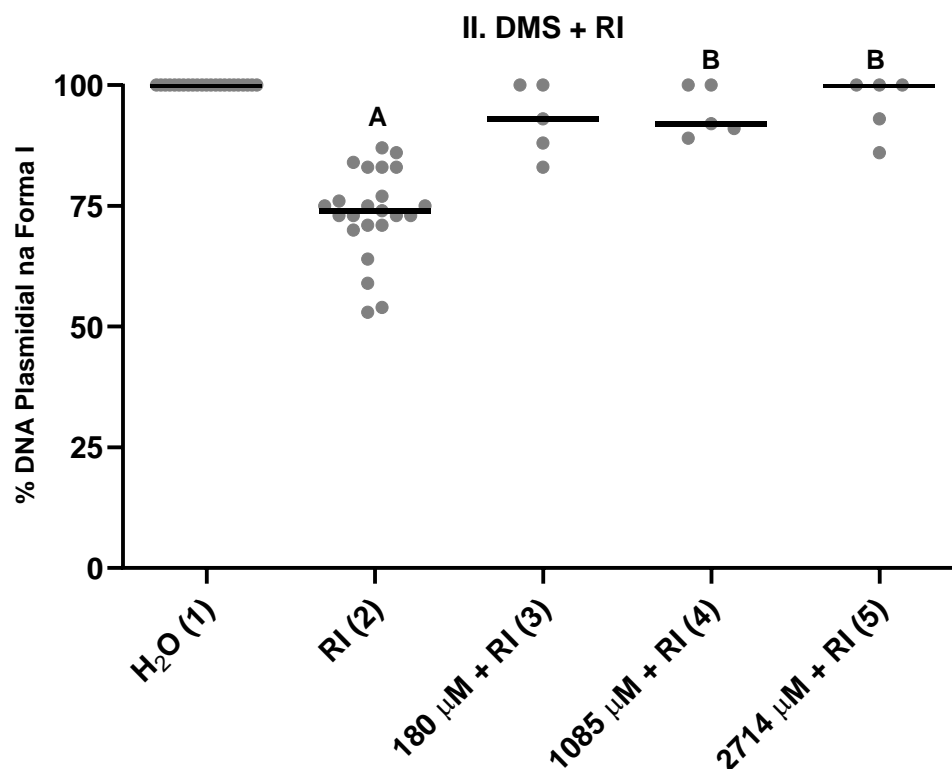
Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) 180 µM de DMS; (3) 1085 µM de DMS; (4) 2714 µM de DMS. (DMS) Monossulfeto de dibenzila. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn).

Em associação com a RI, o DMS apresentou proteção contra quebras no DNA ($p < 0,05$) nas 2 maiores concentrações testadas (Figura 22, raias 4 e 5). Essa proteção não foi observada na concentração de 180µM de DMS, $p > 0,05$ (Figura 22, raia 3).

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Monossulfeto de dibenzila (DMS) em associação à RI



I. (1) (2) (3) (4) (5)



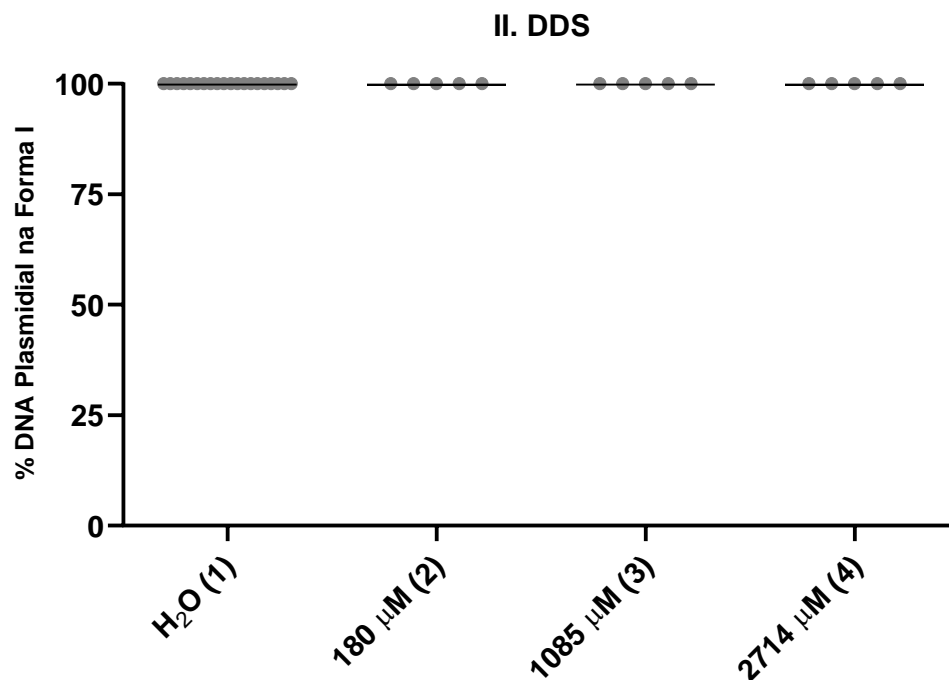
Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) Radiação ionizante (RI) de 60 Gy; (3) 180 µM de DMS + RI; (4) 1085 µM de DMS + RI; (5) 2714 µM de DMS + RI. (DMS) Monossulfeto de dibenzila. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn). (RI) = 60 Gy, (A) \neq H₂O e (B) \neq RI.

A figura 23 mostra que o DDS isolado (180; 1085 e 2714 µM) não promoveu quebras no DNA plasmidial.

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Dissulfeto de dibenzila (DDS)



I. (1) (2) (3) (4)



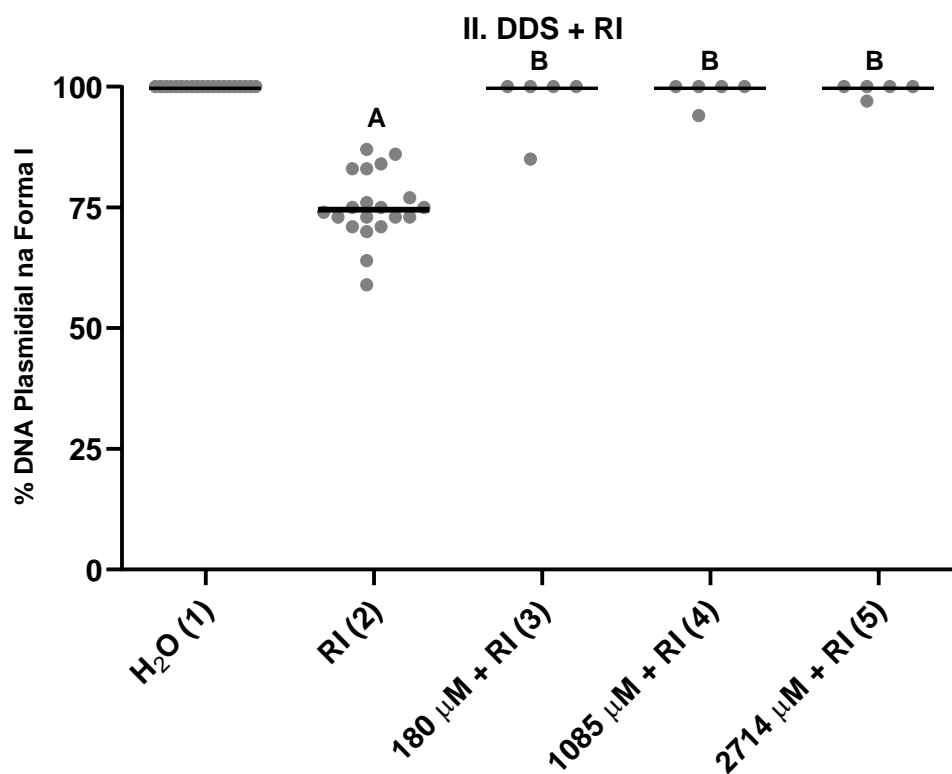
Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) 180 μM de DDS; (3) 1085 μM de DDS; (4) 2714 μM de DDS. (DDS) Dissulfeto de dibenzila. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn).

Quando o DDS foi associado com a radiação ionizante de 60 Gy, observou-se que esse polissulfeto foi capaz de proteger o DNA dos efeitos da radiação, em todas as concentrações testadas (Figura 24).

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Dissulfeto de dibenzila (DDS) associado à radiação ionizante 60 Gy



I. (1) (2) (3) (4) (5)



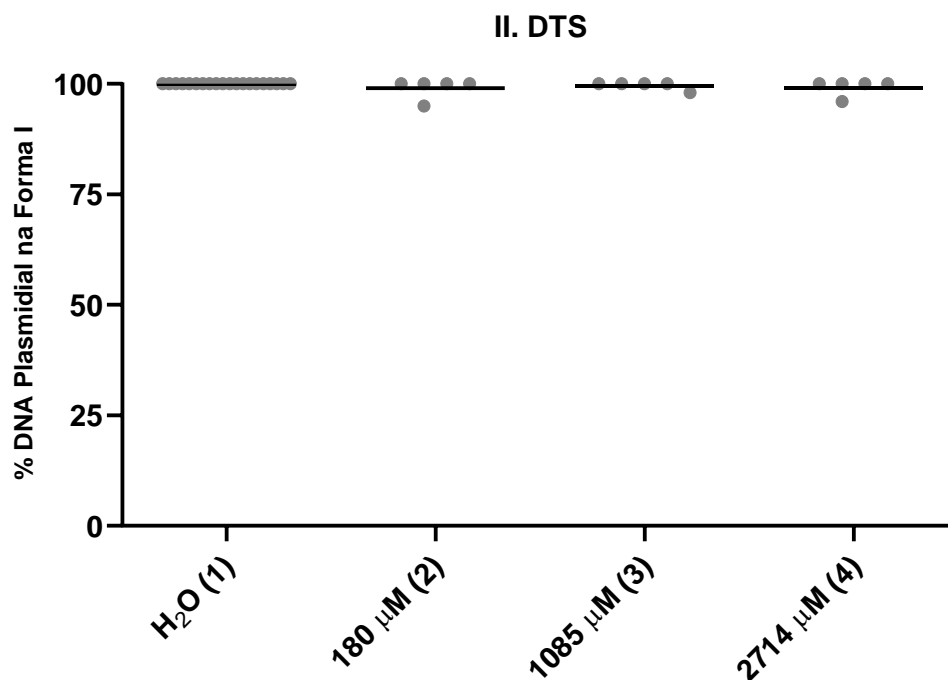
Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) Radiação ionizante de 60 Gy; (3) 180µM de DDS + 60 Gy; (4) 1085 µM de DDS + 60 Gy; (5) 2714 µM de DDS + 60 Gy. (DDS) Dissulfeto de dibenzila. 60 Gy = dose absorvida de 60 Gy. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - Kruskal- Wallis com pós-teste Dunn). (RI) = 60 Gy, (A) \neq H₂O e (B) \neq RI.

O DTS, terceiro polissulfeto testado isoladamente (180; 1085 e 2714 µM), também não promoveu quebras na molécula de DNA (Figura 25, raias 3, 4 e 5).

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Trissulfeto de dibenzila (DTS)



I. (1) (2) (3) (4)



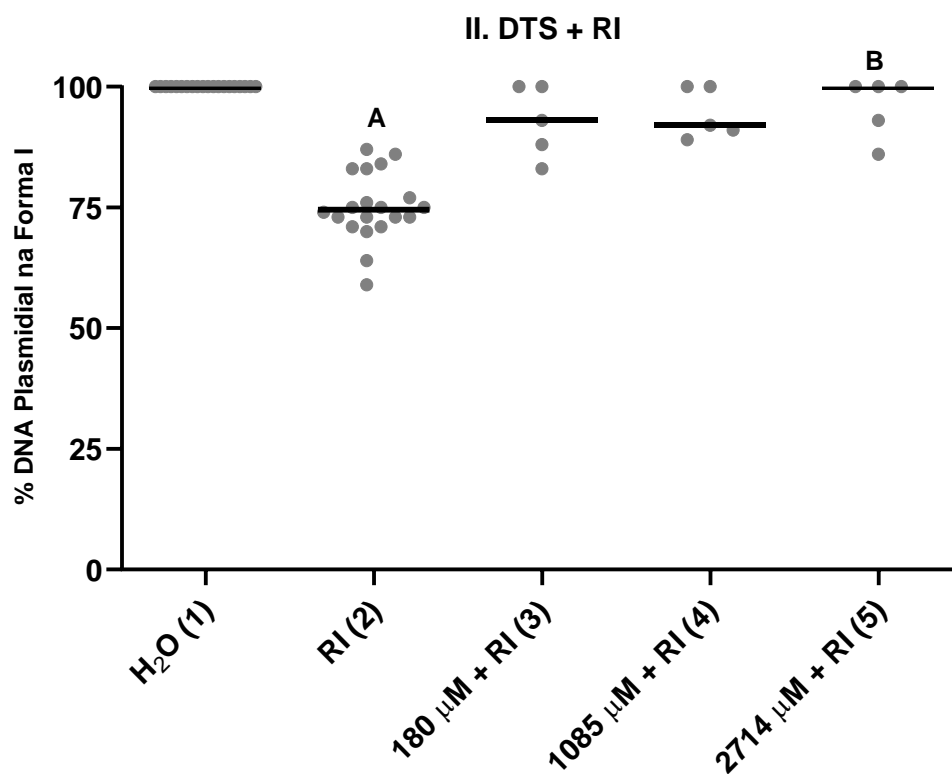
Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) 180 µM de DTS; (3) 1085 µM de DTS; (4) 2714 µM de DTS. (DTS) Trissulfeto de dibenzila. 60 Gy = radiação ionizante com a dose de 60 Gy. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn).

Quando o DTS foi associado à radiação, apenas a maior concentração testada (2714 µM) foi capaz de impedir a formação de quebras no DNA, quando comparada ao efeito da radiação isoladamente (Figura 26, raias 2 e 5 - $p < 0,05$).

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com Trissulfeto de dibenzila (DTS) associado à radiação ionizante 60 Gy



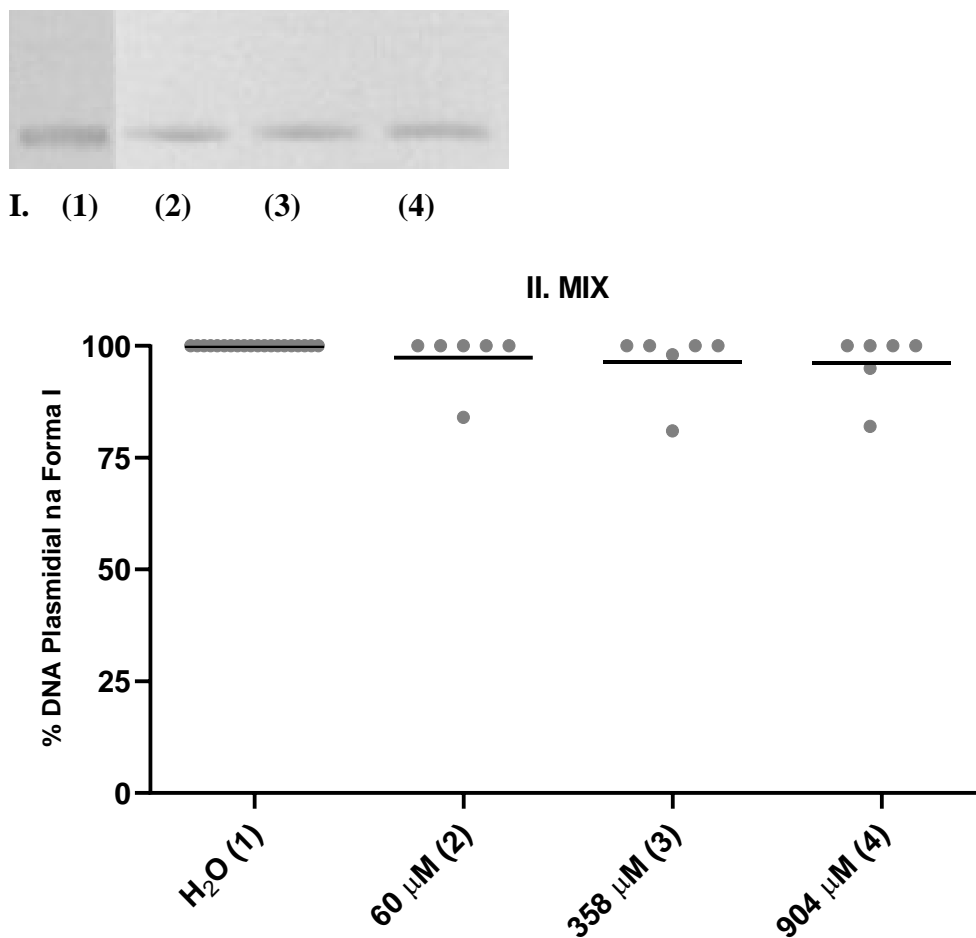
I. (1) (2) (3) (4) (5)



Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) Radiação ionizante de 60 Gy; (3) 180 µM de DTS + 60 Gy; (4) 1085 µM de DTS + 60 Gy; (5) 2714 µM de DTS + 60 Gy. (DTS) Trissulfeto de dibenzila. 60 Gy = dose absorvida de 60 Gy. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn). (**RI**) = 60 Gy, (**A**) \neq H₂O e (**B**) \neq RI.

Na figura 27 observa-se que a mistura dos três polissulfetos (DMS, DDS e DTS), solução *mix*, nas concentrações de 60; 358 e 904 µg/mL também não promoveu a formação de lesões do tipo quebra no DNA plasmidial ($p > 0,05$).

