

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

**EFEITO CITOTÓXICO E PRÓ-APOPTÓTICO DO COMPOSTO  
[6]-SHOGAOL CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE BEXIGA  
(MB49), *IN VITRO***

DIANA GABRIELA NINA NINA

SÃO CARLOS

2021

DIANA GABRIELA NINA NINA

**EFEITO CITOTÓXICO E PRÓ-APOPTÓTICO DO COMPOSTO [6]-SHOGAOL CONTRA  
CÉLULAS DE CÂNCER DE BEXIGA (MB49), *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

**Financiadora:** OEA/GCUB nº 001/2018

**Orientadora:** Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

SÃO CARLOS

2021



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Diana Gabriela Nina Nina, realizada em 24/05/2021.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado (USP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedico este trabalho a minha mãe, mulher guerreira e perseverante, com todo meu amor e gratidão.

Dedico este trabalho a minha melhor amiga Ximena Cuellar Alipaz (*in memoriam*), que sempre me apoiou e acreditou em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe Gertrudis Nina Mayta, por apoiar-me incondicionalmente, por oferecer-me a oportunidade de cumprir este sonho, pelo esforço para que eu chegasse até aqui, espero retribuir tudo o que você me deu. Amo você imensamente.

Aos meus queridos irmãos Oscar R. Nina, Roman E. Nina e Yolanda N. Nina, pelas palavras de apoio e carinho, lembro-me cada dia de todos nossos momentos juntos, cheios de risadas e gordices.

A minha orientadora a Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal por sua disponibilidade em aceitar-me em seu grupo de pesquisa, por sua amabilidade e pela confiança.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra, pelo apoio que recebi durante todo este tempo, pela orientação científica nos momentos em que precisei, a paciência e sua disponibilidade em ajudar-me, por abrir-me as portas de seu laboratório e permitir-me realizar este trabalho junto com seu grupo de pesquisa. Além das contribuições, sugestões e conselhos que me brindou na minha banca de qualificação, as quais me ajudaram muito no desenvolvimento deste trabalho. Só tenho a agradecer pelo apoio.

Ao Prof. Dr. James Almada da Silva do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da Universidade Federal de Sergipe, Lagarto - SE, que cedeu gentilmente o composto [6]-Shogaol para a realização deste trabalho, pela paciência e sua disponibilidade.

A toda a equipe do laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas que estiveram à disposição quando eu precisei. Um agradecimento à Dra. Joice Rodolpho pelo auxílio durante as leituras de citometria de fluxo. Também um agradecimento muito especial à Dra. Cynthia Castro, Dra. Jaqueline Bianchi, Dra. Luciana Camillo, Dr. Ricardo de Oliveira e à Doutoranda Yulli Albuquerque, fico muito agradecida por toda sua ajuda e seus conselhos.

A toda a equipe do departamento de Morfologia e Patologia, que estiveram à disposição quando eu precisei. Em especial ao Dr. Paulo Andrade pela ajuda, apoio e paciência.

Agradeço especialmente a minha querida amiga Thaianne Alcarde Robeldo, por me acolher no Laboratório de Imunologia Aplicada, por dividir seu conhecimento sobre a cultura de células, os experimentos, a vida acadêmica ou qualquer outro assunto. Lembro-me como se fosse ontem, quando você me acompanhou no meu primeiro experimento, e nossa primeira conversa, você sempre me ajudou e além de compreender minhas dificuldades, sempre esteve apoiando-me e acreditando em mim. Seu apoio, ajuda, nossas conversas e sua incrível

amizade fizeram desta experiência maravilhosa e inesquecível. Você é um exemplo de profissionalismo e dedicação, te admiro muito. Meu mais sincero, Obrigada!

Aos meus queridos amigos Clara Barreto Xavier dos Santos, Witer de Souza Coelho, Fabricio Alberto de Souza, Angelica Camargo dos Santos, Isabela Morales Martins e Pablo Zamora Mercado por me ouvirem nos momentos difíceis, e me apoiarem para lutar por meus sonhos, pelas noites de conversas, risadas e gordices.

A minha amiga Michelle Chung, pela amizade tão fascinante que fizemos por causa de ter que aprender a mesma língua, compartilhamos tantos momentos incríveis e engraçados, São Carlos não ia ser tão divertida, quanto foi, se não fosse por sua amizade, por ter me acolhido tão bem e me feito sentir em casa.

As minhas amigas de longa data, Angela Aliaga Belmonte, Fatima Valdez Quisbert, Gabriela Gonzales Rojas e Jinelda Poma Arias, que além da distância sempre ficaram presentes apoiando-me, obrigada por tudo.

A meu amigo Marcelo Jurado Castro pelo apoio e ajuda ao empreender esta viagem, que se transformou em uma das melhores experiências que vivenciei.

À Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo por sua ajuda e pela disponibilização de seus equipamentos, e a seu grupo de pesquisa pela ajuda, especialmente à Dra. Wanessa Altei por seus ensinamentos, assessoramento e ajuda.

À Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti pela disponibilização de seu citometro, e a seu grupo de pesquisa por auxiliar-me quando precisei, especialmente à Doutoranda Liany Johanna Luna Dulcey pela paciência nos dias das minhas leituras, à Dra. Ana Carolina Baptista Moreno Martin pelos ensinamentos e conselhos quando precisei, e à Dra. Angelina Maria Fuzer que foi parte de minha banca de qualificação, todas suas considerações, sugestões e conselhos me ajudaram bastante no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

À UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) por ter me acolhido como aluna do curso de mestrado.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) junto ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), pela concessão da bolsa de mestrado sob o edital OEA/GCUB nº 001/2018.

Agradeço à Capes pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

## RESUMO

O câncer de bexiga é considerado uma das neoplasias malignas mais agressivas devido a seu perfil de recorrência e progressão, e mesmo com a melhora nos métodos de diagnóstico e tratamento, a taxa de mortalidade não tem apresentado uma tendência de declínio nas últimas décadas a nível mundial. Nessa perspectiva, a procura e o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras é necessário. Os fitoquímicos são excelentes fontes de princípios ativos com potencial terapêutico, que têm sido usados desde há séculos com fins terapêuticos e culinários. O [6]-Shogaol é um composto fenólico extraído do rizoma do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) que tem apresentado efeitos antiproliferativos e antitumorais em uma ampla variedade de modelos de cânceres, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. No entanto, não se têm registros de estudos que relatem um efeito antitumoral em modelos celulares de câncer de bexiga. Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar o potencial citotóxico e pró-apoptótico *in vitro* do [6]-Shogaol contra células uroteliais de câncer de bexiga murinas (MB49), em relação a fibroblastos murinos não tumorais (L929). Por meio do estudo *in vitro* foi avaliado o efeito citotóxico e pró-apoptótico, mediante a análise da redução da atividade metabólica, observação de alterações morfológicas associadas a dano celular, identificação de alterações no processo de formação de colônias, avaliação do nível de espécies reativas de oxigênio intracelular, avaliação de alterações na estrutura nuclear, identificação de eventos de apoptoses e a avaliação do potencial anti-migratório. Com base nos resultados, se evidenciou que [6]-Shogaol foi capaz induzir efeitos citotóxicos que comprometeram a viabilidade celular, exibindo uma concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>) de 135,5 µM para as células tumorais MB49 e de 205,3 µM para os fibroblastos não tumorais L929, além de inibir e alterar os processos proliferativos de formação de colônias, apresentou atividade pró-apoptótica identificada pela observação de fenótipos apoptóticos, mediada pela fragmentação nuclear. Em suma, nosso estudo sugere que [6]-Shogaol provoca danos citotóxicos que comprometem a viabilidade das células tumorais murinas de bexiga MB49, de maneira dependente da concentração. Pode-se sugerir que [6]-Shogaol é promissor para delineamento em estudos mais aprofundados para compreender suas propriedades antitumorais, por ser um forte candidato fitoterápico no tratamento para o câncer de bexiga.