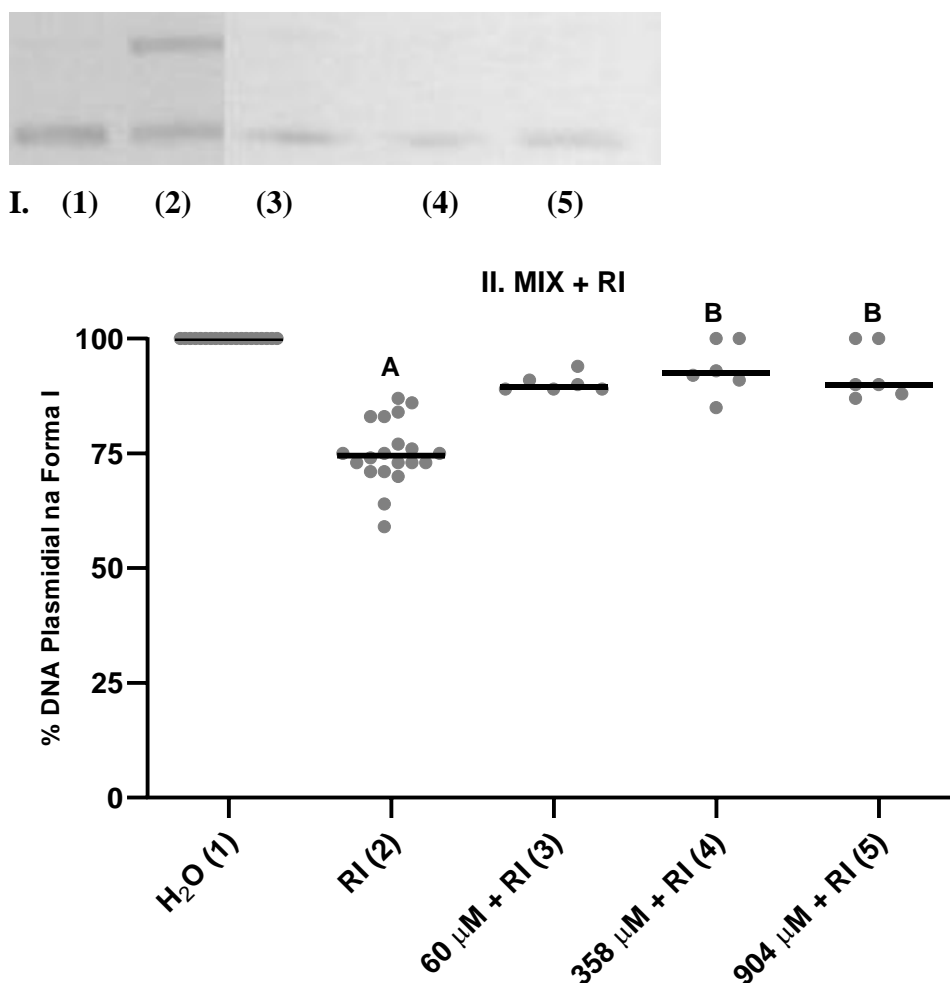
Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com a solução de *mix* de polissulfetos



Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) 60 μM de *mix*; (3) 358 μM de *mix*; (4) 904 μM de *mix*. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn).

Na figura 28 pode-se verificar que quando a solução *mix* de polissulfetos foi associada com a radiação ionizante de 60 Gy houve proteção apenas nas maiores concentrações (358 e 904 μM (raias 4 e 5), quando comparado com a raia 2 (radiação ionizante de 60 Gy, $p < 0,05$).

Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com a solução de *mix* de polissulfetos associado à radiação ionizante 60 Gy



Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) Radiação ionizante de 60 Gy; (3) 60 μM de *mix* + 60 Gy; (4) 358 μM de *mix* + 60 Gy; (5) 904 μM de *mix* + 60 Gy. 60 Gy = dose absorvida de 60 Gy. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn). (RI) = 60 Gy, (A) \neq H₂O e (B) \neq RI.

Com o objetivo de verificar a existência de lesões produzidas pela radiação ionizante em bases nitrogenadas, mas que não resultem em quebras diretamente, a enzima Endo VIII foi aplicada às amostras de DNA após a radiação ionizante de 60 Gy. Com esse recurso metodológico haverá maior número de quebras na amostra irradiada e incubada com a enzima de reparo, caso a RI também gere danos que sejam sítio de atuação da Endo VIII. Na figura 29 é possível observar que a porcentagem de quebras produzidas por 60 Gy de RI (raia 2) é estatisticamente diferente em comparação com o controle (raia 1). Na raia 4 (RI + Endo VIII) houve mais quebras no DNA plasmidial em comparação com as raias 1 e 2, apresentando diferença estatisticamente significativa. A incubação de DNA plasmidial apenas com a enzima Endo VIII (raia 3) mostrou uma

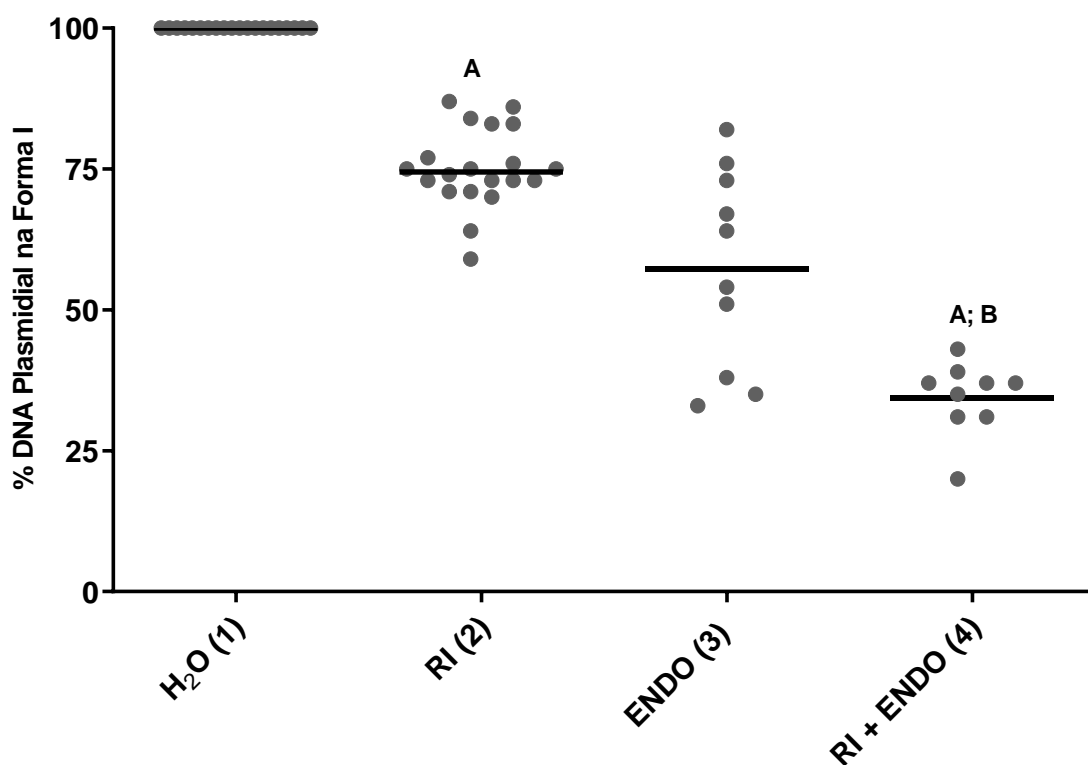
variação importante entre os experimentos e por isso não apresentou diferença estatisticamente significativa com as demais raias.

Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com enzima Endonuclease VIII e exposto à radiação ionizante



I. (1) (2) (3) (4)

II. RI + ENDO

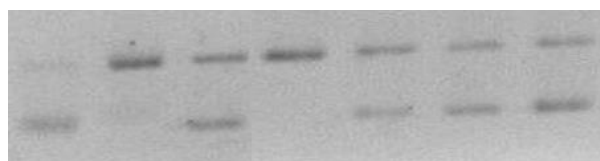


Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) 60 Gy; (3) Endo VIII; (4) Endo VIII + 60 Gy. (Endo VIII) Enzima Endonuclease VIII. 60 Gy = dose absorvida 60 Gy. ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn). (A) comparando com H₂O. (B) comparando com 60 Gy.

A enzima Endo VIII também foi aplicada às amostras de DNA após a radiação ionizante de 60 Gy, associado ou não ao *mix* de polissulfetos. Os resultados desse grupo de experimentos estão apresentados na figura 30, onde é possível observar que na raia 4 (Endo VIII + 60 Gy) houve uma maior quebra no DNA plasmidial ($p < 0,05$) quando comparada com a raia 1 (H₂O). Entretanto, a raia 3 (Endo VIII) mostra que também

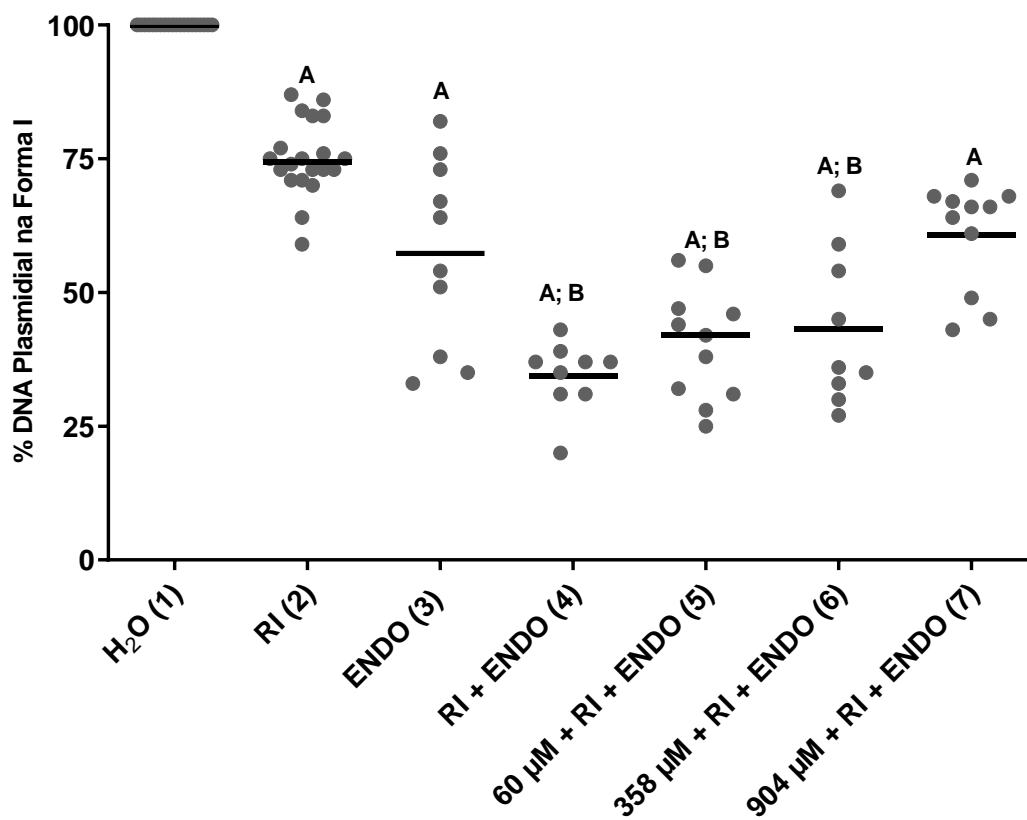
ocorreu uma variação experimental grande, apresentando diferença significativa apenas na comparação com a raia 2 (RI). A porcentagem de quebras no DNA plasmidial produzidas pela associação do *mix* de polissulfetos com a radiação ionizante de 60 Gy e incubados com a Endo VIII, foi maior quando comparada com a raia 2 (Radiação ionizante de 60 Gy). A raia 4 (Endo VIII associado a 60 Gy) e 5 (60 μ M, associados a radiação ionizante de 60 Gy com a Endo VIII) apresentaram um maior número de lesões do tipo quebra ao DNA plasmidial quando comparada com a raia 3 (Endo VIII). A solução *mix*, na maior dose (904 μ M) e em associação a radiação ionizante de 60 Gy e com a Endo VIII conferiu proteção ao DNA plasmidial (raia 7, $p < 0,05$).

Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1 incubado com enzima Endonuclease VIII associado com o *mix* e à radiação ionizante 60 Gy



I. (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7)

II. MIX + RI + ENDO



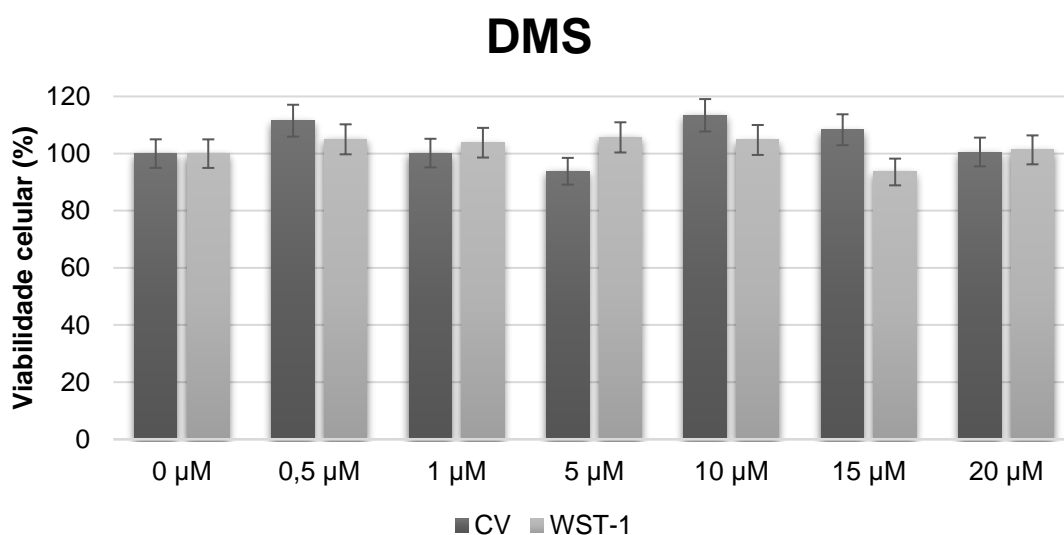
Legenda: (I) Gel de agarose 0,8% e (II) gráfico qualitativo, análise densitométrica com porcentagem de DNA plasmidial na Forma I (Superhelicoidizada) (pUC 9.1) (200 ng). Raias: (1) H₂O; (2) Radiação ionizante de 60 Gy; (3) Endo VIII; (4) Endo VIII + 60 Gy. (5) 60 µM Endo VIII + 60 Gy; (6) 358 µM Endo VIII + 60 Gy; (7) 904 µM Endo VIII + 60 Gy (Endo VIII) Enzima Endonuclease VIII. 60 Gy = dose absorvida de 60 Gy. Os resultados expressam a porcentagem de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn). (**mix**) = mistura com os polisulfetos, DMS, DDS e DTS; (**ENDO**) = enzima endonuclease VIII; (**RI**) = 60 Gy; (**A**) \neq H₂O e (**B**) \neq RI.

6.3 Ensaios com cultura celular utilizando a linhagem tumoral MCF-7

6.3.1 Ensaios de viabilidade celular

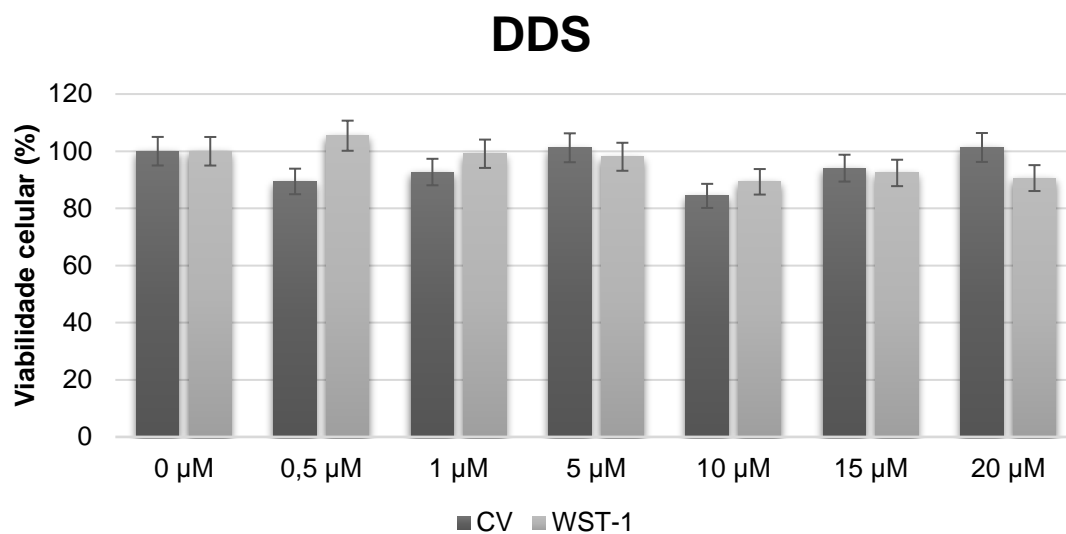
Foram utilizadas duas metodologias para a avaliação da viabilidade celular. As figuras 31 e 32 apresentam a viabilidade das células MCF-7 incubadas com DMS e DDS, respectivamente, utilizando a metodologia do Cristal Violeta e WST-1. Nas concentrações testadas não foi possível observar morte celular e não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as duas técnicas utilizadas.

Figura 31 - Viabilidade por Cristal Violeta e WST-1 de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DMS



Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com diferentes concentrações do DMS. CV = Cristal Violeta. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey).

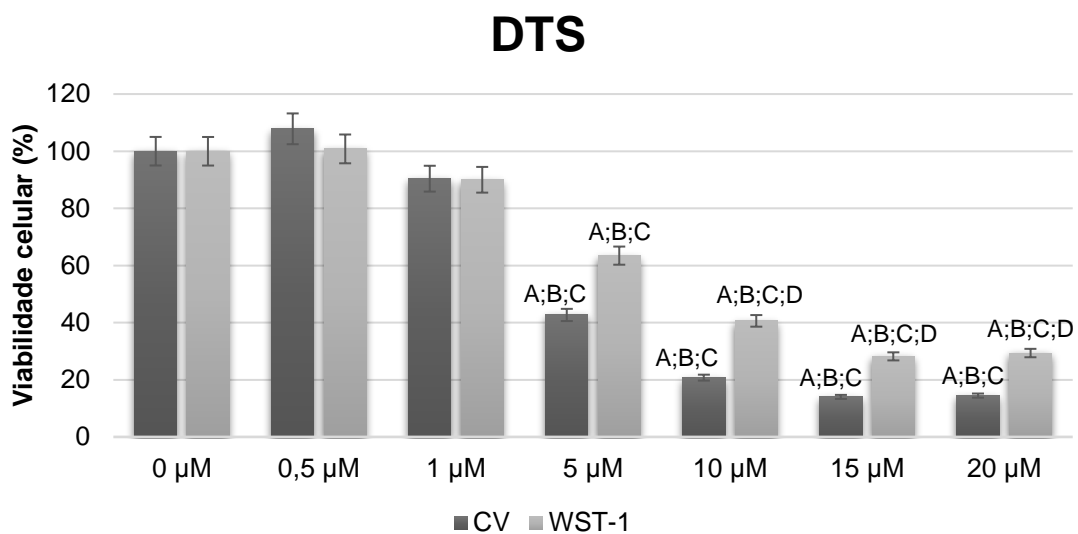
Figura 32 - Viabilidade por Cristal Violeta e WST-1 de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DDS



Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com diferentes concentrações do DDS. CV = Cristal Violeta. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey).

Na figura 33, que mostra a viabilidade dessa mesma linhagem frente ao DTS, é possível observar que a morte celular é dose dependente e que as duas metodologias se mostraram igualmente eficazes para essa análise. O ensaio com o corante Cristal Violeta pareceu ser mais sensível em comparação com a análise de viabilidade pelo WST-1.

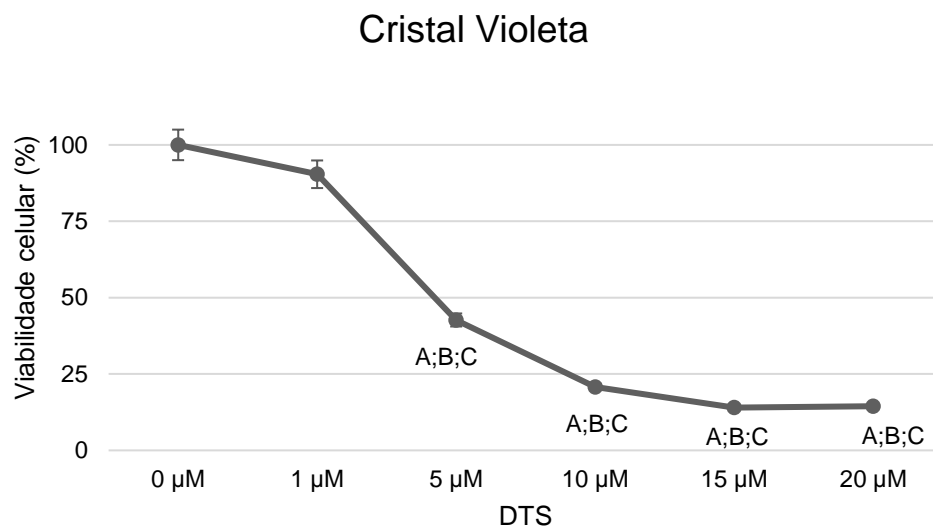
Figura 33 - Viabilidade por Cristal Violeta (CV) e WST-1 de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS



Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com diferentes concentrações do DTS. CV = Cristal Violeta. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey). (A) \neq controle, (B) \neq 0,5 μ M, (C) \neq 1 μ M e (D) \neq 5 μ M.

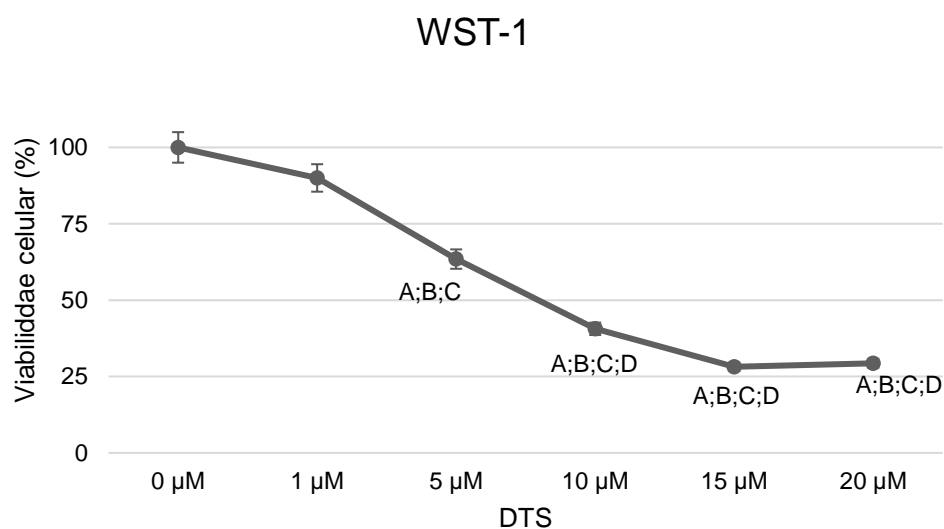
As figuras 34 e 35 apresentam a viabilidade de células incubadas com DTS, determinadas pelas duas metodologias, sendo que o Cristal Violeta apresentou uma maior sensibilidade do que o WST-1.

Figura 34 - Viabilidade pelo Cristal Violeta em células mamárias tumorais MCF-7 incubadas com DTS



Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com diferentes concentrações do DTS. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey). (A) $\neq 0 \mu\text{M}$, (B) $\neq 0,5 \mu\text{M}$ e (C) $\neq 1 \mu\text{M}$.

Figura 35 - Viabilidade pelo WST-1 em células mamárias tumorais MCF-7 incubadas com DTS

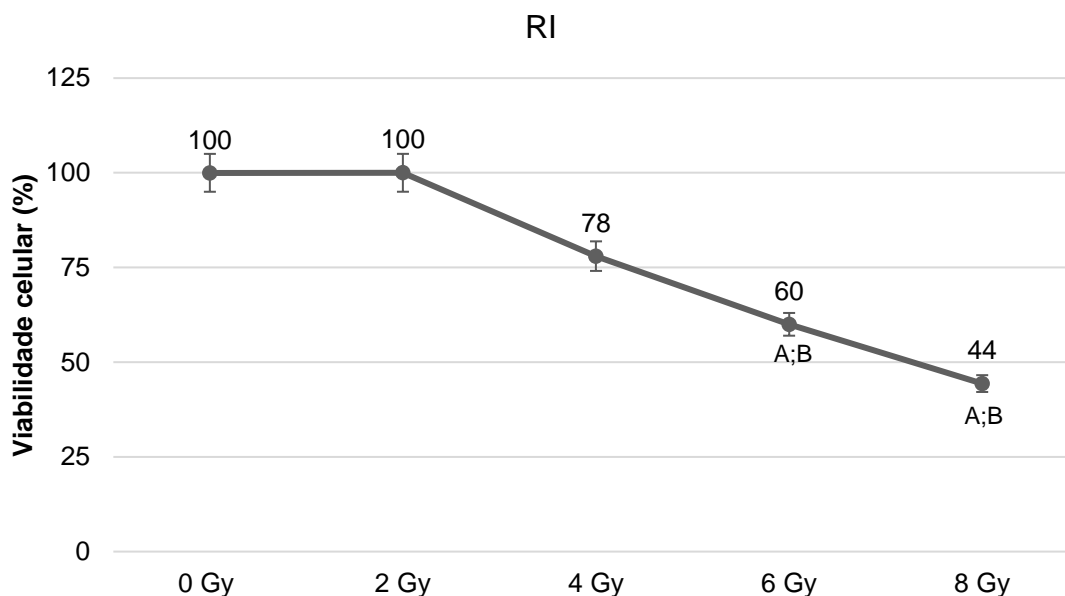


Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com diferentes concentrações do DTS. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey). (A) $\neq 0 \mu\text{M}$, (B) $\neq 0,5 \mu\text{M}$, (C) $\neq 1 \mu\text{M}$, (D) $\neq 5 \mu\text{M}$.

Definiu-se utilizar para os próximos ensaios de viabilidade a metodologia pelo Cristal Violeta. Iniciou-se os ensaios com RI, realizando uma curva com dose-resposta

(Figura 36), que apresenta diferença estatística significativa nos pontos 6 e 8 Gy, quando comparada com 0 e 2 Gy.

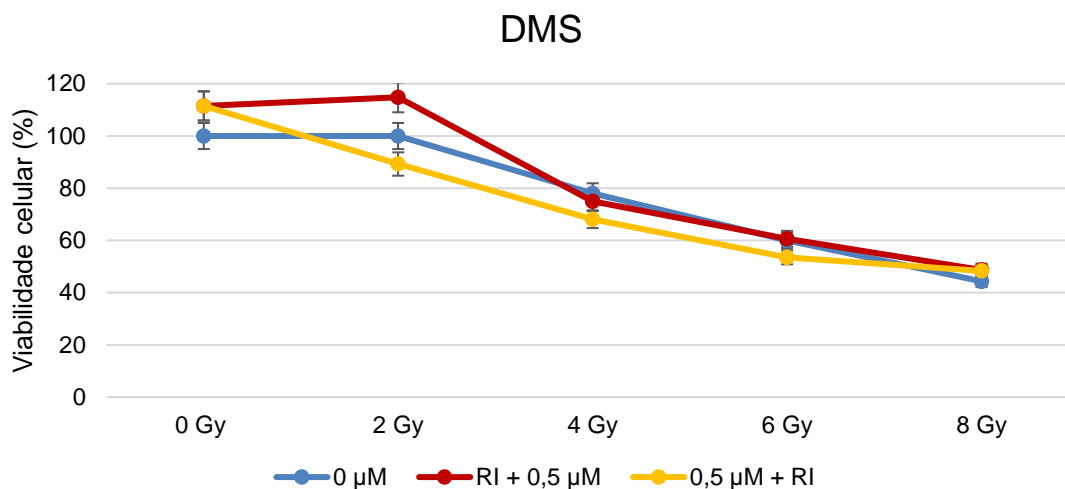
Figura 36 - Curva dose-resposta para RI com células mamárias tumorais MCF-7



Legenda: Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7, avaliação realizada após 72 horas com diferentes taxa de dose da RI. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey). (RI) = radiação ionizante, (A) \neq 0 Gy e (B) \neq 2 Gy.

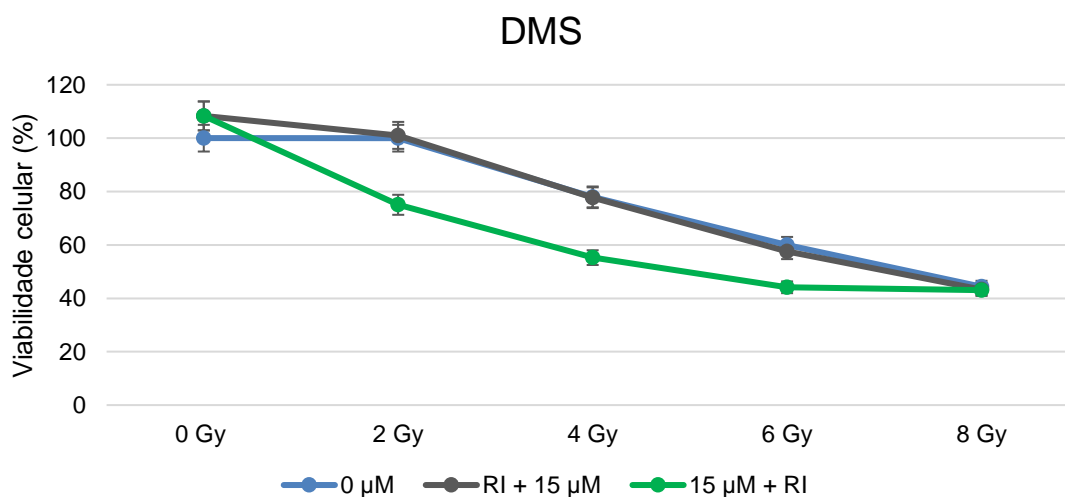
Para os ensaios de viabilidade celular com os polissulfetos em associação com a RI, foram escolhidas apenas duas concentrações. Baseando-se na curva de viabilidade do DTS (Figura 34) foram selecionadas uma concentração que mostrou viabilidade próxima ao controle (0 μ M + 0 Gy) e uma que apresentou mais morte; 0,5 e 15 μ M, respectivamente. Nas figuras 37 e 38, o DMS de 0,5 e 15 μ M não conferiram proteção e nem potencializaram os efeitos da RI.

Figura 37 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DMS (0,5 μ M) em associação com RI



Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com DMS de 0,5 μ M. (RI) = radiação ionizante; (RI + 0,5 μ M) = 30 minutos após a RI foi adicionado o DMS; (0,5 μ M + RI) = RI após 2 horas da adição do DMS. Controle = 0 μ M + 0 Gy. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey), após 72 horas de incubação com DMS de 0,5 μ M. Comparação entre as doses de RI.

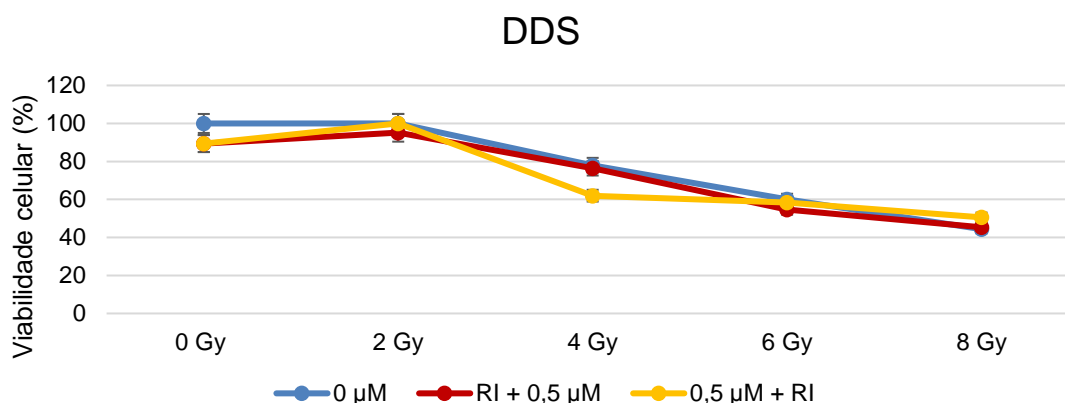
Figura 38 - Viabilidade por Cristal Violeta e células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DMS (15 μ M) em associação com RI



Legenda: Avaliação realizada (RI) = radiação ionizante; (RI + 15 μ M) = 30 minutos após a RI foi adicionado o DMS; (15 μ M + RI) = RI após 2 horas da adição do DMS. Controle = 0 μ M + 0 Gy. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey), após 72 horas de incubação com DMS de 15 μ M. Comparação entre as doses de RI.

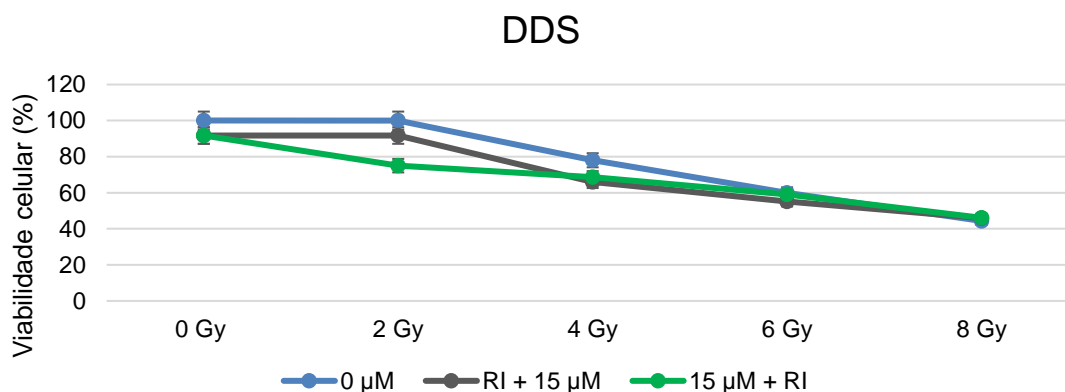
Nas figuras 39 e 40, DDS de 0,5 e 15 μM , respectivamente, não conferiu proteção e nem potencializou os efeitos da RI.

Figura 39 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DDS (0,5 μM) em associação com RI



Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com DDS de 0,5 μM . (**RI**) = radiação ionizante; (**RI + 0,5 μM**) = 30 minutos após a RI foi adicionado o DDS; (**0,5 μM + RI**) = RI após 2 horas da adição do DDS. Controle = 0 μM + 0 Gy. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey), após 72 horas de incubação com DDS de 0,5 μM . Comparação entre as doses de RI.

Figura 40 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DDS (15 μM) em associação com RI



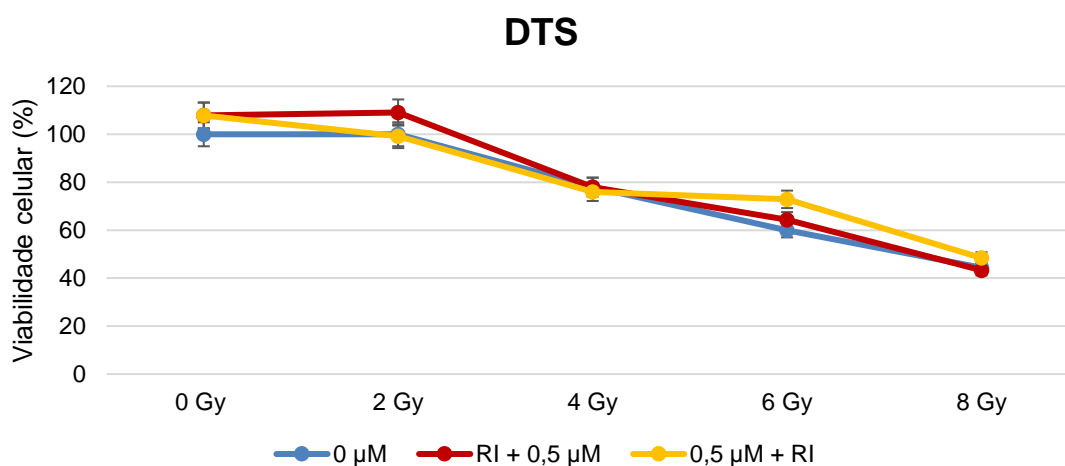
Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com DDS de 15 μM . (**RI**) = radiação ionizante; (**RI + 15 μM**) = 30 minutos após a RI foi adicionado o DMS; (**15 μM + RI = RI**) após 2 horas da adição do DDS. Controle = 0 μM + 0 Gy. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey), após 72 horas de incubação com DDS de 15 μM . Comparação entre as doses de RI.

As concentrações de DTS de 0,5 e 15 μM (figuras 41 e 42), não conferiram proteção e nem potencializaram os efeitos da RI, apresentando diferença estatística significativa apenas na concentração de 15 μM em 0 Gy quando comparado com 0 μM ,

também em 2 Gy irradiado depois (15 μM + 2 Gy) quando comparado com 0 μM (figura 42).

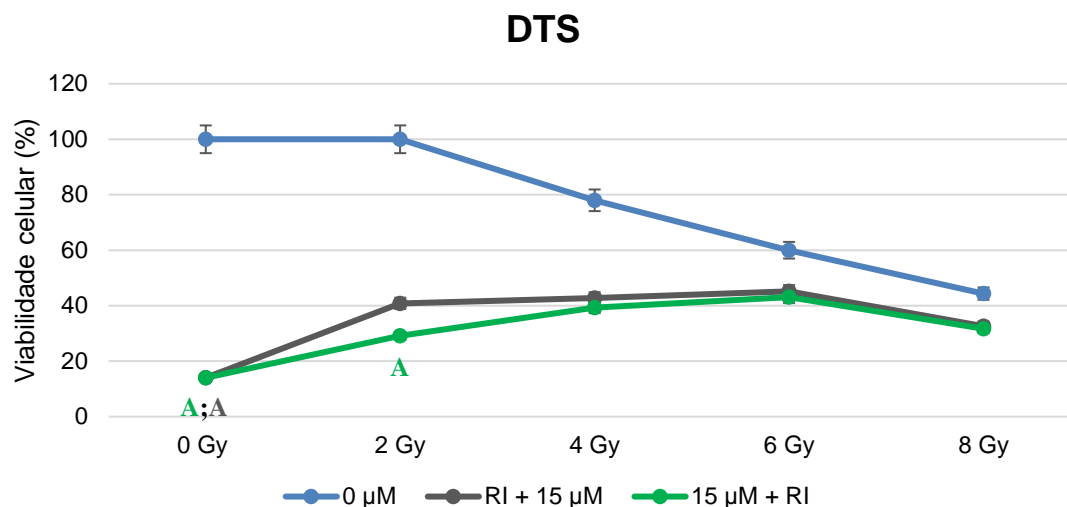
Para avaliar a radiosensibilidade das células, o DTS foi administrado 2 horas antes da RI e 30 minutos depois da RI. Só foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de 15 μM de DTS (figura 41) quando acrescentado à cultura antes da RI de 2 Gy, em relação ao controle sem DTS.