**Palavras-chave:** Câncer de bexiga, Citotóxico, Fitoterápico, IC<sub>50</sub>, Pró-apoptótico [6]-Shogaol.

## ABSTRACT

Bladder cancer is considered one of the most aggressive malignancies due to its profile of recurrence and progression, and even with the improvement in methods of diagnosis and treatment, the mortality rate has not shown a declining trend in recent decades worldwide. In this perspective, the search and development of more effective and safer therapeutic alternatives is necessary. Phytochemicals are excellent sources of active ingredients with therapeutic potential, which have been used for centuries for therapeutic and culinary purposes. [6]-Shogaol is a phenolic compound extracted from the rhizome of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) that has shown antiproliferative and anti-tumor effects in a wide variety of cancer models, both *in vitro* and *in vivo*. However, there are no records of studies reporting an antitumor effect in cell models of bladder cancer. Thus, this study aimed to investigate the *in vitro* cytotoxic and pro-apoptotic potential of [6]-Shogaol against murine bladder cancer urothelial cells (MB49), in relation to non-tumor murine fibroblasts (L929). Through the *in vitro* study, the cytotoxic and pro-apoptotic effect was evaluated, through the analysis of the reduction of the metabolic activity, observation of morphological alterations associated with cellular damage, identification of alterations in the process of colony formation, evaluation of the level of reactive species of intracellular oxygen, evaluation of alterations in the nuclear structure, identification of apoptosis events and assessment of anti-migratory potential. Based on the results, it was shown that [6]-Shogaol was able to induce cytotoxic effects that compromised cell viability, exhibiting an inhibitory concentration of 50% of cells (IC<sub>50</sub>) of 135,5 µM for tumor cells MB49 and 205,3 µM for L929 non tumor fibroblasts, in addition to inhibiting and altering the proliferative processes of colony formation, showed pro-apoptotic activity identified by the observation of apoptotic phenotypes, mediated by nuclear fragmentation. In summary, our study suggests that [6]-Shogaol causes cytotoxic damage that compromises the viability of MB49 murine bladder tumor cells in a concentration-dependent manner. It can be suggested that [6]-Shogaol is promising for delineation in more in-depth studies to understand its antitumor properties, as it is a strong phytotherapeutic candidate in the treatment of bladder cancer.

**Keywords:** Bladder cancer, Cytotoxic, IC<sub>50</sub>, Phytotherapeutic, Pro-apoptotic, [6]-Shogaol.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características e capacidades biológicas ( <i>Hallmarks</i> ) representativas dos tecidos cancerosos descritas por Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg (2000, 2011).....	21
<b>Figura 2.</b> Componentes da parede da bexiga urinária humana.....	24
<b>Figura 3.</b> Carcinogênese da bexiga humana a partir das vias papilar e não papilar.....	25
<b>Figura 4.</b> Estadiamento do câncer de bexiga de acordo com o sistema TNM, segundo o grau de invasão do tumor.....	29
<b>Figura 5.</b> Estágios de invasão do câncer de bexiga.....	30
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do composto [6]-Shogaol.....	37
<b>Figura 7.</b> Efeito do dissolvente dimetilsulfóxido (DMSO) sobre a viabilidade das células MB49, após 24 e 48 horas de exposição.....	46
<b>Figura 8.</b> Efeito do composto [6]-Shogaol sobre a viabilidade das células MB49 e L929 após 24 e 48 horas de exposição.....	48
<b>Figura 9.</b> Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células MB49.....	50
<b>Figura 10.</b> Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células L929.....	51
<b>Figura 11.</b> Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol sobre a formação de colônias nas células MB49, após 24 horas de exposição.....	52
<b>Figura 12.</b> Efeito do [6]-Shogaol sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células MB49 e L929.....	54
<b>Figura 13.</b> Efeitos do composto [6]-Shogaol no DNA das células MB49 e L929.....	56
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografias de eventos de apoptose e necrose detectadas pelo ensaio de coloração AO/PI nas células MB49 expostas a [6]-Shogaol por 12 horas.....	58
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografias de eventos de apoptose e necrose detectadas pelo ensaio de coloração AO/PI nas células L929 expostas a [6]-Shogaol por 12 horas.....	60
<b>Figura 16.</b> Efeito do [6]-Shogaol na indução de eventos de morte celular apoptótica e necrótica nas células MB49 e L929.....	63
<b>Figura 17.</b> Efeito do [6]-Shogaol na migração das células MB49.....	65
<b>Figura 18.</b> Resumo da atuação de [6]-Shogaol nas células de câncer de bexiga murino MB49 <i>in vitro</i> .....	74
<b>Figura 19.</b> Efeito do [6]-Shogaol sobre a viabilidade das células MB49 e L929.....	88
<b>Figura 20.</b> Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células MB49.....	89
<b>Figura 21.</b> Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células L929.....	90

**Figura 22.** Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e viabilidade das células MB49 e L929 pelo ensaio de coloração com panóptico rápido.. ..... 91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação TNM de câncer de bexiga de acordo com a American Joint Committee on Cancer (AJCC) (2017), segundo a extensão da invasão do tumor.....	28
<b>Tabela 2.</b> Valores de IC50 do [6]-Shogaol para as células MB49 e L929 após 24 e 48 horas de exposição. ....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5-ALA** – Ácido 5-levulínico (**5-Aminolevulinic Acid**)

**6S** – [6]-Shogaol

**7-AAD** – 7-Aminoactinomicina D (**7-Aminoactinomycin D**)

**ACS** – Sociedade Americana de Câncer (**American Cancer Society**)

**AJCC** – Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer (**American Joint Committee on Cancer**)

**AO** – Laranja de Acridina (**Acridine Orange**)

**AUA** – Associação Americana de Urologia (**American Urological Association**)

**BCG** – Bacilo de Calmette e Guérin (**Bacille Calmette-Guérin**)

**CAS3** – Caspase-3

**CIS** – Carcinoma *in situ* (**Carcinoma In Situ**)

**CUB** – Carcinoma Urotelial de Bexiga (**Bladder Urothelial Carcinoma**)

**DAPI** – 4',6-Diamidino-2-fenilindol (**4',6-Diamidino-2-Phenylindole**)

**DMEM** – Meio Dulbecco Modificado (**Dulbecco's Modified Eagle Medium**)

**DMSO** – Dimetilsulfóxido (**Dimethyl Sulfoxide**)

**DP** – Desvio Padrão (**Standard deviation**)

**ER** – Retículo Endoplasmático (**Endoplasmic Reticulum**)

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio (**Reactive Oxygen Species**)

**EUA** – Associação Europeia de Urologia (**European Association of Urology**)

**FBS** – Soro Fetal Bovino (**Fetal Bovine Serum**)

**GCLC** – Subunidade Catalítica de Glutamato-Cisteína Ligase (**Glutamate – Cysteine Ligase Catalytic Subunit**)

**GCLM** – Subunidade Modificadora de Glutamato-Cisteína Ligase (**Glutamate – Cysteine Ligase Modifier Subunit**)

**GE** – Extrato de Gengibre (**Ginger Extract**)

**GLOBOCAN** – Observatório Global de Câncer (**Global Cancer Observatory**)

**GST** – Glutathione S-transferase (*Glutathione S-Transferase*)

**HAL-BLC** – Cistoscopia de Luz Azul com Ácido Hexaminolevulínico (*Hexaminolevulinic Acid Blue Light Cystoscopy*)

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Pressão (*High Pressure Liquid Chromatography*)

**IC<sub>50</sub>** – Concentração Inibitória de 50% das células (*50% Inhibitory Concentration*)

**IARC** – Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

**IS** – Índice de Seletividade (*Selectivity Index*)

**MIBC** – Câncer de Bexiga Invasivo Muscular (*Muscle Invasive Bladder Cancer*)

**MTT** – Brometo de dimetiazol-difeniltetrazólio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

**MVAC** – Metotrexano, Vimblastina, Doxorrubicina e Cisplatina (*Methotrexate, Vimblastine, Doxorubicin and Cisplatin*)

**NAC** – N-Acetilcisteína (*N-Acetylcysteine*)

**NQO1** – NAD (P) H Quinona Oxidoreductase 1 (*NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1*)

**NMIBC** – Câncer de Bexiga Muscular não Invasivo Muscular (*Non Muscle Invasive Bladder Cancer*)

**OMS** – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

**PAHs** – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

**PAHO** – Organização Pan-Americana da Saúde (*Pan American Health Organization*)

**PBS** – Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

**PDD** – Diagnóstico Fotodinâmico (*Photodynamic Diagnosis*)

**PS** – Fosfatidilserina (*Phosphatidylserine*)

**PI** – Iodeto de Propídeo (*Propidium Iodide*)

**RNM** – Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)

**TC** – Tomografia Computorizada (*Computed Tomography*)

**TCC** – Carcinoma de células transicionais (*Transitional Cell Carcinoma*)

**TURBT** – Ressecção Transuretral do Tumor de Bexiga (*Transurethral Resection of the Bladder Tumor*)

**WLC** – Cistoscopia de Luz Branca (*White Light Cystoscopy*)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. O Câncer .....	20
2.2. Dados epidemiológicos.....	22
2.3. Câncer de bexiga .....	23
2.4. Fatores etiológicos associados ao câncer de bexiga .....	26
2.5. Estadiamento do câncer de bexiga.....	27
2.6. Diagnóstico do câncer de bexiga .....	30
2.7. Tratamento do câncer de bexiga .....	31
2.8. Fitoquímicos como fonte alternativa de novos fármacos antitumorais.....	33
3. OBJETIVOS .....	36
3.1. Objetivo geral .....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
4.1. [6]-Shogaol .....	37
4.2. Linhagens e cultivos celulares .....	38
4.3. Citotoxicidade do dissolvente Dimetilsulfóxido.....	38
4.4. Citotoxicidade .....	39
4.5. Índice de seletividade .....	40
4.6. Morfologia celular .....	40
4.7. Ensaio clonogênico (formação de colônias).....	40
4.8. Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	41
4.9. Ensaio de condensação e fragmentação nuclear .....	42
4.10. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica .....	42
4.11. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica por citometria de fluxo .....	43
4.12. Ensaio de migração celular ( <i>Wound Healing</i> ).....	44