Figura 41 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS (0,5 μM) em associação com RI



Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com DTS de 0,5 μM . (**RI**) = radiação ionizante; (**RI + 0,5 μM**) = 30 minutos após a RI foi adicionado o DTS; (**0,5 μM + RI**) = RI após 2 horas da adição do DTS. Controle = 0 μM + 0 Gy. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey), após 72 horas de incubação com DTS de 0,5 μM . Comparação entre as doses de RI.

Figura 42 - Viabilidade por Cristal Violeta de células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS (15 μ M) em associação com RI

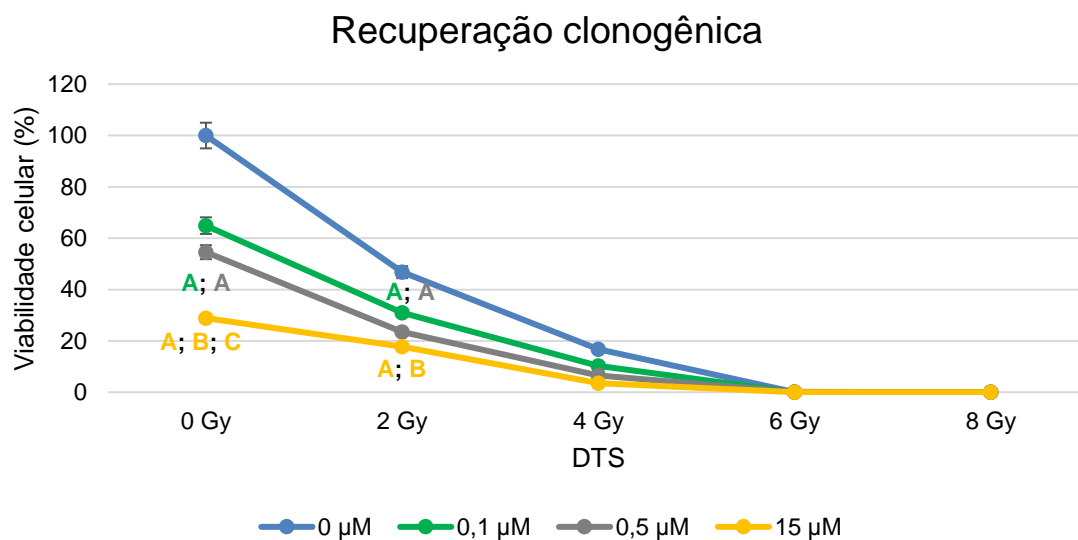


Legenda: Avaliação realizada após 72 horas de incubação com DTS de 15 μ M. (**RI**) = radiação ionizante; (**RI + 15 μ M**) = 30 minutos após a RI foi adicionado o DTS; (**15 μ M + RI**) = RI após 2 horas da adição do DTS. Controle = 0 μ M + 0 Gy. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey), após 72 horas de incubação com DTS de 15 μ M. Comparação entre as doses de RI. (A) \neq 0 μ M.

6.3.2 Ensaio de recuperação clonogênica

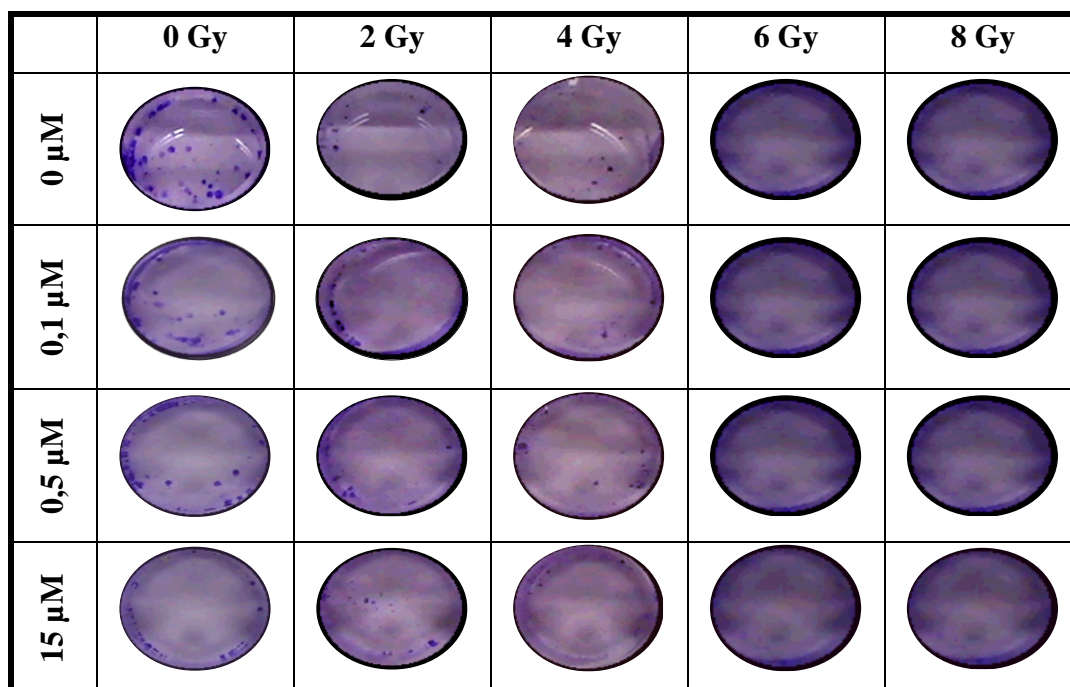
Posteriormente, realizou-se o ensaio da recuperação clonogênica, cujos resultados estão apresentados na figura 43. Observa-se uma curva dose-resposta em relação às doses do DTS e da RI. Na figura 44 estão fotos representativas dos poços do ensaio. Para o ponto sem RI todas as concentrações testadas (0,1; 0,5 e 15 μ M) foram diferentes, estatisticamente, do 0 Gy, e a concentração de 15 μ M foi diferente quando comparada com 0,1 e 0,5 μ M. Na associação ao DTS com 2 Gy todas as concentrações testadas (0,1; 0,5 e 15 μ M) foram diferentes da dose de 2 Gy. A concentração de 15 μ M apresentou diferença com 0,5 μ M em associação com 2 Gy. Na associação do DTS com a RI, observou-se uma potencialização do efeito.

Figura 43 - Ensaio de recuperação clonogênica com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com DTS e expostas à radiação ionizante



Legenda: Avaliação realizada da seguinte forma, o DTS foi adicionado 2 h antes da RI, DTS permaneceu por 72 h e no total as células foram incubadas por 10 dias. Comparação com a mesma dose de RI. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de cinco experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey). (A) \neq 0 μ M; (B) \neq 0,1 μ M e (C) \neq 0,5 μ M.

Figura 44 - Ensaio de recuperação clonogênica com células mamárias tumorais MCF-7 em associação a RI com diferentes concentrações de DTS



Fonte: A autora.

6.3.3 Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay*

Com o objetivo de verificar se a RI, o DTS e a associação dos dois agentes poderia modificar a capacidade de migração das células tumorais, foi realizado o teste de lesão em monocamada (*Scratch assay*). Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 45 a 48 e fotos representativas dos experimentos estão nas figuras 49, 50 e 51.

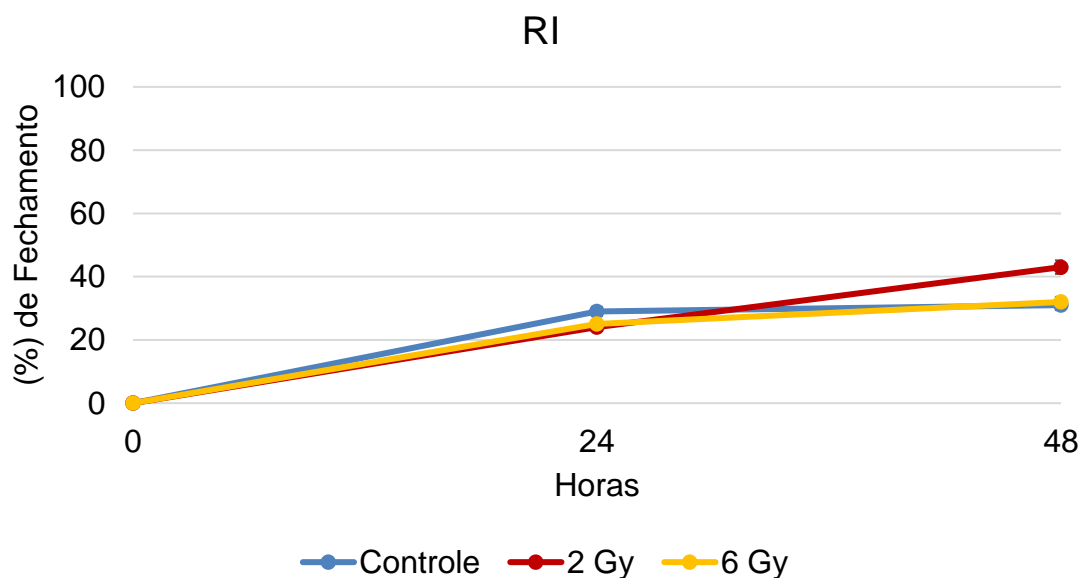
Na figura 45 a RI não inibiu e nem estimulou a migração das células, não apresentando diferença estatística quando comparando com a mesma hora ($p > 0,05$). Já na figura 46 o DTS de 0,5 μM quando associado a RI apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado em 24 horas 6 Gy com 2 Gy e em 48 horas 0 e 6 Gy quando comparada com o controle.

Na figura 47 o DTS de 5 μM quando associado a RI não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparado com a mesma hora. Entretanto, na figura 48 o DTS de 15 μM quando associado a RI apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado em 24 horas 0, 2 e 6 Gy com o controle, inibindo a migração celular.

De um modo geral, a RI (Figura 45) e o DTS de 5 μM em associação a RI (Figura 47) não interferiram na migração celular. O DTS de 0,5 μM em associação a RI (Figura 46) observa-se em 48 horas um aumento da migração celular. No entanto, na concentração de 15 μM associado a RI (Figura 48) parece que o DTS impediu a migração celular.

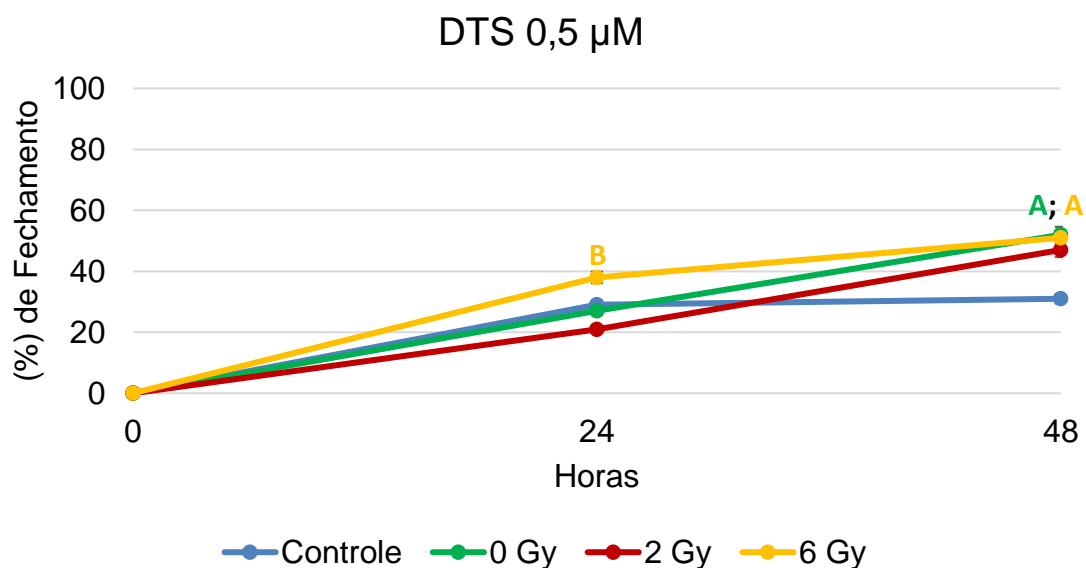
Nas figuras 49, 50 e 51 estão esquematizadas fotos do teste de lesão em monocamada - *Scratch assay*. Cada figura representa uma dose 0, 2 e 6 Gy de RI, figuras 49, 50 e 51, respectivamente.

Figura 45 - Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay* com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI (2 e 6 Gy) por 0, 24 ou 48 horas



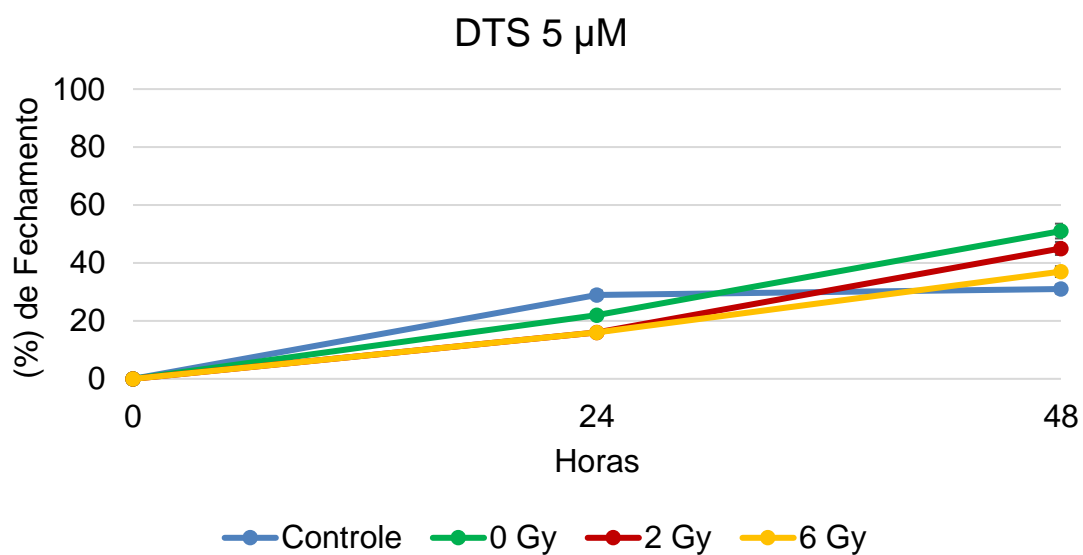
Legenda: Avaliação realizada após 0, 24 e 48 horas da RI. Comparação com a mesma hora. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de três experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey).

Figura 46 - Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay* com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI (0, 2 e 6 Gy), utilizadas em associação ao DTS (0,5 μ M) por 0, 24 ou 48 horas



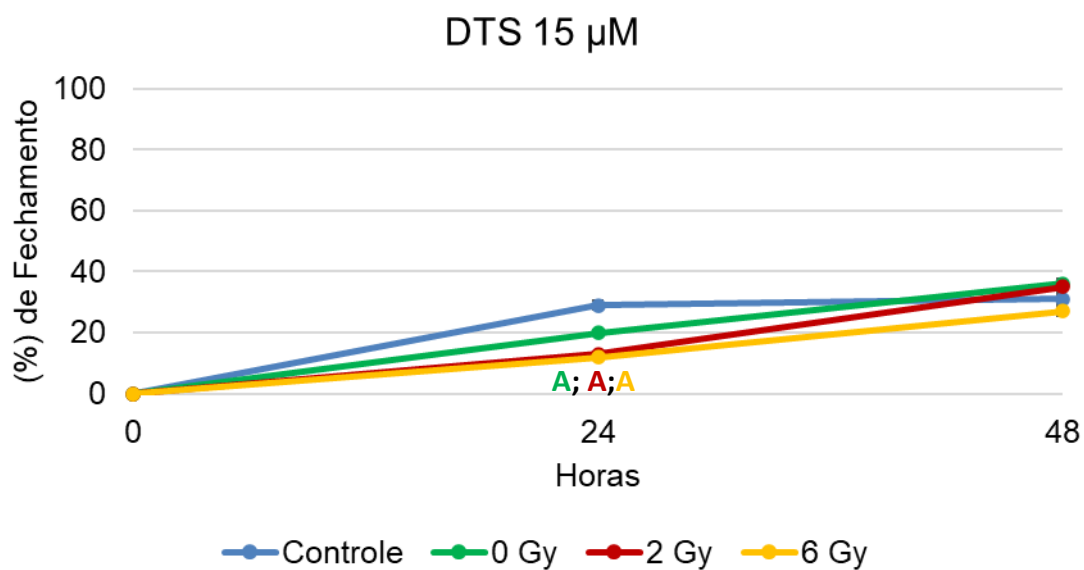
Legenda: Avaliação realizada após 0, 24 e 48 horas da RI em associação com o DTS (0,5 μ M). Comparação com a mesma hora. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de três experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey). (A) \neq controle. (B) \neq 2 Gy.

Figura 47 - Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay* com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI (0, 2 e 6 Gy) utilizada em associação ao DTS (5 μ M) por 0, 24 ou 48 horas



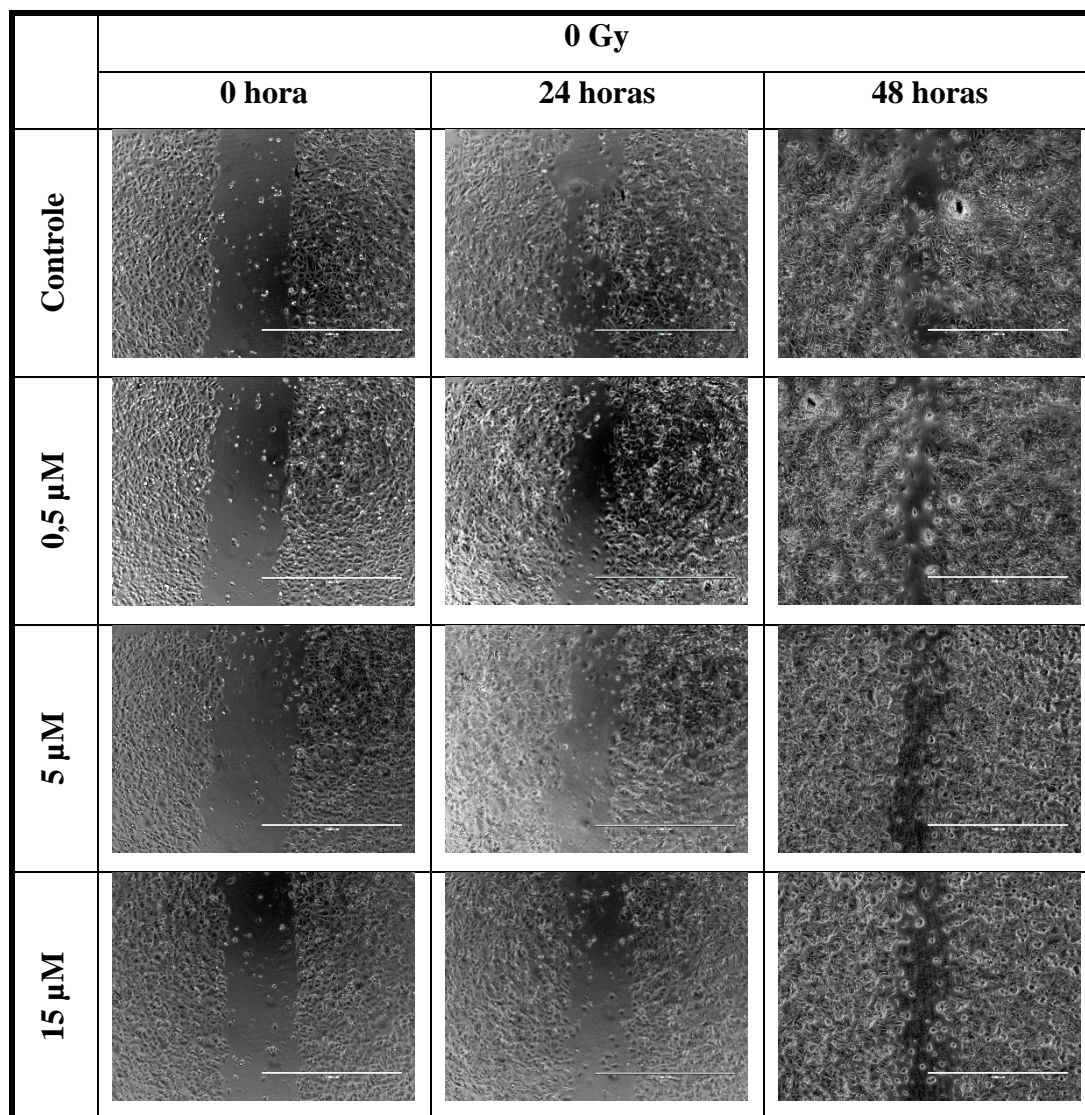
Legenda: Avaliação realizada após 0, 24 e 48 horas da RI em associação com o DTS (5 μ M). Comparação com a mesma hora. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de três experimentos, com triplicatas ($p > 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey).

Figura 48 - Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay* com células mamárias tumorais MCF-7, tratadas com diferentes doses de RI utilizada em associação ao DTS (15 μ M)



Legenda: Avaliação realizada após 0, 24 e 48 horas da RI em associação com o DTS (15 μ M). Comparação com a mesma hora. Os resultados expressam a porcentagem \pm desvio padrão de três experimentos, com triplicatas ($p < 0,05$ - One-way ANOVA pós-teste Tukey). (A) \neq Controle

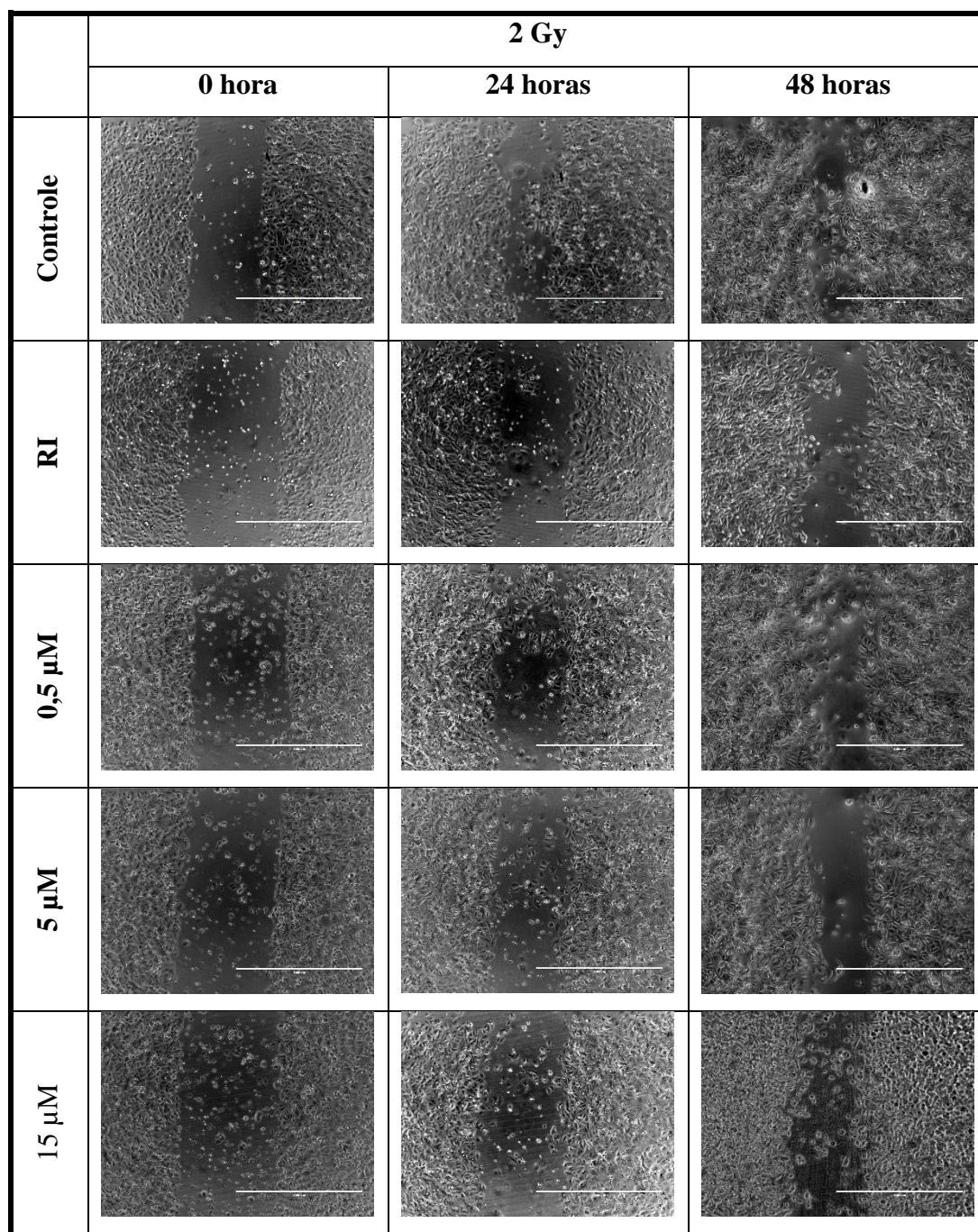
Figura 49 - Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay* com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas por 0 Gy com diferentes concentrações do DTS 0,5; 5 e 15 μM



Legenda: fotos obtidas no microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000), no aumento de 40X.

Fonte: A autora

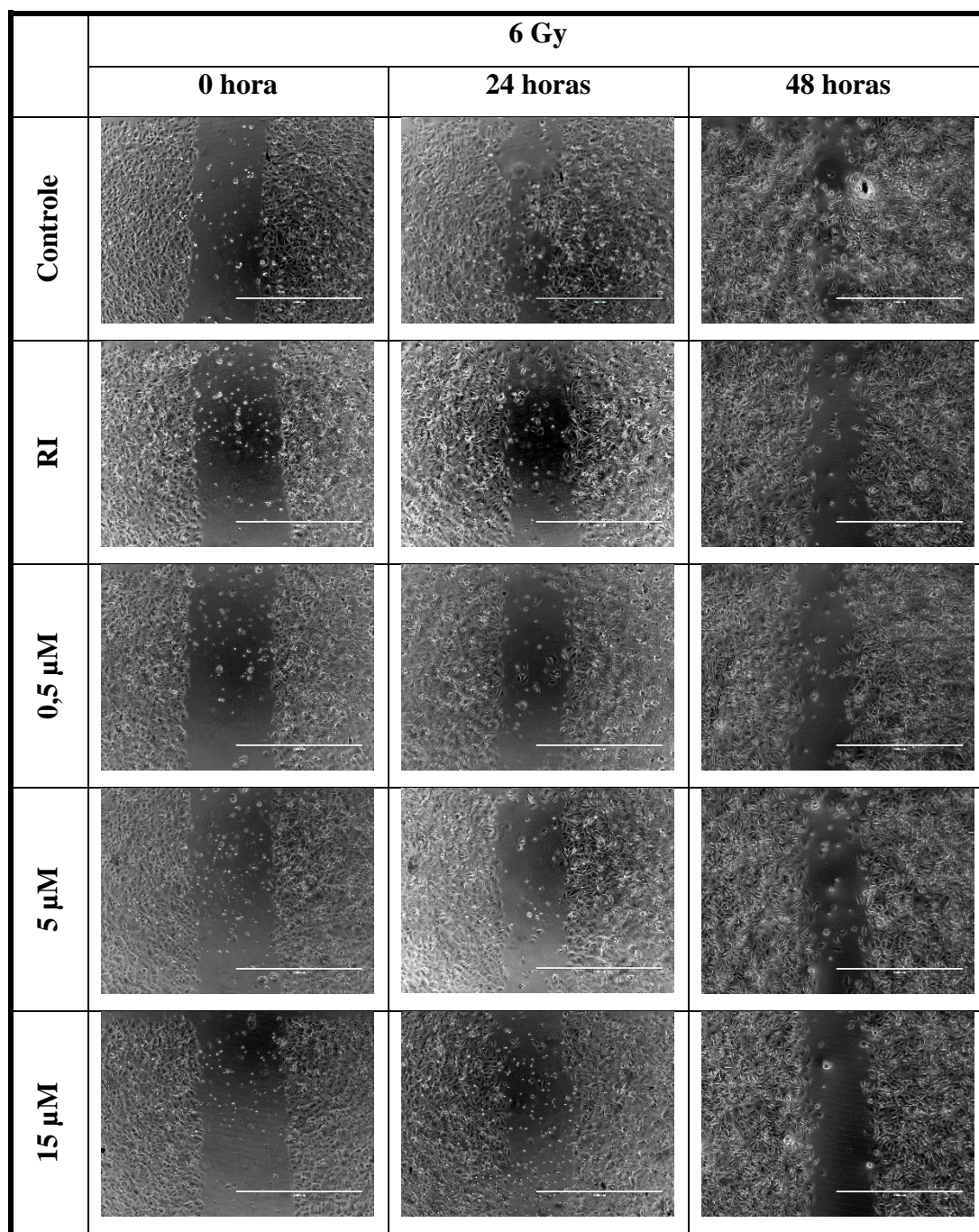
Figura 50 - Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay* com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas a 2 Gy em associação com diferentes concentrações do DTS por 0, 24 ou 48 horas



Legenda: fotos obtidas no microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000), no aumento de 40X.

Fonte: A autora.

Figura 51 - Teste de lesão em monocamada - *Scratch assay* com células mamárias tumorais MCF-7 tratadas com 6 Gy em associação com diferentes concentrações do DTS por 0, 24 ou 48 horas



Legenda: fotos obtidas no microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000), no aumento de 40X.

Fonte: A autora.

6.3.4 Detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência

Uma das primeiras respostas celulares a quebras duplas induzidas no DNA é a fosforilação de histonas H2AX no local de lesão. Histonas fosforiladas (γ H2AX) formam focos no sítio de quebra, que podem ser identificados por meio de ensaio de imunofluorescência. O ensaio recomenda a contagem de 100 células e sua classificação quanto à quantidade de focos de γ H2AX encontrados (x) em: $x = 0$; $1 \leq x \leq 5$; $6 \leq x \leq 10$ e $x \geq 11$, nas figuras 54, 55, 56 e 57 estão as fotos das células com as classificações e nas figuras 52 e 53 estão os gráficos referentes ao ensaio. Sendo assim, das 100 células contadas no controle sem RI (Figura 52), 30 minutos e 24 horas após o tratamento foram encontradas um maior número de células sem foco de histonas fosforiladas, ou seja, sem quebras duplas. O número de células com quebras duplas para 30 minutos foram encontradas 1 a 5 focos e em 24 horas foram contadas um número pequeno de 6 a 10 focos por células. Esse número de lesões observadas são lesões espontâneas, referentes à própria manipulação do ensaio. Para a concentração de 0,5 μ M de DTS, foi semelhante ao controle, apresentando uma pequena quantidade de células com mais de 11 focos no tempo de 24 horas.

Na concentração de 5 μ M de DTS já é possível notar uma ação da droga. No tempo de 30 minutos foi possível contar células com maior número de focos da classificação ($x \geq 11$). Entretanto, no tempo de 24 horas ocorreu um aumento no número de células com lesões maiores do que 11 focos. Na maior concentração testada de 15 μ M de DTS, em 30 minutos, há os três tipos de classificação. Sendo o maior número para as células com 6 a 10 lesões por células. No tempo de 24 horas é possível notar um reparo das lesões pois, aumenta o número de células com lesões de 1 a 5 e diminui o número de células com lesões de 6 a 10 focos.

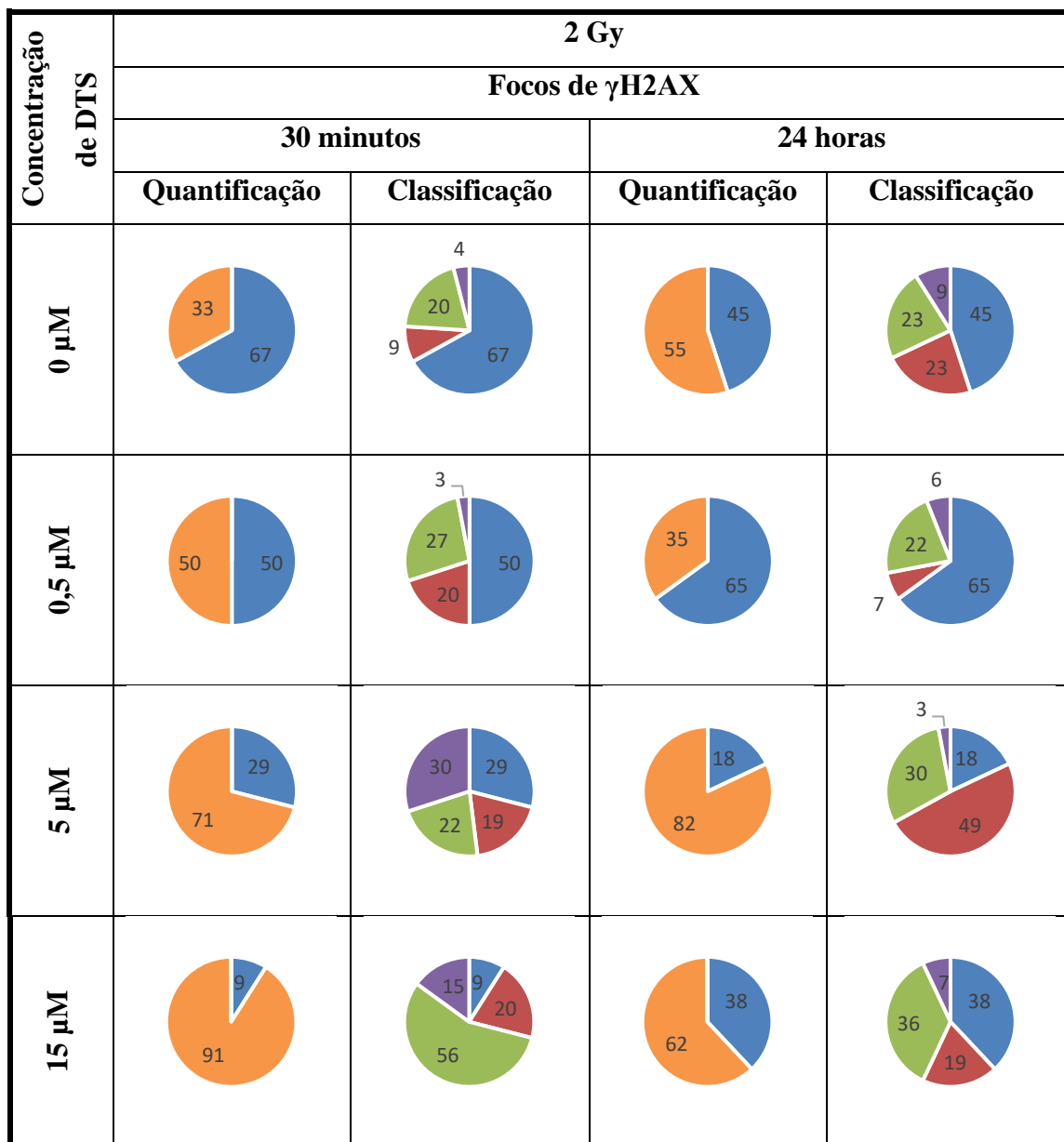
Na dose de 2 Gy (Figura 53), no controle, no tempo de 30 minutos já é possível observar os três tipos de classificação de focos. Após, 24 horas ocorre uma redução no número das células sem lesão e um aumento no número de células nas três classificações.

Na associação do DTS com RI de 2 Gy (Figura 53), na concentração de 0,5 μ M de DTS, ocorreu uma redução dos focos de histonas fosforiladas com de 1 a 5 focos por células. Contudo, na concentração de 5 μ M em associação com 2 Gy, em 24 horas as células conseguiram reparar as lesões com mais de 11 focos de histonas fosforiladas e aumentaram as lesões 1 a 5 focos de histonas fosforiladas. Na concentração de 15 μ M em associação com 2 Gy, observa-se um maior número de células com 6 a 10 focos de

histonas fosforiladas e 24 horas depois acontece uma redução no número dessas células e um aumento nas células sem foco de histonas.

Em 0 Gy no tempo de 24 horas foi observado um aumento de focos de histonas fosforiladas, quebras duplas na células. No entanto, a RI aumentou o número de focos de histonas nas células. Porém, em 24 horas reduziu-se o número de células com focos maiores que 11 por células, nas concentrações de 5 e 15 μM .

Figura 53 - Detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7 incubadas com diferentes concentrações de DTS e irradiadas (2 Gy)



Legenda: Avaliação realizada após 2 horas de incubação com o DTS em associação com RI em dois momentos, 30 minutos e 24 horas após a RI. Os resultados expressam a porcentagem de um único ensaio biológico.