4.13. Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS .....	46
5.1. Efeitos citotóxicos do dissolvente Dimetilsulfóxido.....	46
5.2. Citotoxicidade.....	47
5.3. Morfologia celular .....	49
5.4. Ensaio clonogênico.....	51
5.5. Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	53
5.6. Avaliação da condensação e fragmentação nuclear.....	55
5.7. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica .....	57
5.8. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica por citometria de fluxo .....	61
5.9. Determinação do potencial anti-migratório.....	63
6. DISCUSSÃO .....	66
7. CONCLUSÕES.....	74
8. REFERÊNCIAS.....	75
9. ANEXOS.....	88

## 1. INTRODUÇÃO.

Câncer é o nome conferido às neoplasias malignas, constituídas por células transformadas que têm seu metabolismo adaptado e as vias que regulam sua funcionalidade, para promover a iniciação e progressão de uma estrutura tumoral, as quais se caracterizam por proliferar excessivamente, e invadir tecidos adjacentes e distantes, sem responder aos mecanismos de regulação do organismo (VANDER HEIDEN; DEBERARDINIS, 2017). Segundo o relatório realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2020, foram estimados para o ano 2030 a ocorrência de 12,9 milhões de óbitos por câncer e que existirão cerca de 24 milhões de novos casos de pessoas diagnosticadas com a doença, o que traz impactos negativos à saúde pública a nível mundial (IARC, 2020).

De acordo com as estimativas apresentadas pela plataforma interativa *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) no ano de 2018, o câncer de bexiga representou cerca de 3% de todos os cânceres, sendo possível observar o impacto do câncer de bexiga em relação à ampla variedade de cânceres existentes (BRAY et al., 2018; SAGINALA et al., 2020). Segundo o estudo de Wong e colaboradores (2018), a partir das informações obtidas do banco de dados da plataforma GLOBOCAN (2012), foram estimados padrões de tendência do câncer de bexiga, tanto para a incidência, quanto para a mortalidade, e não evidenciaram uma tendência de declínio para nenhum desses indicadores para o Brasil no período 2030. Pelo contrário, de acordo com sua projeção estimaram um crescimento da taxa de incidência para 2030 de 164% em homens e de 1380% em mulheres, e em relação às taxas de mortalidade, previram que permanecerão estáveis para ambos os sexos (WONG et al., 2018).

O câncer de bexiga surge do urotélio, que recobre a superfície interna da bexiga, e se caracteriza por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade, devido a seu caráter recorrente e progressivo (KAMAT et al., 2016; SANLI et al., 2017). O câncer de bexiga caracteriza-se por afetar maioritariamente adultos com idades acima de 55 anos, porém, esta faixa etária foi diminuindo gradualmente com o decorrer dos anos, pela ampla variedade de fatores envolvidos que coadjuvam ao desenvolvimento desta neoplasia, os quais incluem os fatores ambientais e genéticos (SAGINALA et al., 2020). Outra das particularidades desta doença, é que afeta preferencialmente aos homens em relação às mulheres (4:1), não obstante, o prognóstico das mulheres com diagnóstico de câncer de bexiga é mais desfavorável, devido a uma detecção tardia, em estágios mais avançados por um mascaramento dos sinais e sintomas (BRAY et al., 2018; SAGINALA et al., 2020; WONG et al., 2018). Todas estas características e a agressividade deste câncer, o convertem em uma problemática latente a nível mundial, que é agravada pela estagnação na taxa de mortalidade

em vários países nas últimas décadas, apesar da melhora nos métodos de diagnóstico e tratamento (SAGINALA et al., 2020).

Ainda que, a maior porcentagem dos casos de câncer de bexiga no momento de seu diagnóstico, são classificados como câncer de bexiga não invasivo muscular (NMIBC – do inglês *Non Muscle Invasive Bladder Cancer*), pela ausência de invasão à camada muscular e por uma inexistência de um processo metastático, esta neoplasia é caracterizada por ser muito prevalente, recorrente e progressiva, podendo evoluir até desenvolver a doença metastática, por essas razões sua vigilância e controle devem ser rigorosos para não agravar o prognóstico da doença (TRAN et al., 2021).

Embora tenha-se observado uma melhora nas opções terapêuticas para o câncer de bexiga nas últimas décadas, existe uma alta taxa de falha dos tratamentos, pela baixa especificidade e pelos efeitos colaterais que desencadeiam, não esquecendo o custo econômico consideravelmente alto para o paciente e os sistemas de saúde (APOLO; VOGELZANG; THEODORESCU, 2015). O câncer de bexiga afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes e a maioria das opções terapêuticas que compõem os regimes de tratamento atuais comprometem consideravelmente a saúde, como por exemplo, a ressecção transuretral do tumor de bexiga, que muitas vezes deixa remanescentes celulares que podem migrar e conformar novas estruturas tumorais na bexiga. Por outro lado, as radioterapias e quimioterapias causam danos citotóxicos consideráveis em outros tecidos, chegando a induzir alterações fisiológicas que não são bem toleradas pelo organismo (APOLO et al., 2015; LEE et al., 2020; YU et al., 2019).

Apesar do progresso tanto no diagnóstico quanto nos regimes de tratamentos, sua disponibilidade, custo e efetividade são uma limitante. Por este motivo, a busca por novas alternativas terapêuticas é de extrema importância. Os produtos naturais são considerados como uma excelente fonte de compostos bioativos terapêuticos, desde tempos imemoriais têm sido usados para tratar uma ampla diversidade de doenças e padecimentos. O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), pertencente à família Zingiberaceae, é uma especiaria mundialmente empregada para o preparo de alimentos e bebidas. No entanto, também é conhecida pelos diferentes estudos que relatam suas diversas propriedades terapêuticas, que incluem ações antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, neuroprotetora, antidiabética, antinaúseas, antiemética, antiangiogênica e anticancerígena (MAO et al., 2019). O gengibre é abundante em compostos bioativos, como os gingeróis, paradóis, shogaols, zingerona, quercetina e outros (MAO et al., 2019). Um de seus compostos mais promissórios é o [6]-Shogaol (6S), o qual já demonstrou possuir uma abrangente competência como fitoterápico para diversos modelos de cânceres *in vitro* e *in vivo*, não só atuando de maneira direta na

eliminação dos tecidos neoplásicos, como também em sua sensibilização e/ou modulação, convertendo-lhe em um bom alvo de estudo dentro dos fitoterápicos (CHEN et al., 2014; RAY; VASUDEVAN; SENGUPTA, 2015; SAHA et al., 2014; ZHOU et al., 2014). Na atualidade se desconhece na literatura a existência de algum estudo que relate o uso de [6]-Shogaol como tratamento para o câncer de bexiga, e o efeito que exerce em cultivos celulares, modelos celulares ou sistemas vivos, que simulem o câncer de bexiga.