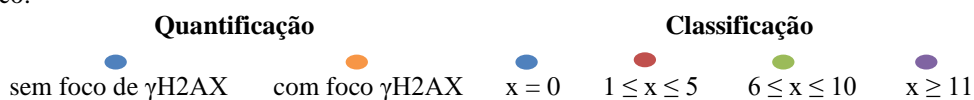
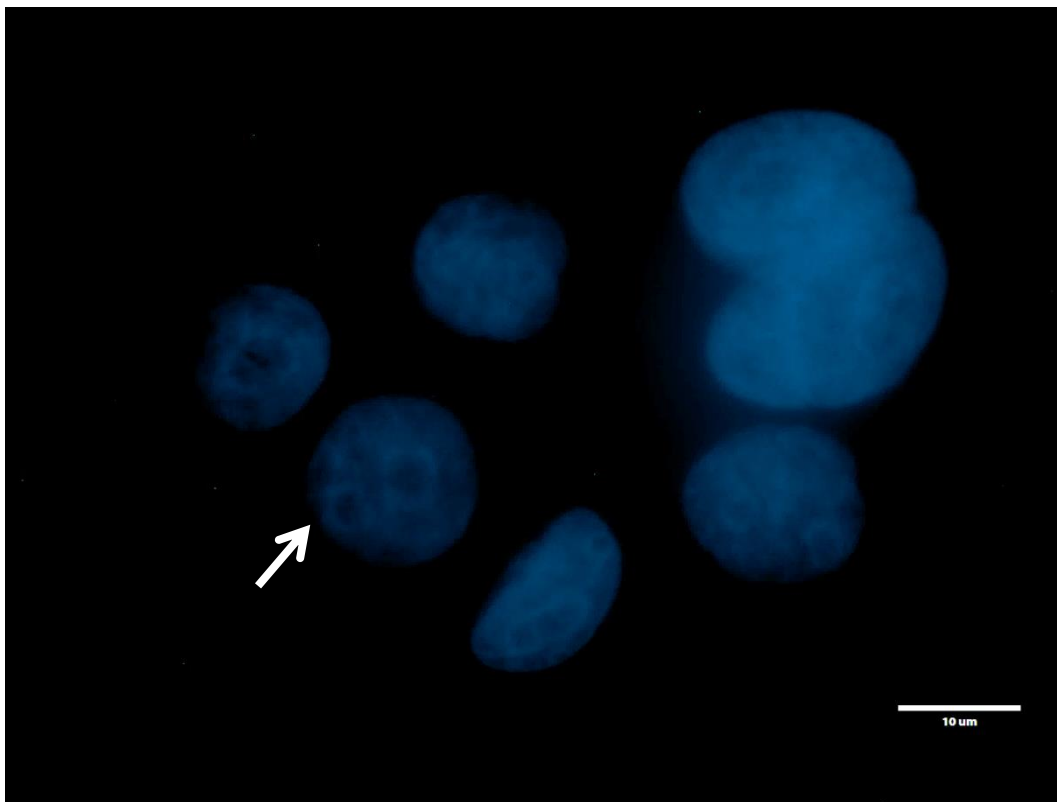
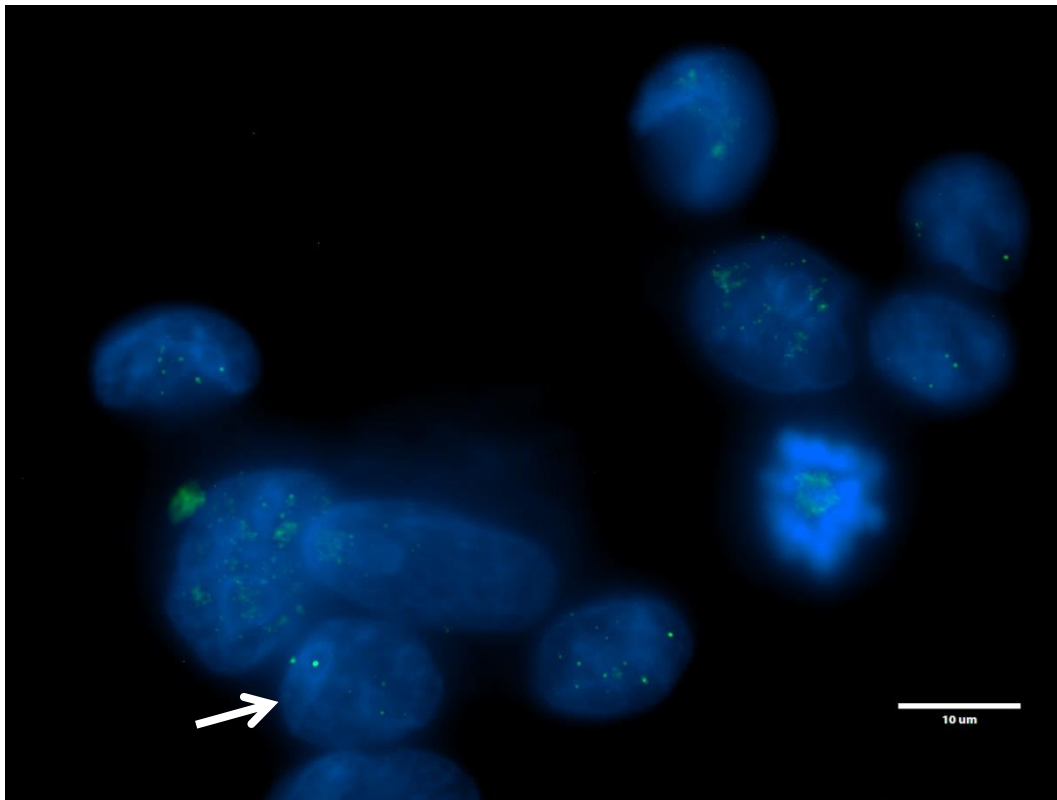


Figura 54 - Focos de histona fosforilada ($x = 0$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7



Legenda: Seta branca indica célula com a classificação do número de focos de histona fosforilada ($x = 0$). Resultado de um único ensaio biológico. Foto tirada no microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000), no aumento de 100X.
Fonte: A autora.

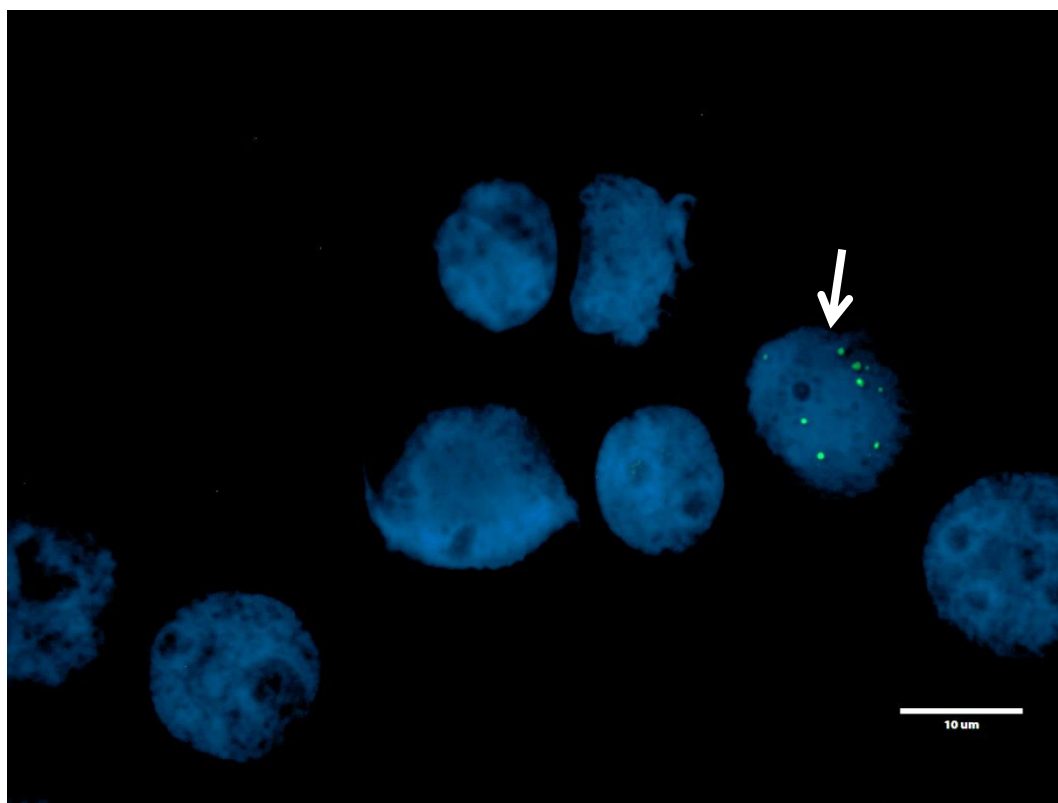
Figura 55 - Focos de histona fosforilada ($1 \leq x \leq 5$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7



Legenda: Seta branca indica célula com a classificação do número de focos de histona fosforilada ($1 \leq x \leq 5$). Resultado de um único ensaio biológico. Foto tirada no microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000), no aumento de 100X.

Fonte: A autora.

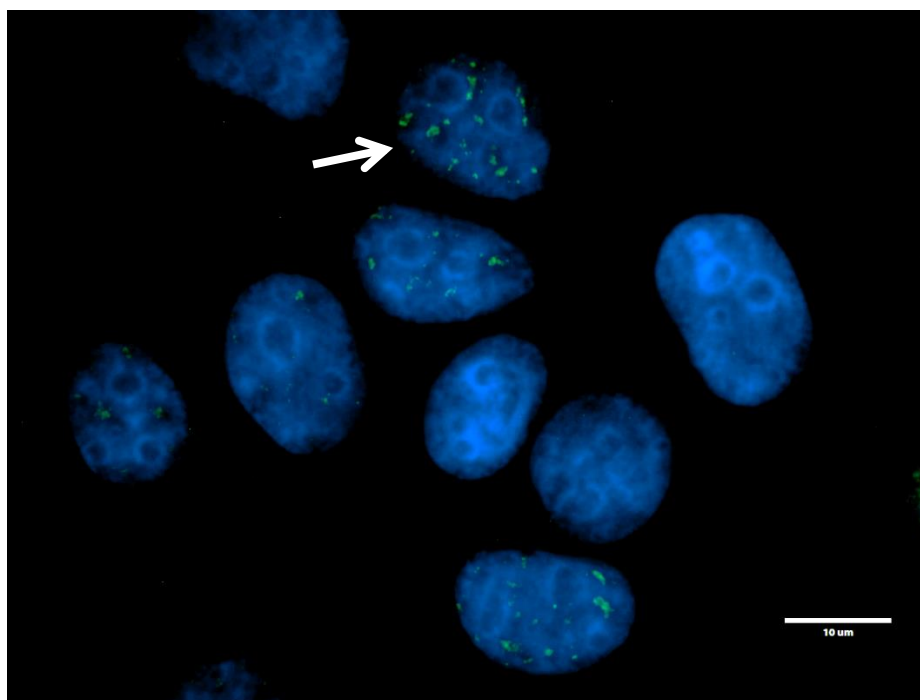
Figura 56 - Focos de histona fosforilada ($6 \leq x \leq 10$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7



Legenda: Seta branca indica célula com a classificação do número de focos de histona fosforilada ($6 \leq x \leq 10$). Resultado de um único ensaio biológico. Foto tirada no microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000), no aumento de 100X.

Fonte: A autora.

Figura 57 - Focos de histona fosforilada ($x \geq 11$) por imunofluorescência em células mamárias tumorais MCF-7



Legenda: Seta branca indica célula com a classificação do número de focos de histona fosforilada ($x \geq 11$). Resultado de um único ensaio biológico. Foto tirada no microscópio de fluorescência Evos-fl (Termo Scientific; M5000), no aumento de 100X.

Fonte: A autora.

Durante as análises das fotos do ensaio de detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência foram observadas micronúcleos na maior concentração de DTS testada. Os micronúcleos não foram contados. Como também, houve um aumento de células em mitose, podendo resultar em morte por catástrofe mitótica e núcleos vesiculados, um indicativo para morte por apoptose. Tais eventos, ocorreram na RI de 2 Gy e no DTS de 15 μ M, em associação ou isoladamente, 30 minutos e 24 horas após a RI, resultados não mostrados.

7 DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem crescido consideravelmente o número de casos de câncer, configurando-se como um dos mais importantes problemas de saúde pública, uma vez que é a segunda doença que mais causa mortes no mundo. O século XX se destacou por um avanço na pesquisa de produtos naturais, especialmente aqueles oriundos de plantas, utilizados na terapêutica antineoplásica (GONZÁLEZ et al., 2020). No presente trabalho foram utilizadas substâncias sintetizadas comercialmente (Sigma-Aldrich), mas que também estão presentes naturalmente na espécie *P. alliacea* (LUZ et al., 2006; SILVA et al., 2018).

Iniciando os ensaios, primeiramente, verificou-se se as substâncias (polissulfetos e *mix*) sofreriam alguma alteração estrutural utilizando a técnica analítica por espectrofotometria. Os resultados indicaram que a exposição à radiação ionizante não promoveu alteração no perfil espectrofotométrico dos polissulfetos e do *mix*, como também do benzoato de sódio que é um acceptor de radicais. As substâncias testadas não apresentaram variações no pico de absorção.

Posteriormente iniciou-se os ensaios de eletroforese em gel de agarose (0,8%) de plasmídeo pUC 9.1, para verificar se os polissulfetos associados ou não a RI apresentariam atividade genotóxica.

As lesões no DNA induzidas pela radiação ionizante podem ser causadas pela ionização direta ou pelo ataque de radicais livres criados pela radiólise da água ao redor da molécula. Esses danos podem ser quebras simples e duplas nas cadeias e sítios de múltiplos danos locais (MENON et al., 2016). Os antioxidantes neutralizam as espécies reativas de oxigênio e inibem os danos oxidativos ao DNA e disfunção mitocondrial, agindo como agentes químo-preventivos (KHAN & MUKHTAR, 2018). Por isso no presente trabalho foi utilizado o benzoato de sódio que tem ação antioxidante, como visto nos resultados. A radiação ionizante promove lesões oxidativas no DNA plasmidial e essas lesões podem ser parcialmente evitadas pelo benzoato de sódio (DANTAS et al., 1999). Compostos organossulfurados apresentam efeitos antioxidantes, como a allicina (SALEHI et al., 2019) e o polissulfeto de alila que podem ser encontrados em *Allium sativum* L. e em outras espécies do gênero *Allium* (ZHANG et al., 2015). Este resultado fornece evidências de que os polissulfetos apresentam uma ação antioxidante sobre o DNA plasmidial em condições *in vitro* quando exposto à radiação ionizante.

No presente estudo os resultados indicam que os polissulfetos, nas concentrações testadas (180, 1085 e 2714 μM) e o *mix* (60, 358 e 904 μM), não foram capazes de induzir quebras no DNA plasmidial. Sabendo que os polissulfetos estão presentes na *P.*

alliacea, Soares e colaboradores (2014) verificaram que extratos aquosos de folhas de *P. alliacea* cultivadas no campo e *in vitro*, foram capazes de promover quebras simples e duplas no DNA de plasmídeos pUC 9.1. As concentrações do extrato utilizadas pelos autores foram 1, 5 e 10 mg/mL e esse efeito genotóxico variou com a concentração dos extratos e também com suas origens de cultivo. Por outro lado, também utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial, porém com extrato etanólico de folhas de *P. alliacea*, Maciel (2017) mostrou que o extrato não foi capaz de induzir quebras na molécula de DNA, nas concentrações testadas (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg/mL). Entretanto, a incubação com o extrato promoveu um retardo no padrão de migração do DNA diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato. De Mattos e colaboradores (2000) também verificaram um retardo no padrão de migração eletroforética de plasmídios pUC 9.1 incubados com concentrações crescentes de SnCl₂ e creditaram esse fenômeno a uma alteração da carga elétrica do DNA promovida pela interação do íon estanoso com a molécula de ácido nucléico.

Quando se trata de espécie vegetal é importante lembrar que existem diversos fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários, tais como: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (DE OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 1991; MARASCHIN & VERPOORTE, 1999; GOBBO-NETO & LOPES, 2007; TAIZ & ZEIGER, 2013). Esses fatores podem interferir diretamente na presença, ausência ou quantidade dos metabólitos e a metodologia aplicada pode favorecer a extração de determinadas substâncias devido a seletividades dos solventes aplicados (DE OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 1991).

Para os ensaios com o DNA plasmidial associados à radiação ionizante com os polissulfetos e o *mix*, foi possível observar uma proteção contra as quebras induzidas pela radiação ionizante. Vale ressaltar que em alguns resultados, não foi possível observar o efeito protetor dos polissulfetos, como: DMS de 180 µM, DTS de 1085 µM e o *mix* de 60 µM. Acredita-se que essa falta de proteção nessas concentrações foi devido a uma variação experimental, onde os resultados estão similares às outras concentrações que conferiram proteção. Assim, de modo geral, os resultados obtidos sugerem que tanto os polissulfetos quanto o *mix* apresentam atividade antioxidante, diminuindo os efeitos lesivos da radiação.

Isoladamente, os polissulfetos e o *mix* não induziram quebras ao DNA plasmidial, e como o *mix* foi o mais efetivo na proteção ao DNA, ele foi o composto

escolhido para os ensaios com a enzima Endo VIII. Assim, após os plasmídeos serem irradiados com 60 Gy, foi adicionada uma alíquota contendo 2 unidades da enzima Endo VIII, com a finalidade de reconhecer e iniciar a retirada de lesões oxidativas nas bases nitrogenadas. Pela técnica de eletroforese em gel de agarose foi possível visualizar um aumento no número de quebras após incubação do DNA com o *mix* dos polissulfetos em associação com a radiação ionizante e a ação da Endo VIII. Os resultados apontam para uma proteção ao DNA plasmidial na maior concentração testada (904 μM). Nesse grupo de resultados é notória a variação experimental, principalmente na concentração de 358 μM , pois a ação da enzima sozinha apresentou mais quebras do que o esperado. Mesmo assim, esses resultados corroboram com os feitos da radiação ionizante no DNA (DROOGER et al., 2015) e a ação da enzima Endo VIII (KLADOVA et al., 2017).

Foi observado que os polissulfetos apresentam um efeito de radioproteção ao DNA plasmidial, tal efeito possivelmente por via antioxidante. Vale ressaltar que para fins médicos, um agente radioprotetor ideal deve alcançar todos os tecidos que precisam ser protegidos na sua forma ativa, reduzir a toxicidade do tratamento convencional, não proteger os tumores com o mesmo grau de proteção dos tecidos normais, permitir o tratamento com doses suficientes altas para melhores resultados do tratamento e ser bem tolerado pelos pacientes (SEGRETO et al, 2016).

Resumidamente, foi observado que a exposição à radiação ionizante causou danos no DNA plasmidial, quando comparada ao controle (DNA plasmidial diluído em água destilada). Nas raias expostas ao padrão isolado não houve diferença no número de quebras no DNA plasmidial, permanecendo com 100% íntegro, na forma I (Superhelicoidizado). Com a associação da radiação ionizante com os polissulfetos foi notória uma proteção ao material genético. Essa proteção foi mais efetiva no *mix* de polissulfetos. A ação da enzima, Endo VIII evidenciou que os danos causados pela radiação ionizante são de caráter oxidativo. Os polissulfetos possivelmente são antioxidantes e podem ser um potencial radioprotetor para fins terapêuticos.

Para os estudos com a linhagem celular MCF-7, foi necessário substituir o solvente metanol pelo etanol. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados com os corantes WST-1 e Cristal Violeta. Os dois ensaios mostraram que o DMS e o DDS não são citotóxicos nas concentrações testadas (0,5; 1; 5; 10; 15 e 20 μM). Esses resultados estão de acordo com Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2008) que, utilizando outros modelos biológicos, encontraram efeito citotóxico para esses polissulfetos apenas em concentrações mais elevadas do que as utilizadas no presente estudo. Por outro lado,

o DTS se mostrou citotóxico de forma dose-dependente em ambos os testes. Wooten e colaboradores (2022) utilizaram o ensaio Alamar Blue para determinar a citotoxicidade do DTS em células de câncer de mama triplo negativo. As células foram expostas ao DTS em um período de incubação de 24 e 72 horas e foi possível observar uma diminuição significativa da proliferação celular, em comparação com o controle, em concentrações abaixo de 0,5 μM . Os autores concluíram que a morte celular induzida pelo DTS é independente de caspase (WOOTEN et al., 2022). A atividade anticancerígena do DTS também foi estudada nas linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. De acordo com os autores, a MDA-MB-231 mostrou maior sensibilidade ao DTS em ensaios de viabilidade celular (AN et al., 2006; XU, AN & WANG, 2009).

Sabendo que a prática da radioterapia é comumente aplicada em pacientes com câncer de mama, a radioresistência e os efeitos colaterais são fatores limitantes desta prática. Portanto, estudar moléculas que podem aumentar o efeito da radiação e, ao mesmo tempo, proteger células normais é muito relevante. Por isso, investigamos se a ordem de aplicação dos polissulfetos à cultura, antes ou depois da RI, afetaria a radiosensibilidade das células. Nossos resultados indicam que 15 μM de DTS, administrado 2 horas antes da RI (2 Gy), radiosensibilizou as células tumorais, MCF-7. Araldi e colaboradores (2018) investigaram os efeitos radiosensibilizador do resveratrol em associação com RI (3 Gy) em células tumorais, MCF-7. As células eram irradiadas e após 24 horas da RI eram incubadas com resveratrol e foi observado um alto efeito citotóxico e antiproliferativo, ocasionando a indução de necrose/senescência. Além disso, também foi notado a ativação da via extrínseca de apoptose através de uma diminuição da relação Bax/Bcl-2 e uma alta atividade de caspase 8. Khazaei e colaboradores (2022) utilizaram vitamina C em associação a RI e verificaram que a vitamina C impactou na eficiência da radioterapia, dependendo do subtipo de câncer de mama e da concentração de vitamina C utilizada. Doses menores de vitamina C, semelhantes a administração oral, podem aumentar a proliferação de células cancerígenas e diminuir a radiosensibilidade.

No presente estudo foi observada uma radioressistência das células MCF-7 na dose de 2 Gy e morte celular nas doses de 6 e 8 Gy (Figura 36). Resultados semelhantes foram encontrados por Luo e colaboradores (2017), por Gray e colaboradores (2019) e também por Khazaei e colaboradores (2022). A literatura também indica que a radiação ionizante pode induzir apoptose através da geração de espécies reativas de oxigênio

(ROS) que causam danos oxidativos no DNA e outras macromoléculas (HALL & GIACCIA, 2006).

As duas metodologias utilizadas para determinação da viabilidade celular, Cristal Violeta e WST-1 são metodologias de resposta rápida e complementares, onde a sobrevivência das células foi avaliada 72 horas após a exposição à RI. Com o objetivo de verificar os efeitos da RI e do DTS sobre a proliferação celular foi realizado o ensaio de recuperação clonogênica em células MCF-7. Essa técnica permite avaliar se as células mantêm sua capacidade reprodutiva e conseguem formar clones, visualizados em forma de colônias 10 dias após a exposição à RI e ao DTS, isoladamente ou em associação.

Então, para o ensaio clonogênico foram escolhidas as concentrações de 0,1; 0,5 e 15 μM de DTS e as doses de 0, 2, 4, 6 e 8 Gy de RI. Nossos resultados estão de acordo com os de Pan e colaboradores (2019), que também não observaram formação de colônias em células MCF-7 irradiadas com 6 Gy de RI. Células de câncer de mama triplo negativo incubadas com DTS, em concentrações abaixo de 0,5 μM , formaram menos colônias em comparação com o controle (WOOTEN et al., 2022). De acordo com a figura 43, a associação da RI com o DTS indica uma potencialização da citotoxicidade, principalmente na dose de 2 Gy, sugerindo um possível efeito radiomodificador do polissulfeto.

Para o ensaio de migração *scratch assay* as doses de RI foram escolhidas uma dose de 2 Gy, referente a radioterapia convencional e uma dose que simularia o hipofracionamento, 6 Gy. Os nossos estudos indicam que as doses testadas isoladamente de RI em associação com 5 μM de DTS não inibiu e nem estimulou a migração das células. A associação com o DTS na concentração de 0,5 μM estimulou a migração celular com 6 Gy nos dois tempos avaliados (24 e 48 horas) e com 15 μM inibiu a migração celular em 24 horas com 2 e 6 Gy. Estudos apontam que após 2 Gy em células A549 e MCF-7, foi possível observar um aumento da capacidade migratória nas células, mediadas pela transição epitelial-mesenquimal e TGF- β (ZHOU et al., 2011). No outro trabalho, foi observado que a dose de 2,3 Gy em células de câncer de mama (MDA-MB-231) foi suficiente para aumentar a migração celular. Os autores também verificaram que as células expostas a 2,3Gy, podem liberar fatores solúveis que, conseqüentemente, podem estimular a migração das células não-irradiadas. Além disso, foi identificada a interleucina 8 como um fator potencial que pode contribuir para a migração induzida pela radiação ionizante (YOUNG & BENNEWITH, 2017). Com relação ao DTS na concentração de 10 μM reduziu a migração e em 25 μM ocorreu um bloqueio por

completo da migração celular, em células de câncer de mama triplo negativo (WOOTEN et al., 2022).

O ensaio de imunohistoquímica para detecção de focos de histonas fosforiladas (γ H2AX) que são formados em resposta a quebras duplas no DNA foi utilizado em células incubadas com o polissulfeto DTS, associado ou não a RI. A proteína histona H2Ax é necessária para estabilizar numerosos fatores em resposta à lesões no DNA. Conseqüentemente, tais lesões ativam e recrutam proteínas quinases, induzindo a fosforilação da histona (γ H2AX) (SMITH et al., 2010; OSTERMAN et al., 2014). Quando os mecanismos de resposta aos danos de DNA são imediatamente ativados, após a fosforilação da histona, podem promover a sobrevivência com reparos eficientes ou a sobrevivência com alterações genômicas. As aberrações cromossômicas estruturais e numéricas são frequentes nas células sobreviventes e podem ser transmitidas à progênie, aumentando a instabilidade cromossômica, característica das células cancerígenas. A heterogeneidade intratumoral mediada pela instabilidade genômica tem sido associada ao aumento do risco de morte ou recorrência e processos como metástase e resistência terapêutica (GAO et al., 2016). Estudos apontam em células de glioblastoma humano, U251, um aumento de focos de histonas, 30 minutos após 2 Gy de RI, retornando ao nível do controle após 24 horas. Enquanto isso, uma quantidade considerável de focos foi identificada a partir de 5 Gy, que voltou ao nível do controle 48 horas depois (BRUNNER et al., 2021). A linhagem celular MCF-7 representa tumores luminiais tipo A, um fenótipo mais benigno, com a proteína p53 tipo selvagem, desempenhando um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose, mediado pelo gene P53 durante o ciclo celular (YU et al., 2006).

O ensaio de detecção de histonas fosforiladas (γ H2AX) por imunofluorescência, mostrou que as células MCF-7, incubadas com diferentes concentrações de DTS, em associação à RI promovem um aumento no número de histonas fosforiladas, logo após 30 minutos. Isso permite sugerir que as lesões formadas pelos agentes testados podem ativar o recrutamento de BRCA1 e p53, proteínas chave no reparo por recombinação homóloga (YU et al., 2006; BONNER et al., 2008). A análise conjunta dos resultados obtidos por meio dos ensaios de recuperação clonogênica e de histonas fosforiladas (γ H2AX) sugerem que nas maiores concentrações de DTS, mesmo com ativação do reparo do DNA, as lesões formadas acabam levando à morte celular. No ensaio de migração (Figuras 49-51), as análises após 24 horas de incubação mostraram, de forma

geral, uma menor migração das células do que após 48 horas. Correlacionando com o ensaio da histona fosforilada é possível sugerir que 24 horas após a RI as células estariam com sistema de reparo ativo, ou seja reparando os danos causados pela RI em associação ao DTS, e posteriormente (48 horas) as células teriam mais capacidade de migrar.

Em resumo, os resultados indicam que os polissulfetos e *mix* conferem proteção ao DNA plasmidial exposto à radiação ionizante. Nas condições testadas, tanto o DMS quanto o DDS não apresentaram citotoxicidade para as células tumorais MCF-7. Em contrapartida, o DTS, isoladamente ou em associação com RI, foi citotóxico, promoveu um aumento de quebras duplas, e impediu a proliferação e migração celular. O ensaio clonogênico, indicou que o DTS em associação com a RI foi capaz de diminuir significativamente a sobrevivência das células MCF-7, mesmo em doses tão baixas quanto 0,1 μM e 2 Gy. O ensaio de imuno-histoquímica (γH2AX) mostrou que o DTS sensibiliza as células à radiação ionizante, pelo menos em parte, aumentando a formação de quebras duplas. Esse aumento de quebras duplas ocasionou redução da proliferação e migração celular.

CONCLUSÕES

- Os polissulfetos avaliados não induzem quebras na molécula de DNA plasmidial;
- Os três polissulfetos isolados protegeram o DNA plasmidial das quebras promovidas pela radiação ionizante. Essa proteção foi mais efetiva quando foi usado o *mix* de polissulfetos.
- Os polissulfetos apresentaram atividade antioxidante na proteção ao DNA;
- A radiação ionizante promove lesões de DNA que são alvo da Endonuclease VIII;
- Os polissulfetos DMS e DDS não apresentaram atividade citotóxica na linhagem de células tumorais MCF-7;
- O DTS, isoladamente ou associado a RI, foi citotóxico para MCF-7, além de promover quebras duplas no DNA e impedir a proliferação e a migração celular nessa linhagem de células tumorais.

PERSPECTIVAS

Do trabalho de doutorado serão gerados dois artigos. O primeiro com os resultados do estudo da genotoxicidade dos padrões de polissulfetos em DNA plasmidial está em preparação, um outro sobre os efeitos dos padrões de polissulfetos e da radiação ionizante em células eucarióticas será também submetido a publicação.

Dando continuidade ao trabalho serão realizados experimentos para:

Avaliar a genotoxicidade induzida pelo DTS isolado ou em associação a RI, através dos ensaios de micronúcleo e cometa e

Determinar a via de morte celular, por apoptose ou necrose, induzida pelo DTS isolado ou em associação a RI, através de citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U.P. & HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. supl, p. 678-689, 2006.

ALMASDY, D.; EPTIYENI, E.; KHAMRI, D.& KURNIASIH, N. Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) among Breast Cancer Patients in a Public Hospital in Padang, Indonesia. **Journal of Young Pharmacists**, v. 10, n. 2, p. S145, 2018.

ALMEIDA, V.M.; BEZERRA, M.A.; NASCIMENTO, J.C.; AMORIM, L.M.F. Anticancer drug screening: Standardization of in vitro wound healing assay. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, p. 606-619, 2020.

ALONSO J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. 2nd ed. Rosário: Corpus Editoria y Distribuidora; 2007.

ALONSO-CASTRO, A.J.; VILLARREAL, M.L; SALAZAR-OLIVO, L.A.; GOMEZ-SANCHEZ, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 945-972, 2011.

ALVES, T.C; RODRIGUES, R.; LAGO, J.H.G.; PRADO, C.M.; GIRARDI, C.E.N.; HIPÓLIDE, D.C. *Petiveria alliacea*, a plant used in Afro-Brazilian smoke rituals, triggers pulmonary inflammation in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2019.

AN, H.; ZHU, J.; WANG, X.; XU, X. Synthesis and anti-tumor evaluation of new trisulfide derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 18, p. 4826-4829, 2006.

ANDRADE, T.M.D.; MELO, A.S.D.; DIAS, R.G.C.; VARELA, E.L.P.; OLIVEIRA, F.R.D.; VIEIRA, J.L.F; ANDRADE, M.A.D.; BAETAS, A.C.; MONTEIRO, A.C.; MAIA, C.D.S.F. Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adult rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 604-610, 2012.

ARCEO-MEDINA, G.N.; AGUILAR, J.A.R.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; BORGES-ARGAEZ, R.; BARREDO-POOL, F.A. Evaluation of the effect of the combination of dibenzyl disulfide, dibenzyl trisulfide and octadecenoic acid methyl ester on the process of ovogenesis in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 23, n. 1, 2020.

BALLESTEROS-RAMÍREZ, R.; ALDANA, E.; HERRERA, M.V.; URUEÑA, C.; ROJAS, L.Y.; ECHEVERRI, L.F.; COSTA, G.M.; QUIJANO, S.; FIORENTINO, S. Preferential Activity of *Petiveria alliacea* Extract on Primary Myeloid Leukemic Blast. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

BONNER, W.M.; REDON, C.E.; DICKEY, J.S.; NAKAMURA, A.J.; SEDELNIKOVA, O.A.; SOLIER, S.; POMMIER, Y. γ H2AX and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 957-967, 2008.

BOUNDY J. Enfermagem médico – cirúrgico. Rio de Janeiro. 3° ed, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

BRUCKBAUER, S.T.; MINKOFF, B.B. YU, D.; CRYNS, V.L.; COX, M.M.; SUSSMAN, M. R. Ionizing radiation-induced proteomic oxidation in *Escherichia coli*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 19, n. 8, p. 1375-1395, 2020.

BRUNNER, S.; VARGA, D.; BOZÓ, R.; POLANEK, R.; TÓKÉS, T.; SZABÓ, E.R.; MOLNÁR, R.; GÉMES,N.; SZEBENI,G.J.; PUSKÁS,L.G.; ERDÉLYI, M.; HIDEGHÉTY, K. Analysis of Ionizing Radiation Induced DNA Damage by Superresolution dSTORM Microscopy. **Pathology & Oncology Research**, v. 27, p. 1609971, 2021.

CAMARGO, M.T.L.D.A. AMANSA-SENHOR: a arma dos negros contra seus senhores. **Revista Pós Ciências Sociais**, v. 4, n. 8, 2007a.

CAMARGO, M.T.L.D.A. Contribuição etnofarmacobotânica ao estudo de *Petiveria alliacea* L.–Phytolacaceae–(“amansa-senhor”) e a atividade hipoglicemiante relacionada a transtornos mentais. **Dominguezia**, v. 23, p. 1, 2007b.

CAMPOS, L.; SANTOS, J. R.; DO NASCIMENTO SOUZA, D.; ATTIE, M.R.P. Relevant aspects of hypofractionation in breast and prostate radiotherapy. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e24910514904-e24910514904, 2021.

CHRUBASIK-HAUSMANN, S.; VLACHOJANNIS, J. & MCLACHLAN, A. J. Understanding drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): impact of hyperforin content. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 129-138, 2019.

CIFUENTES, M.C.; CASTAÑEDA, D.M.; URUEÑA, C.P.; FIORENTINO, S. A fraction from *Petiveria alliacea* induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and regulates HSP70 expression. **Universitas Scientiarum**, v. 14, n. 2, p. 125-134, 2009.

COMŞA, Ş.; CIMPEAN, A.M.; & RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.

CORREA, M.; YEUNG, K.Y.; LINARES, H.; PACHECO, O.; CAICEDO, P.; BONFANTE, R. Efectividad del extracto acuoso de la planta *Petiveria alliacea* (mapurite) sobre la evolución del melanoma maligno en ratones C57BL/6. **Gaceta de Ciencias Veterinarias**, v. 21, n. 2, p. 53-60, 2016.

DA SILVA, P.A. & RIUL, S.S. Breast cancer: risk factors and early detection. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 6, p. 1016-1021, 2011.

DANTAS, F.J.; MORAES, M.O.; DE MATTOS, J.C.; BEZERRA, R.J.; CARVALHO, E.F.; BERNARDO FILHO, M.; DE ARAUJO, A.C. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. **Toxicology Letters**, v. 110, n. 3, p. 129-136, 1999.

DAYES, I.; RUMBLE, R.B.; BOWEN, J.; DIXON, P.; WARDE, P. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of breast cancer. **Clinical Oncology**, v. 24, n. 7, p. 488-498, 2012.

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C.; BERNARDO-FILHO, M.; CABRAL-NETO, J.B.; LAGE, C.; ALVARO C. LEITÃO, A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. **Toxicology Letters**, v. 116, n. 1-2, p. 159-163, 2000.

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; MORAES, M.O. Agarose gel electrophoresis system in the classroom: detection of DNA strand breaks through the alteration of plasmid topology. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 32, n. 4, p. 254-257, 2004.

DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. & AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 1991.

DE SOUZA, D.P.; FARIA, W.S.M., DEVÓLIO, M.L.; MARINHO, V.A.; MARSON, R.F. A importância da radioterapia no tratamento do câncer de mama. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 1, p. 35-38, 2018.

DI STASI, L.C.; FEITOSA, S.B. & HIRUMA-LIMA, C.A. Caryophyllales medicinais. In: DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. editors. Medicinal Plants in the Amazonian region and Atlantic Forest. 2nd ed. São Paulo: Editora Unesp, p. 149-73, 2002.

DIAZ, L.A.; TORREGROSA, L.; BENÍTEZ, L.; MERCADO, M.; FIORENTINO, S. Plant-based Complementary and alternative medicine used by breast cancer patients at the Hospital Universitario San Ignacio in Bogotá, Colombia. **Universitas Scientiarum**, v. 17, n. 3, p. 291-302, 2012.

DROOGER, J.C.; HOONING, M.J.; SEYNAEVE, C.M.; BAAIJENS, M.H.; OBDEIJN, I.M.; SLEIJFER, S.; JAGER, A. Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a critical review of the literature. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 2, p. 187-196, 2015.

DUARTE, M.D.R.& LOPES, J.F. Leaf and stem morphoanatomy of *Petiveria alliacea*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7, p. 599-607, 2005.