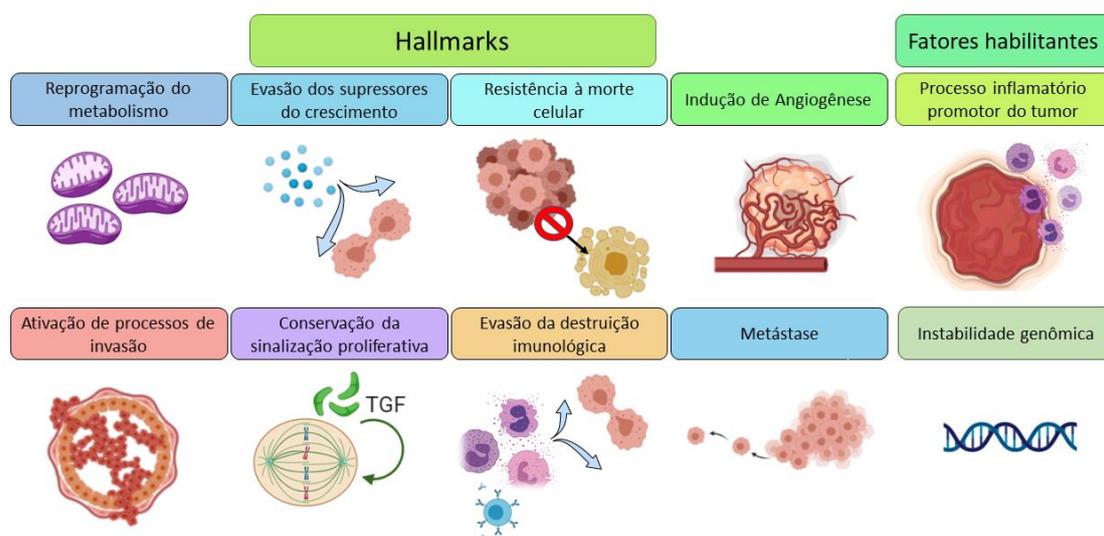
Por todas estas razões, a busca por novos medicamentos com menores efeitos colaterais e amplo perfil de segurança para o tratamento e a prevenção do câncer de bexiga é essencial. E de acordo com o fundamentado na temática já abordada, este trabalho pretende contribuir com a busca de alternativas terapêuticas para o câncer de bexiga, através da avaliação de dois aspectos principais após tratamento com [6]-Shogaol: examinar o potencial citotóxico em células murinas de câncer de bexiga (MB49) e analisar a seletividade e especificidade às células tumorais em relação a células não tumorais (fibroblastos murinos L929).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. O Câncer

O câncer é denominado como um grupo de doenças caracterizado pela presença de células anormais que têm a capacidade de sofrer uma série de divisões celulares excessivas e inadequadas (PADUCH, 2015). No entanto, essas células também são caracterizadas por carecer de uma coordenação recíproca com os tecidos circundantes, que colaboram com o estado homeostático do organismo, além de poder ser reconhecidas por sua baixa capacidade em responder aos mecanismos reguladores naturais do corpo (PADUCH, 2015). Acredita-se que o surgimento dessas células seja resultado do acúmulo de defeitos nos mecanismos de controle da divisão celular e nos sistemas de *feedback* regulatórios (HORNE; POLLICK; HENG, 2015).

As células tumorais apresentam algumas capacidades e características biológicas importantes, as quais são adquiridas durante seu desenvolvimento e que permite sua sobrevivência, proliferação e disseminação. As *hallmarks* do câncer são conhecidas como as oito capacidades biológicas adquiridas durante a oncogênese, que foram listadas como: 1) autossustentação da sinalização proliferativa; 2) evasão e insensibilidade aos supressores de crescimento; 3) resistência à morte celular permitindo a imortalidade replicativa; 4) capacidade de indução da angiogênese; 5) ativação de processos de invasão; 6) ativação de processos metastáticos; 7) apresentação de uma maior plasticidade metabólica em consequência da reprogramação do metabolismo energético, que suporta a proliferação contínua e 8) capacidade de escape da destruição pela resposta imunológica (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



**Figura 1.** Características e capacidades biológicas (*Hallmarks*) representativas dos tecidos cancerosos descritas por Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg (2000, 2011). **Fonte:** Extraído e modificado de acordo com (HANAHAN; WEINBERG, 2011), realizado com o auxílio de Biorender.

Subjacentes a estas capacidades estão dois fatores habilitantes das células cancerígenas que são: 1) A instabilidade genômica, a qual produz uma maior diversidade genética, que coadjuva à manutenção desse comportamento proliferativo exacerbado e 2) A presença de um processo inflamatório associado aos tecidos neoplásicos, que contribui ao crescimento descontrolado destas células e promove outras funções (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). No entanto, além das células tumorais, a conformação de um tecido tumoral exhibe maior complexidade, contendo um amplo repertório de células adjacentes recrutadas e consideradas como aparentemente normais, mas que contribuem de maneira passiva para a aquisição das características já mencionadas, criando um complexo e diversificado microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Por outro lado, a ocorrência de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, modificações em histonas e a atuação de RNA não codificantes, podem auxiliar no desenvolvimento e agressividade do tumor (DARWICHE, 2020). Analisando todas estas informações, é importante entender a complexidade e a variabilidade do câncer como doença para determinar com base em suas características a melhor maneira de trata-lo e, assim, produzir respostas benéficas e com uma eficácia duradoura.

## 2.2. Dados epidemiológicos

O câncer é uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo (BRAY et al., 2018; FIDLER; BRAY; SOERJOMATARAM, 2018). Segundo o último relatório fornecido pela OMS (2018) através da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), com base nas estimativas de incidência e mortalidade de câncer em sua plataforma interativa GLOBOCAN foi esperado aproximadamente 18,1 milhões de novos casos de câncer e a ocorrência de 9,6 milhões de mortes pela doença para o ano de 2018 (BRAY et al., 2018).

Na última década, de acordo com as estatísticas de mortalidade fornecidas pelo banco de dados da OMS e o banco de dados da Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO), a partir de cifras proporcionadas pelos países da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Cuba, México e Venezuela, desde 1970 até 2015, foi possível evidenciar que alguns países da América Latina vivenciaram uma diminuição da mortalidade considerável, como o México, o qual em 2019 apresentou uma das taxas mais baixas tanto para homens quanto para mulheres (63,8 / 100.000 homens e 61,9 / 100.000 mulheres) em comparação com Cuba (136,9 / 100.000 homens e 90,4 / 100.000 mulheres), que é considerado como um dos países com taxas mais elevadas de mortalidade por câncer do Continente (CARIOLI; BERTUCCIO, 2020). De acordo com os dados fornecidos por estes órgãos, é importante ressaltar que não foi identificado um declínio nos índices de mortalidade por câncer no Brasil e Cuba desde 1991 até 2019 (CARIOLI; BERTUCCIO, 2020).

De acordo com os últimos dados apresentados pela OMS na plataforma GLOBOCAN, foi estimado para o ano de 2018 a ocorrência de 549.393 novos casos de câncer de bexiga e aproximadamente 199.992 novas mortes, catalogando-o como o décimo tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado mundialmente e como o décimo terceiro câncer mais mortal. Sendo que a metade dessas mortes acontece em países com alto nível de desenvolvimento ou correspondem a países em transição econômica, segundo seus índices de desenvolvimento humano (IDH) (ANTONI et al., 2017; BRAY et al., 2018). Desses casos, a população masculina é a mais afetada, tendo uma incidência de 3 a 4 vezes maior em comparação com a população feminina (BRAY et al., 2018; DOBRUCH et al., 2016; WU, Q.; WONG; KWOK, 2020). Em particular os homens do Sul e Oeste da Europa, América do Norte, Oeste da Ásia e do Norte da África, esta disparidade de gênero pode ser observada no desenvolvimento e durante a progressão do câncer de bexiga, devido às potenciais diferenças biológicas e hormonais, como por exemplo, diferenças na desintoxicação metabólica de carcinógenos por enzimas hepáticas entre homens e mulheres, que resulta em exposição diferencial do urotélio aos carcinógenos. Além disso, foi demonstrado que os hormônios sexuais (estrógenos e andrógenos) e a expressão de seus respectivos receptores têm efeitos

biológicos no câncer de bexiga (ANTONI et al., 2017; BRAY et al., 2018; DOBRUCH et al., 2016; WU, Q. et al., 2020). Ainda que se evidencie uma maior incidência da doença no sexo masculino, foi identificado que existe maior mortalidade nas mulheres e suas porcentagens de sobrevivência são significativamente inferiores em comparação à população masculina (DONSKY et al., 2014; SCOSYREV et al., 2009; WITJES et al., 2021), e isto poderia se dever a um diagnóstico da doença em estágio avançado na maioria dos casos, além de um atraso e diferença no tratamento (DOBRUCH et al., 2016; SCOSYREV et al., 2009; WITJES et al., 2021).

Segundo os dados provenientes do IARC em 2017, foi relatado que a taxa de mortalidade nos países da América Central e América do Sul foi geralmente baixa em comparação com outras regiões do mundo. No entanto, foi identificado um aumento da mortalidade nos últimos anos para ambos sexos em alguns países como Cuba e Brasil (ANTONI et al., 2017; SANLI et al., 2017).

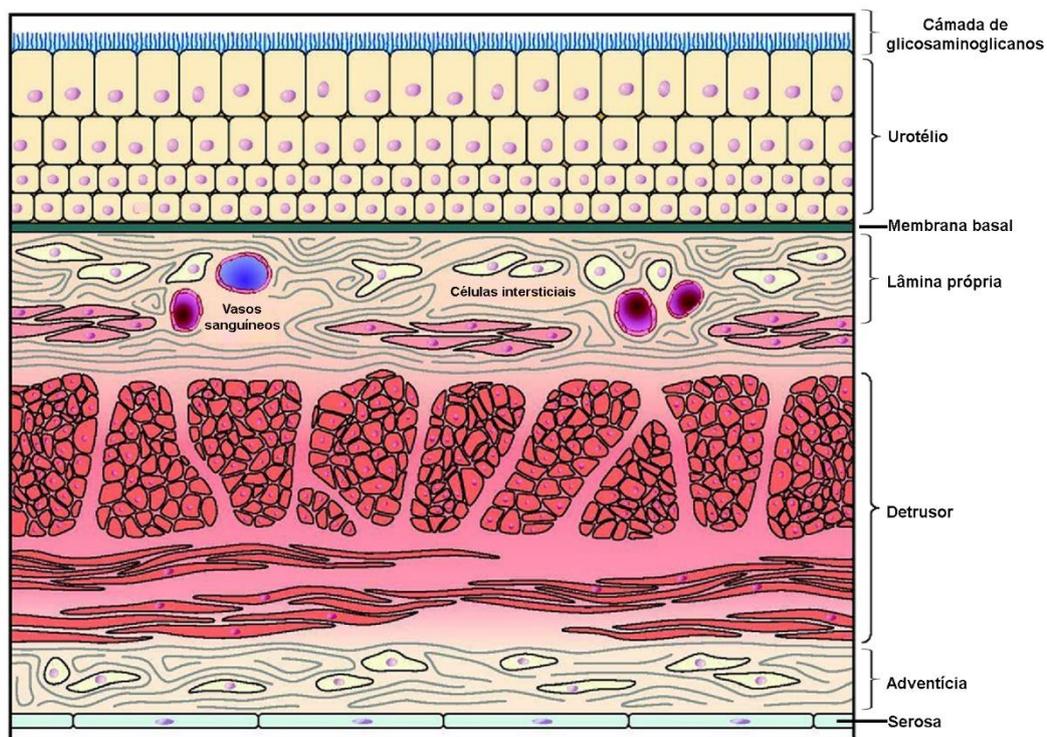
De acordo com as informações apresentadas por Antoni et al. (2017) e pelos dados obtidos do Banco de Dados do Sistema Único de Saúde Brasileiro (DATASUS), entre 2008 e 2017, o número de internações hospitalares relacionadas ao câncer de bexiga aumentou de maneira significativa, de 7.277 admissões registradas no ano de 2008 para 16.547 em 2017, sendo que esse aumento poderia ser atribuído à incidência de número casos de câncer de bexiga ou a uma melhora do acesso aos sistemas de saúde e melhoras em suas notificações (TIMOTEO et al., 2020). Apesar de identificar um aparente aumento de pacientes com diagnósticos relacionados à doença, as taxas de mortalidade permaneceram aparentemente estáveis, com valores de 6,4% em 2008 e 6,6% em 2017 (TIMOTEO et al., 2020). Segundo último relatório apresentado pelo Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (2021), instituição que coadjuva ao Ministério de Saúde Brasileiro no desenvolvimento de medidas para o controle e prevenção do câncer no território nacional, estimaram para o ano 2020 a existência de 10.640 novos casos, dos quais 7.590 corresponderiam a homens e 3.050 a mulheres, também previram a ocorrência de 4.517 mortes por esta neoplasia, sendo que 3.115 seriam homens e 1.402 mulheres (INCA, 2021).

### **2.3. Câncer de bexiga**

A bexiga é um compartimento que tem como função o armazenamento da urina, formado por uma camada epitelial no lúmen (urotélion), que atua como uma barreira que impede a urina adentrar na cavidade corporal, sendo rodeada por tecido conjuntivo e tecido

muscular, os quais atuam nos processos de contração que permitem o transporte e expulsão da urina (Figura 2) (ABBAOUI et al., 2018; ORABI et al., 2013).

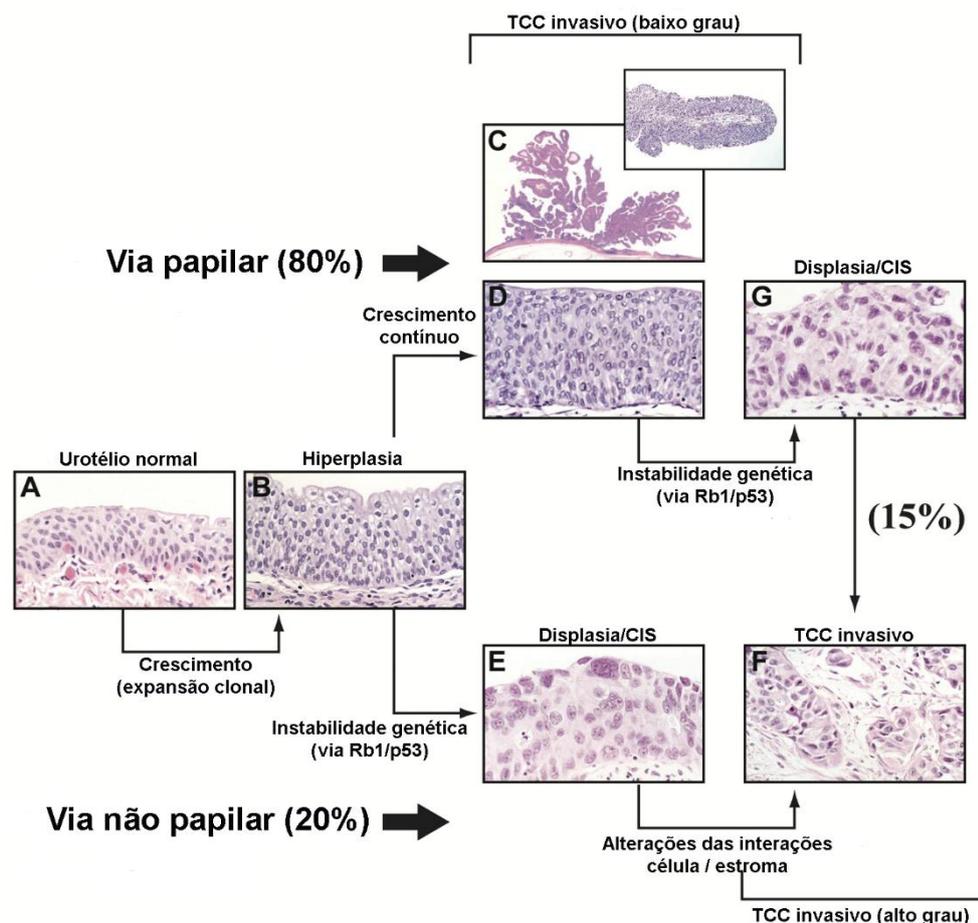
O urotélio reveste diferentes órgãos do trato urinário e localiza-se na interface entre o espaço urinário e os tecidos subjacentes, e por conta da sua localização, atua como uma barreira que modula o fluxo de água, a penetração de microrganismos patogênicos e substâncias de descarte presentes na urina (KHANDELWAL; ABRAHAM; APODACA, 2009; WU, X.-R., 2009). O tecido urotelial, por sua vez, é formado por um epitélio estratificado composto por células, que podem apresentar diferenças fenotípicas, que são atribuídas ao grau de diferenciação de cada um. Dessa forma, as células da camada basal são indiferenciadas, seguidas pelas células intermediárias e, finalmente, células superficiais sendo completamente diferenciadas e incapazes de proliferar em condições normais (Figura 2) (KHANDELWAL et al., 2009; WU, X.-R., 2009).



**Figura 2.** Componentes da parede da bexiga urinária humana. **Fonte:** Extraído e adaptado de (BIRDER; ANDERSSON, 2013).

Câncer de bexiga é o nome atribuído às neoplasias derivadas do revestimento epitelial transicional da bexiga (urotélio), e histopatologicamente são classificadas em: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células pequenas e, em sua maioria, por carcinoma de células transicionais ou uroteliais (TCC) (ABBAOUI et al., 2018; SANLI et al., 2017).