FIORENTINO, S. & URUEÑA, C. La fitoterapia como fuente de medicamentos reguladores del metabolismo tumoral y activadores de la respuesta inmunitaria. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 42, n. 163, p. 132-144, 2018.

FOSTER, K.; YOUNGER, N.; AIKEN, W.; BRADY-WEST, D.; DELGODA, R. Kimberley et al. Reliance on medicinal plant therapy among cancer patients in Jamaica. **Cancer Causes & Control**, v. 28, n. 11, p. 1349-1356, 2017.

FREITAS, N.M.A.; ROSA, A.A.; MARTA, G.N.; HANNA, S.A.; HANRIOT, R.M.; BORGES, A.B.B.; GONDIM, G.R.M.; PELLIZZON, A.C.A.; VERAS, I.M.; ALMEIDA JR., W.J.; FERNANDEZ, C.R.S.H.W.; BATALHA FILHO., E.S.; CASTILHO, M. S.; KUHNEN, F. Q.; NAJAS, R. M. X. F.; AFFONSO JR., R. J.; LEITE, A.C.C.; RIBEIRO, H.L.M.; FREITAS JR.,R.; OLIVEIRA, H.F. Recommendations for hypofractionated whole-breast irradiation. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 770-777, 2018.

GAO, C.; SU, Y.; KOEMAN, J.; HAAK, E.; DYKEMA, K.; ESSENBERG, C.; HUDSON, E.; PETILLO, D.; KHOO, S.K.; VANDE WOUDE, G.F. Chromosome instability drives phenotypic switching to metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 51, p. 14793-14798, 2016.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; COTO MORALES, T.; OCAMPO, R. & PAZOS, L. Subchronic and acute preclinical toxicity and some pharmacological effects of the water extract from leaves of *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 54, n. 4, p. 1323-1326, 2006.

GARCÍA-PÉREZ, M.E.; LEMUS-RODRÍGUEZ, Z.; HUNG-ARBELO, M. & VISTEL-VIGO, M. Influence of polyvinylpyrrolidone, microcrystalline cellulose and colloidal silicon dioxide on technological characteristics of a high-dose *Petiveria alliacea* tablet. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 12, p. 2011-2015, 2017.

GEZICI, S. & ŞEKEROĞLU, N. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 19, n. 1, p. 101-111, 2019.

GOBBO-NETO, L & LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GONZÁLEZ, J. GARCIA, H.O.; DOS SANTOS PINHEIRO, J.; PADILHA, G.L.; LA PORTA, V.G.; SILVEIRA, G.F.; APEL, M.A.; BRUNO, A. N. *In vitro* methodological tools for the study of cancer and selection of new anticancer molecules. **ScientiaTec**, v. 7, n. 03, 2020.

GOUVEIA, R.G & SOBRAL, M.V. CONTAGEM DE CÉLULAS *In*: GONÇALVES, J.C.R. & SOBRAL, M.V. Cultivo de Células: da Teoria à Bancada. João Pessoa: Editora UFPB. p. 87-93, 2020.

GRAY, M.; TURNBULL, A.K.; WARD, C.; MEEHAN, J.; MARTÍNEZ-PÉREZ, C.; BONELLO, M.; PANG, L.Y.; LANGDON, S.P.; IAN H. KUNKLER, I.H.; MURRAY, A.; ARGYLE, D. Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines. **Radiation Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2019.

HALL, E.J. & GIACCIA, A.J. **Radiobiology for the Radiologist**.2006.

HAMEDT, A.L.; ORTIZ, I.C.; GARCIA-HUERTAS, P.A.; SAEZ, J.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; DE MATTOS, J.C.P.; RODRIGUEZ-GÁSQUEZ M.; TRIANA O. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic evaluation of crude extracts and fractions from *Piper jericense* with trypanocidal action. **Acta Tropica**, v. 131, p. 92-97, 2014.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HARRINGTON K.; JANKOWSKA P. & HINGORANI M. Molecular biology for the radiation oncologist: the 5Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer. **Clinical Oncology**, v. 19, n. 8, p. 561-571, 2007.

HE, T.; CHAMBERS, M.I. & MUSAH, R.A. Application of Direct Analysis in Real Time-High Resolution Mass Spectrometry to Investigations of Induced Plant Chemical Defense Mechanisms-Revelation of Negative Feedback Inhibition of an Alliinase. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 21, p. 12802-12809, 2018.

HERNÁNDEZ, J.F., URUEÑA, C.P.; SANDOVAL, T.A.; CIFUENTES, M.C.; FORMENTINI, L.; CUEZVA, J.M.; FIORENTINO, S. A cytotoxic *Petiveria alliacea* dry extract induces ATP depletion and decreases β -F1-ATPase expression in breast cancer cells and promotes survival in tumor-bearing mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

HERNÁNDEZ, J.F.; URUEÑA, C.P.; CIFUENTES, M.C.; SANDOVAL, T.A.; POMBO, L.M.; CASTAÑEDA, D.; FIORENTINO, S. A *Petiveria alliacea* standardized fraction induces breast adenocarcinoma cell death by modulating glycolytic metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 641-649, 2014.

IACOMINO, G.; PICARIELLO, G.; STILLITANO, I.; D'AGOSTINO, L. Nuclear aggregates of polyamines in a radiation-induced DNA damage model. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 47, p. 11-19, 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Basic **Approaches to the Cancer Control**. Revised 6th edition revised and updated. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

JIANG, D.; HATAHET, Z.; BLAISDELL, J.O.; MELAMEDE, R.J.; WALLACE, S. S. Escherichia coli endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 11, p. 3773-3782, 1997.

KERDUDO, A.; GONNOT, V.; NJOH ELLONG, E.; BOYER, L.; MICHEL, T.; ADENET, S.; FERNANDEZ, X. Essential oil composition and biological activities of *Petiveria alliacea* L. from Martinique. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 3, p. 186-196, 2015.

KHAN, N. & MUKHTAR, H. Tea polyphenols in promotion of human health. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 39, 2018.

KHAZAEI, S.; NILSSON, L.; ADRIAN, G.; TRYGGVADOTTIR, H.; KONRADSSON, E.; BORGQUIST, S.; ISAKSSON, K; CEBERG, C; JERNSTRÖM, H. Impact of combining vitamin C with radiation therapy in human breast cancer: does it matter?. **Oncotarget**, v. 13, p. 439, 2022.

KLADOVA, O.A.; KUZNETSOVA, A.A.; FEDOROVA, O.S.; KUZNETSOV, N.A. Mutational and kinetic analysis of lesion recognition by Escherichia coli endonuclease VIII. **Genes**, v. 8, n. 5, p. 140, 2017.

KOYANAGI, M.; KAWAKABE, S. & ARIMURA, Y. A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells. **Cytotechnology**, 2015.

KUMAR, S.S.; CHAUBEY, R.C.; DEVASAGAYAM, T.P.A.; PRIYADARSINI, K.I.; CHAUHAN, P.S. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism (s) of action. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 425, n. 1, p. 71-79, 1999.

LATEEF, A.; FOLARIN, B.I.; OLADEJO, S.M.; AKINOLA, P.O.; BEUKES, L.S.GUEGUIM-KANA, E.B. Characterization, antimicrobial, antioxidant, and anticoagulant activities of silver nanoparticles synthesized from *Petiveria alliacea* L. leaf extract. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 7, p. 646-652, 2018.

LI, M.; ZHANG, Z.; HILL, D.L.; WANG, H.; ZHANG, R. Curcumin, a dietary component, has anticancer, chemosensitization, and radiosensitization effects by down-regulating the MDM2 oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway. **Cancer Research**, v. 67, n. 5, p. 1988-1996, 2007.

LOSADA-ECHEBERRIA, M.; HERRANZ-LOPEZ, M.; MICOL, V.; & BARRAJON-CATALAN, E. Polyphenols as promising drugs against main breast cancer signatures. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 88, 2017.

LUO, M.; DING, L.; LI, Q.; YAO, H. miR-668 enhances the radioresistance of human breast cancer cell by targeting I κ B α . **Breast Cancer**, v. 24, n. 5, p. 673-682, 2017.

LUZ, D.A.; PINHEIRO, A.M.; SILVA, M.L.; MONTEIRO, M.C.; PREDIGER, R. D.; MAIA, C.S.F.; FONTES-JÚNIOR, E.A. Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 182-201, 2016.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA, J.V., GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, V.B. **Avaliação da toxicidade e mutagenicidade de extratos de folhas de *Petiveria alliacea* Linnaeus em *Escherichia coli* e DNA plasmidial**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

MADAN, R., & KHOSLA, D. 6Rs of Radiation Oncology. In: **Practical Radiation Oncology**. p. 177-178, Springer: Singapore, 2020.

MARASCHIN, M. & VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 24-28, 1999.

MENON, S.S.; UPPAL, M.; RANDHAWA, S.; CHEEMA, M.S.; AGHDAM, N.; USALA, R.L.; GHOSH, S.P.; CHEEMA, A.K.; DRITSCHILO, A. Radiation metabolomics: current status and future directions. **Frontiers in Oncology**, v. 6, p. 20, 2016.

MUKHERJEE, D.; COATES, P.J.; LORIMORE, S.A. & WRIGHT, E.G. Responses to ionizing radiation mediated by inflammatory mechanisms: Tissue responses in radiation pathology. **The Journal of Pathology**, v. 232, n. 3, p. 289–299, 2014.

NAHUM, Alan E. The radiobiology of hypofractionation. **Clinical oncology**, v. 27, n. 5, p. 260-269, 2015.

NAVARRO, M.; MOREIRA, I.; ARNAEZ, E.; QUESADA, S.; AZOFEIFA, G.; ALVARADO, D.; MONAGAS, M. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 50, 2017.

NG, A.; BROCK, K.K.; SHARPE, M.B.; MOSELEY, J.L.; CRAIG, T.; HODGSON, D.C. Individualized 3D reconstruction of normal tissue dose for patients with long-term follow-up: a step toward understanding dose risk for late toxicity. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 84, n. 4, p. e557-e563, 2012.

OKE, D.G. & OLURANTI, O.O. Antifungal, Antibacterial and Phytochemical Properties of *Petiveria Alliacea* Plant from Iwo, Nigeria. **Chemistry Research Journal**, v. 4, n. 1, p. 12-18, 2019.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013.

OSTERMAN, M.; KATHAWA, D.; LIU, D.; GUO, H.; ZHANG, C.; LI, M.; YU, X.; LI, F. Elevated DNA damage response in pancreatic cancer. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 142, n. 6, p. 713-720, 2014.

PAN, L.; WAN, M.; ZHENG, W.; WU, R.; TANG, W.; ZHANG, X.; YANG, T.; YE, C. Intrabeam radiation inhibits proliferation, migration, and invasiveness and promotes apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 18, p. 1533033819840706, 2019.

PEREIRA, L.; FERREIRA, M.T.; LIMA, A.G.F.; SALATA, C., FERREIRA-MACHADO, S.C.; LIMA, I.; MORANDI, V.; MAGALHÃES, L.A.G. Biological effects induced by doses of mammographic screening. **Physica Medica**, v. 87, p. 90-98, 2021.

PÉREZ-LEAL, R.; GARCIA-MATEOS; M.R.; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, M. & SOTO-HERNÁNDEZ, M. Actividad citotóxica y antioxidante de *Petiveria alliacea* L. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 12, n. 1, p. 51-56, 2006.

RAFEHI, H.; ORLOWSKI, C.; GEORGIADIS, G.T.; VERVERIS, K.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T.C. Clonogenic assay: adherent cells. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 49, p. e2573, 2011.

RATTANACHAIKUNSOPON, P. & PHUMKHACHORN, P. Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria of chives (*Allium schoenoprasum*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 11, p. 2987-2991, 2008.

RÖSNER, H.; WILLIAMS, L.A.D.; JUNG, A.; KRAUS, W. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1540, n. 2, p. 166-177, 2001.

SALEHI, B.; ZUCCA, P.; ORHAN, I.E.; AZZINI, E.; ADETUNJI, C.O.; MOHAMMED, S.A.; BANERJEE, S.K.; SHAROPOV, F.; RIGANO, D.; SHARIFIRAD, J.; MARTORELL, M.; ANTONI SUREDA, A.; MARTINS, N.; SELAMOĞLU, Z.; AHMAD, A.; ARMSTRONG, L. Allicin and health: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, p. 502-519, 2019.

SALES Q.S.; GONÇALVES, F.M.B; RAMOS, A.C.; PAES, M.M.; VEGA, M.R.G; KANASHIRO, M.M.; OLIVEIRA, R.R.O. Phytochemical analysis and cytotoxic activity of *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae). **International Journal of Science**, v. 5, n. 04, p. 52-58. 2016.

SEGRETO, H.R.C.; HELD, K.D.; MICHAEL, B.D.; SEGRETO, R.A. **Rabiobiologia - Da Bancada à Clínica. 2ª Edição**, São Paulo: Editora Scortecci. 2016.

SEGUN, P.A.; OGBOLE, O.O. & AJAIYEGBA, E.O. Medicinal plants used in the management of cancer among the Ijebus of Southwestern Nigeria. **Journal of Herbal Medicine**, v. 14, p. 68-75, 2018.

SILVA, J.P.B.; DO NASCIMENTO, S.C.M.; OKABE, D.H.; PINTO, A.C.G.; DE OLIVEIRA, F.R.; DA PAIXÃO, T.P.; SIQUEIRA, M.L.S.; BAETAS, A.C.; DE ANDRADE, M.A. Antimicrobial and anticancer potential of *Petiveria alliacea* L. (Herb to “Tame the Master”): A review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 12, n. 23, p. 85, 2018.

SMITH, J.; THO, L.M.; XU, N.; GILLESPIE, D. A. The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 108, p. 73-112, 2010.

SOARES, B.O.; OLIVEIRA, M.B.; MANSUR, E.; DANTAS, F.J.S.; DE MATTOS, J.C.P.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; GAGLIARDI, R.F. Effect of extracts from field and *in vitro* plants of *Petiveria alliacea* L. on plasmidial DNA. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 35, p. 1101-1109, 2014.

SOULE, H.D.; VAZQUEZ, J.; LONG, A., ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N. & PIETRO, R.C. Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 435-440, 2010.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2013.

TEIXEIRA, A.H.; BEZERRA, M.M.; CHAVES, H.V.; DO VAL, D.R.; PEREIRA FILHO, S.M.; RODRIGUES, A.A. Conhecimento popular sobre o uso de plantas

medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 13, n. 1, 2014.

TEPHLY, T.R. The toxicity of methanol. **Life Sciences**, v. 48, n. 11, p. 1031-1041, 1991.

TONDO, J.E.; SILVERIO, A.D.P.; BAWER, M.C. & EVANGELISTA, L. Ethnobotany of Lubuagan: Household materials and Ornaments. **Pacific Science Review B: Humanities and Social Sciences**, v. 1, n. 2, p. 104-107, 2015.

TRIALISTS' GROUP, The START. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trial B of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: a randomised trial. **The Lancet**, v. 371, n. 9618, p. 1098-1107, 2008.

URUEÑA, C.; CIFUENTES, C.; CASTAÑEDA, D.; ARANGO, A.; KAUR, P.; ASEA, A.; FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 60, 2008.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 105, n. 2, p. 140-156, 2015.

VASIREDDY, R.S.; TANG, M.M.; MAH, L.J.; GEORGIADIS, G.T.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. Evaluation of the Spatial Distribution of γ H2AX following Ionizing Radiation. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 42, p. e2203, 2010.

VEGA-AVILA, E., & PUGSLEY, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. In: **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, n. 10, p. 4, 2011.

VICTÓRIO, C.P.; PEIXOTO, F.M.; DE SOUZA, E.M.; DE SALLES, J.B.; CARDOSO, A.M.; DE ASSIS, M.C. Plant metabolites may protect human cells against radiation-associated damage: an integrative review. *In: Frontiers in Natural Product Chemistry*. Ed Bentham Science Publishers. v. 10, p 154-188, 2022.

VOLPATO, G.; GODÍNEZ, D.; BEYRA, A. & BARRETO, A. Uses of medicinal plants by Haitian immigrants and their descendants in the Province of Camagüey, Cuba. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 1, p. 16, 2009.

WOOTEN, J.; MAVINGIRE, N.; ARAÚJO, C.A.; AJA, J.; WAUCHOPE, S.; DELGODA, R.; BRANTLEY, E. Dibenzyl trisulfide induces caspase-independent death and lysosomal membrane permeabilization of triple-negative breast cancer cells. **Fitoterapia**, v. 160, p. 105203, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Alma-Ata 1979 - Cuidados primários de saúde. Relatório da conferência internacional sobre cuidados primários de saúde. Brasília: Organização Mundial da Saúde/Fundo das Nações Unidas para a Infância. v. 15; 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. 1998.

XU, L.; QIAN, F.; SUN, L. Dibenzyl trisulfide inhibits proliferation and induces apoptosis of HN30 cells via Akt/p53 signaling pathway. **Journal of Southern Medical University**, v. 41, n. 6, p. 847-853, 2021.

XU, X.; AN, H. & WANG, X. **Substituted organosulfur compounds and methods of using thereof**. U.S. Patent n. 7,622,507, 24 nov. 2009.

YI, J.; ZHU, J.; ZHAO, C.; KANG, Q.; ZHANG, X.; SUO, K.; CAO, N.; HAO, L.; LU, J. Potential of natural products as radioprotectors and radiosensitizers: Opportunities and challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 12, p. 5204-5218, 2021.

YOUNG, A.G.H. & BENNEWITH, K.L. Ionizing radiation enhances breast tumor cell migration *in vitro*. **Radiation Research**, v. 188, n. 4, p. 381-391, 2017.

YU, T.; MACPHAIL, S.H.; BANATH, J.P.; KLOKOV, D.; OLIVE, P.L. Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. **DNA repair**, v. 5, n. 8, p. 935-946, 2006.

ZAVALA-OCAMPO, L.M.; AGUIRRE-HERNÁNDEZ, E.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; RIVERA, G.; MARCHAT, L.A.; RAMÍREZ-MORENO, E. Antiamoebic activity of *Petiveria alliacea* leaves and their main component, isoarborinol. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, n. 8, p. 1401-1408, 2017.

ZHANG, Z.; LEI, M.; LIU, R.; GAO, Y.; XU, M.; ZHANG, M. Evaluation of alliin, saccharide contents and antioxidant activities of black garlic during thermal processing. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 39-47, 2015.

ZHOU, Y.C.; LIU, J.Y.; LI, J.; ZHANG, J.; XU, Y.Q.; ZHANG, H.W.; XU, Y.Q.; ZHANG, H.W.; QIU, L.B.; DING, G.R.; XIAO-MING SU, X.M.; MEI-SHI, M.M.; GUO, G.Z. Ionizing radiation promotes migration and invasion of cancer cells through transforming growth factor-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 81, n. 5, p. 1530-1537, 2011.