No entanto, o carcinoma urotelial também pode ser subdividido em duas variantes, a partir de duas potenciais vias patogênicas de desenvolvimento: papilar e não papilar (Figura 3) (DINNEY et al., 2004; SANLI et al., 2017). Os cânceres uroteliais derivados de lesões papilares exofíticas são qualificados como câncer de bexiga não invasivo muscular (NIMBC) e originam-se a partir do epitélio hiperplásico, caracterizando-se por abranger 80 até 85% dos carcinomas uroteliais, com 70% de probabilidade de recorrência e de 10 até 20% de possibilidade de progredir para a doença invasiva (ABBAOUI et al., 2018; DINNEY et al., 2004; SANLI et al., 2017). Por outro lado, os cânceres uroteliais originados a partir de lesões não papilares, como a displasia grave ou carcinoma *in situ* (CIS), são qualificados como câncer de bexiga invasivo muscular (MIBC – do inglês *Muscle Invasive Bladder Cancer*) e são conhecidos por ter risco de aproximadamente 50% de desenvolver metástase, e sobrevida de aproximadamente 6% em 5 anos (ABBAOUI et al., 2018; DINNEY et al., 2004; SANLI et al., 2017) É importante mencionar que os mecanismos de carcinogênese molecular são distintos para os cenários não invasivo e invasivo (Figura 3).



**Figura 3.** Carcinogênese da bexiga humana a partir das vias papilar e não papilar. A expansão clonal contínua de um clone pré-neoplásico com alterações fenotípicas mínimas induz o desenvolvimento de tumores papilares de baixo grau (via papilar). Por outro lado, os subclones de tecidos hiperplásicos caracterizados pela instabilidade genética (alteração das vias p53 e Rb1) induzem o desenvolvimento de tumores invasivos de alto grau (via não papilar). (A) urotélio normal; (B) hiperplasia urotelial; (C, D)

tumor superficial de baixo grau com fenótipo hiperplásico; (E) displasia intra-urotelial / carcinoma *in situ*; (F) carcinoma não papilar invasivo de alto grau; (G) displasia intra-urotelial severa / carcinoma *in situ*.  
**Fonte:** Extraído e adaptado de (DINNEY et al., 2004).

#### 2.4. Fatores etiológicos associados ao câncer de bexiga

Antes de mencionar os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de bexiga, é importante considerar que sua carcinogênese se desenvolve a partir da interação entre dois elementos imprescindíveis, seja qual for o fator de risco, que são: a exposição ambiental e a susceptibilidade genética, considerando que a exposição ambiental poderia abarcar uma ampla série de fatores (BABJUK, MARKO, 2017).

Dessa forma, o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga é o tabagismo (ANTONI et al., 2017; BABJUK, MARKO, 2017; BRAY et al., 2018; CUMBERBATCH et al., 2018; TEOH et al., 2020; WU, Q. et al., 2020). Considera-se que os fumantes ativos possuem uma taxa de risco 2,5 vezes maior de desenvolver esse tipo de câncer, em comparação com os não fumantes, uma vez que o tabaco é uma fonte rica de compostos cancerígenos, como aminas aromáticas, os quais geram quebras da dupla fita do DNA, modificações de bases e formação adutores de DNA (ANTONI et al., 2017; BABJUK, MARKO, 2017; BRAY et al., 2018; CUMBERBATCH et al., 2018). No entanto, outro fator de risco associado com o surgimento do câncer de bexiga (carcinoma urotelial e carcinoma de células escamosas) é uma das esquistossomoses, essa doença, neste caso, causada pelo parasita *Schistosoma haematobium* que afeta o trato urinário. Um exemplo dessa possível relação é a alta incidência de câncer de bexiga no Egito, onde esta doença é endêmica (ANTONI et al., 2017; BABJUK, MARKO, 2017; CUMBERBATCH et al., 2018; WITJES et al., 2021). Outro fator predisponente para oncogênese da bexiga é a exposição a agentes cancerígenos como: hidrocarbonetos aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), metais pesados e outros compostos químicos que afetam os trabalhadores das indústrias têxtil, da pintura, da borracha e alumínio (ANTONI et al., 2017; BRAY et al., 2018; CUMBERBATCH et al., 2018; REED et al., 2020). No entanto, apesar de ser difícil avaliar os impactos ocasionados por essas exposições, existem diversos exemplos que apresentam a possível relação causal, como a associação de altos níveis de arsênico na água potável da cidade de Antofagasta, no Chile, onde foi evidenciada uma relação dose-resposta entre o aumento da concentração de arsênico e o aumento da probabilidade de desenvolver câncer de bexiga (ANTONI et al., 2017; MARSHALL et al., 2007; STEINMAUS et al., 2013).

A alta incidência de câncer de Bexiga em países com índices de desenvolvimento humano (IDH) alto e médio, como os países do Sul e Oeste da Europa e América do Norte

pode estar associada com uma transição do perfil de ocorrência do câncer, no qual se observa uma diminuição dos casos relacionados com infecções, mas esta, por sua vez, é compensada pelo aumento dos casos relacionados aos efeitos da industrialização (BRAY et al., 2018; FIDLER et al., 2018; LORTET-TIEULENT; GEORGES; BRAY, 2020).

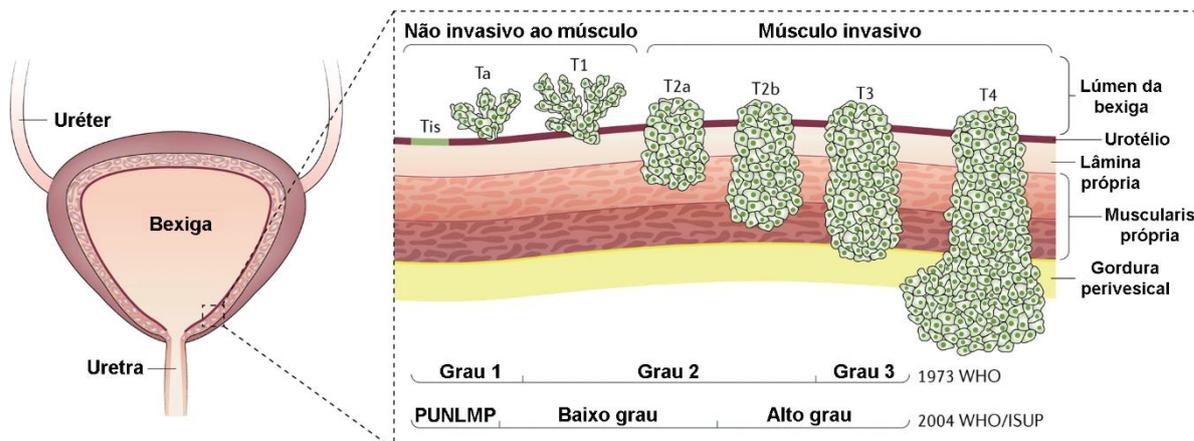
## **2.5. Estadiamento do câncer de bexiga**

O câncer de bexiga é classificado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), de acordo com o estadiamento tradicional TNM (tumor, nódulo, metástase) em: 1) estágio N na ausência ou presença de metástases nodais, 2) estágio M na existência ou não de metástase distante e, 3) estágio T dependendo da profundidade da invasão do tumor primário no músculo profundo (detrusor ou próprio) (Tabela 1) (BABJUK, M. et al., 2017; BABJUK, MARKO et al., 2019; MATULEWICZ; STEINBERG, 2020). A partir desta última categoria, o câncer de bexiga pode ser subclassificado segundo o grau de invasão na musculatura própria e o comprometimento local em: 1) câncer de bexiga não invasivo muscular e 2) câncer de bexiga invasivo muscular (Figura 4) (MATULEWICZ; STEINBERG, 2020).

**Tabela 1.** Classificação TNM de câncer de bexiga de acordo com a *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (2017), segundo a extensão da invasão do tumor.

<b>ESTÁGIO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
<b>T</b>	<b>Tumor primário</b>
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
TA	Carcinoma papilar não invasivo
TIS / CIS	Carcinoma <i>in situ</i> (tumor plano)
T1	Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2	Tumor que invade músculo
	T2a Tumor que invade músculo superficial (metade interna) T2b Tumor que invade músculo profundo (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido perivesical
	T3a Microscopicamente T3b Macroscopicamente (massa extravescical)
T4	Tumor que invade qualquer dos seguintes órgãos: estroma da próstata, vesículas seminais, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal
	T4a Invade o estroma da próstata, vesículas seminais, útero ou vagina T4b Invade parede pélvica ou abdominal
<b>N</b>	<b>Linfonodos regionais</b>
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase de linfonodo regional
N1	Metástase de um único linfonodo na pelve (hipogástrica, obturadora, ilíaco externa ou pré-sacral)
N2	Metástase em vários linfonodos na pelve (hipogástrica, obturadora, ilíaco externa ou pré-sacral)
N3	Metástase em linfonodo (s) ilíacos comuns
<b>M</b>	<b>Metástase distante</b>
M0	Sem metástase distante
M1A	Linfonodos não regionais
M1B	Outras metástases distantes

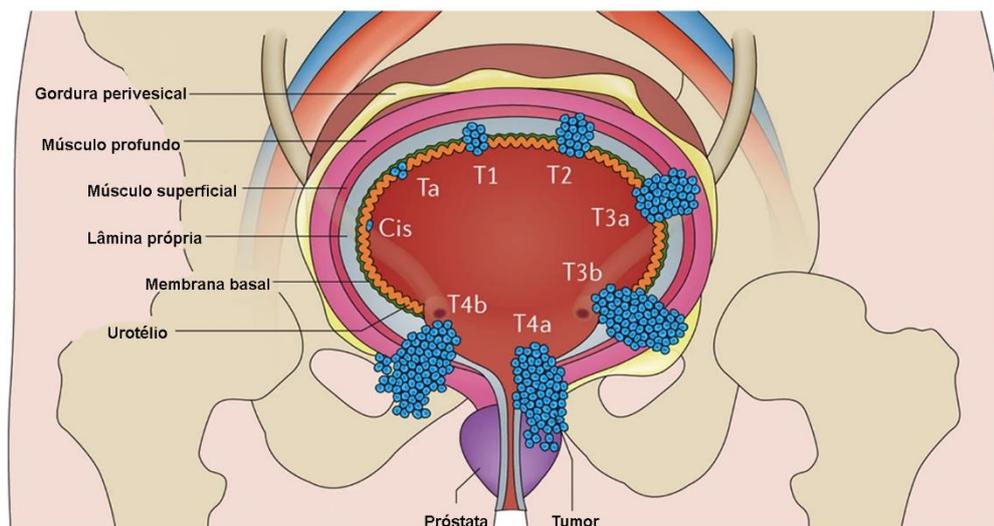
**Fonte:** Extraído e adaptado de (BABJUK, MARKO et al., 2019).



**Figura 4.** Estadiamento do câncer de bexiga de acordo com o sistema TNM, segundo o grau de invasão do tumor. Sendo: PUNLMP, neoplasia papilar urotelial de baixo potencial maligno; 1973 WHO, classificação antiga do câncer de bexiga da OMS de 1973; 2004 WHO/ISUP, nova classificação histológica do câncer de bexiga realizada pela OMS e a Sociedade Internacional de Patologia Urológica. **Fonte:** Extraído e adaptado de (SANLI et al., 2017).

A variante de câncer de bexiga não invasivo muscular afeta a aproximadamente 75% dos pacientes e é caracterizada por localizar-se na região da mucosa e a submucosa da bexiga, onde geralmente pode ser tratada de maneira local (CUMBERBATCH et al., 2018). Ainda, dentro da subclassificação do câncer não invasivo muscular, se encontram: 1) tumores papilares confinados à mucosa, os quais são estratificados como Ta; 2) tumores que invadem a lâmina própria que são categorizados como T1 e; 3) tumores planos de alto grau confinados à mucosa que são categorizados como CIS (Tis) (BABJUK, M. et al., 2017; BABJUK, MARKO et al., 2019; MATULEWICZ; STEINBERG, 2020).

Em contraste, o câncer de bexiga invasivo muscular afeta aproximadamente 25% dos pacientes com carcinoma urotelial e esta subclassificação envolve aos estágios T2a, T2b, T3a, T3b, T4a e T4b (Figura 5), sendo estes caracterizados por apresentar um alto grau de progressão a estágios mais avançados da doença e por exibir refratarismo, duas características que explicam sua alta taxa de mortalidade (CUMBERBATCH et al., 2018; WITJES et al., 2021).



**Figura 5.** Estágios de invasão do câncer de bexiga. **Fonte:** Extraído e adaptado de (COMPÉRAT et al., 2018).

## 2.6. Diagnóstico do câncer de bexiga

O diagnóstico do câncer de bexiga pode ser realizado a partir das informações proporcionadas por uma série de exames como: 1) cistoscopia, a qual confirma de maneira visual a presença de alterações morfológicas macroscópicas ou lesões associadas ao câncer na bexiga, como o local, tamanho, número, aparência e a presença de anormalidades na mucosa; 2) ressecção transuretral do tumor de bexiga (TURBT), o qual tem a finalidade de remover as lesões visíveis, que serão posteriormente analisadas histologicamente e proporcionarão informações relevantes como a descrição do grau do tumor, profundidade da invasão, localização, multiplicidade, aparência, comprometimento do músculo detrusor e alterações associadas às mucosas, sendo recomendável que se realizem biópsias do urotélio de aparência anormal durante este procedimento e; 3) Análise da imagem em corte transversal, que permite evidenciar a existência de metástase, sendo a urografia por tomografia computadorizada (TC) ou por ressonância magnética nuclear (RNM) as análises mais frequentemente realizadas para avaliar o trato superior concomitante com os órgãos abdominopélvicos e os linfonodos (BABJUK, M. et al., 2017; BABJUK, MARKO et al., 2019; MATULEWICZ; STEINBERG, 2020; WITJES et al., 2021).

No entanto, novos métodos diagnósticos estão disponíveis e permitem uma visualização mais sensível das alterações morfológicas associadas ao câncer, como o diagnóstico fotodinâmico (PDD), que se baseia na realização de uma cistoscopia de fluorescência com ácido 5- aminolevulínico (5-ALA) ou ácido hexaminolevulínico (HAL-BLC). Em comparação com a cistoscopia de luz branca tradicional (WLC), a cistoscopia de fluorescência demonstra

sensibilidade aprimorada na detecção de carcinoma *in situ* (CIS) e é capaz de detectar tumores primários adicionais (BABJUK, M. et al., 2017; BABJUK, MARKO et al., 2019; MATULEWICZ; STEINBERG, 2020; WITJES et al., 2021). Esta série de exames diagnósticos são muito importantes pela capacidade de determinar o prognóstico e o possível tratamento, já que dependendo da classificação e estadiamento do câncer de bexiga, existem diversas opções terapêuticas que poderiam incluir: cirurgia, terapia intravesical, terapia radical com quimioterápicos, imunoterapia e/ou radioterapia (WITJES et al., 2021; WU, Q. et al., 2020).

## 2.7. Tratamento do câncer de bexiga

Segundo recomendações realizadas pela *European Association of Urology* (EUA), para o tratamento do câncer de bexiga e dependendo de sua classificação, são sugeridas uma série de diretrizes clínicas, que têm a finalidade de ajudar a direcionar as decisões em relação aos possíveis tratamentos (BABJUK, M. et al., 2017). A identificação do prognóstico dos pacientes com câncer de bexiga em grupos de baixo, intermediário e alto risco é fundamental para a recomendação dos tratamentos (BABJUK, MARKO et al., 2019; MATULEWICZ; STEINBERG, 2020).

O câncer de bexiga não invasivo muscular é uma subclassificação heterogênea do carcinoma urotelial e o tratamento mais comumente utilizado é a ressecção transuretral das con formações tumorigênicas, impedindo que elas invadam o revestimento muscular da bexiga (WU, Q. et al., 2020). Além do procedimento cirúrgico, frequentemente é recomendado a implantação de tratamentos adjuvantes como a terapia intravesical, na qual poderiam ser administrados quimioterápicos ou drogas imunoterapêuticas como o bacilo Calmette-Guérin (BCG) (BABJUK, M. et al., 2017; BABJUK, MARKO et al., 2019; HORWICH et al., 2019; WU, Q. et al., 2020). Nos casos de tumores de alto risco, estas terapias tentam reduzir as taxas de recorrência e progressão, atuando nas células cancerígenas remanentes da ressecção transuretral (BABJUK, M. et al., 2017; MATULEWICZ; STEINBERG, 2020; WU, Q. et al., 2020).

O tratamento adjuvante é definido como qualquer agente administrado após o tratamento primário, o qual tem como objetivo reduzir os riscos de recorrência e progressão, dentre os quais encontram-se os agentes intravesicais e as imunoterapias com inibidores de *checkpoint* sistêmico (MATULEWICZ; STEINBERG, 2020). Os tratamentos adjuvantes intravesicais podem ser divididos pelo tempo e sequência de administração em: 1) perioperatório, o qual é administrado dentro das 24 horas da TURBT; 2) indução, denominado assim, por iniciar o curso de administração do agente terapêutico e; 3) manutenção, que

abrange as administrações subsequentes que são realizadas com o fim de não ter evidência da doença após da TURBT e o tratamento de indução (MATULEWICZ; STEINBERG, 2020). Outro tipo de categorização das terapias intravesicais as divide em: quimioterápicos e imunoterápicos. Os quimioterápicos são amplamente usados e podem ser administrados individualmente ou em combinação, e dentre eles se encontram: mitomicina C, gencitabina, epirrubicina, docetaxel, doxorubicina, valrubicina, cisplatina e tiotepa. São exemplos de imunoterápicos o BCG, que é uma cepa atenuada de micobactéria (*Mycobacterium bovis*), e o interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), mas o uso deste último é mais limitado (MATULEWICZ; STEINBERG, 2020).

Entre um dos tratamentos imunoterápicos amplamente recomendados para o câncer de bexiga, em estágio inicial com resultados muito promissórios está a vacina BCG, a qual foi desenvolvida no início dos anos 20 do século passado para a prevenção da tuberculose. No entanto, seu uso como tratamento para o câncer de bexiga foi evidenciado no estudo de Morales e colaboradores (1976), no qual relataram que evidenciaram resultados promissórios, após a administração intravesical do BCG em pacientes com tumores de bexiga superficiais e recorrentes (GALON; BRUNI, 2020). Posteriormente, foi identificado que o uso da fibronectina era essencial por mediar a internalização do BCG dentro das células tumorais e para obter melhores resultados era necessária sua incorporação no tratamento (GALON; BRUNI, 2020). Este tratamento é capaz de induzir um aumento da apresentação de antígenos às células pertencentes à imunidade celular como os linfócitos T citotóxicos, e também induz um aumento nos mediadores pró-inflamatórios após a administração de mais doses (GALON; BRUNI, 2020). Apesar dos resultados promissórios da imunoterapia com BCG em estágios iniciais, no caso dos pacientes com tumores estratificados como de alto risco, há evidências de que uma parcela dos pacientes podem não responder ao tratamento ou apresentar intolerância ao BCG e exibir efeitos colaterais, como efeitos irritativos locais ou inclusive a apresentação de toxicidade sistêmica (BABJUK, M. et al., 2017; BABJUK, MARKO et al., 2019; O'DONNELL, 2009).

Por outro lado, as opções terapêuticas para os pacientes com diagnóstico de câncer de bexiga invasivo muscular são limitadas e se baseiam na cistectomia radical, acompanhada de linfadenectomia estendida no caso de comprometimento nodal e a administração de quimioterapia sistêmica neoadjuvante à base de cisplatina, a qual é considerada como o tratamento padrão por seus resultados na melhora da sobrevida dos pacientes (HORWICH et al., 2019; WITJES et al., 2021; WU, Q. et al., 2020). No caso da administração da quimioterapia sistêmica adjuvante, os quimioterápicos mais utilizados são as combinações de: 1) cisplatina e gencitabina, 2) carboplatina e gencitabina e 3) metotrexano, vimblastina, doxorubicina e cisplatina (MVAC). No entanto, outra alternativa adjuvante são regimes

combinados de quimioterapia e radioterapia (WU, Q. et al., 2020). Porém, apesar da quimioterapia à base de cisplatina ser o tratamento padrão para cânceres de bexiga invasivos e metastáticos, uma grande proporção desses pacientes apresentam resistência a estas drogas e não são compatíveis com este tipo de tratamento, sendo recomendado o uso de regimes de imunoterapia, baseada em moléculas inibidoras de ponto de controle imunológico, como por exemplo: atezolizumabe, pembrozumabe, avelumabe, nivolumabe e durvalumabe (HORWICH et al., 2019; WU, Q. et al., 2020).

Uma vez que o câncer de bexiga possui alto grau de recorrência e progressão, o atraso no diagnóstico da doença poderia, por sua vez, diminuir a eficácia do tratamento e, conseqüentemente, diminuir as chances de sobrevivência do paciente (BABJUK, M. et al., 2017; BABJUK, MARKO et al., 2019).

## **2.8. Fitoquímicos como fonte alternativa de novos fármacos antitumorais**

O câncer de bexiga é um problema significativo para a saúde pública a nível mundial, devido a sua alta incidência, prevalência, perfil de recorrência e risco de mortalidade, além dos altos custos que seus cuidados médicos implicam (ABBAOUI et al., 2018). Atualmente o tratamento do câncer de bexiga é baseado na remoção cirúrgica do tecido neoplásico, uso de radiação e quimioterapia. No entanto, sua efetividade é limitada por diversos fatores, como por exemplo, os efeitos citotóxicos em tecidos não alvo e a diminuição da efetividade pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas células cancerígenas, estes problemas ressaltam a necessidade da procura de novos agentes anticâncer com efeitos colaterais reduzidos e que possuam uma melhor eficácia (CHOUDHARI et al., 2020).

A utilização de produtos naturais como possíveis tratamentos para uma diversificada gama de doenças é datada desde 4500 a.C. principalmente pela medicina indiana e chinesa (CHOUDHARI et al., 2020). Os compostos obtidos a partir de plantas são conhecidos como fitoquímicos ou fitofármacos e são considerados como fontes ricas para a obtenção de novos medicamentos para a terapia do câncer (CHOUDHARI et al., 2020; WU, Q. et al., 2020) Entre uma das qualidades que alguns fitoquímicos apresentam está a segurança que possuem dependendo da concentração e as condições de administração, além de sua capacidade de atingir diversos tipos de células cancerígenas, incluindo as células tronco cancerosas (CSC), uma população de células com capacidade de auto-renovação, diferenciação, indução e sustentação da carcinogênese e com um perfil de resistência aos medicamentos elevados (DANDAWATE et al., 2016).

Devido à evolução dos conhecimentos nas áreas de química orgânica e a análise química, numerosos princípios ativos puderam ser isolados, purificados e caracterizados a partir das plantas, impulsionando a descoberta de medicamentos, o que levou a um importante avanço na área médica (CHOUDHARI et al., 2020). Segundo as estatísticas apresentadas no estudo de Newman e colaboradores (2020), do total de fármacos aprovados no período de 1981 até 2019, 15,4% corresponde a compostos anticancerígenos e uma porcentagem considerável deles são derivados de produtos naturais (NEWMAN, 2020; WU, Q. et al., 2020).

Estudos sugerem que dietas ricas em fitoquímicos estão associadas com uma redução do risco de desenvolver câncer de bexiga, por exemplo, os isotiocianatos (ITC) derivados de vegetais crucíferos como os brócolis, apresentam um potencial anticancerígeno promissor frente ao carcinoma de células transicionais (TCC). Estes fitoquímicos induzem a atividade enzimática de fase II, que involucra a ação das enzimas glutathione S-transferase (GST) e NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1), atividade que incita uma desintoxicação dos agentes cancerígenos e oxidantes (ABBAOUI et al., 2018). Este potencial também foi evidenciado em linhas celulares UMUC3 e T24 de carcinoma de bexiga humano, no qual doses de 7,5 até 30  $\mu\text{M}$  de isotiocianatos induzem parada do ciclo celular nas fases S e G2/M, além de incitar eventos de apoptose. Este potencial não só é limitado a ensaios *in vitro* com cultivos celulares, uma vez que também apresentam um potencial inibitório em ensaios *in vivo* com conformações neoplásicas já estabelecidas em camundongos (xenoenxertos subcutâneos UMUC3) (ABBAOUI et al., 2018).

O gengibre é amplamente utilizado na gastronomia e na medicina oriental (MAO et al., 2019). Seu uso é amplamente diversificado para o tratamento e atenuação de diferentes enfermidades, como dores de cabeça, resfriados náuseas e vômitos (MAO et al., 2019). Entre os compostos farmacologicamente bioativos que possui, pode-se citar aos compostos fenólicos pungentes, como: gingeróis, shogaols e paradóis, que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, como: antioxidante, anti-inflamatória, antiangiogênica e anticancerígena (MAO et al., 2019; ZHENG et al., 2016).

O potencial anticancerígeno do extrato de gengibre é amplamente relatado para diferentes modelos de cânceres. No estudo de Karna e colaboradores (2012) foi descrito que o extrato de gengibre (GE) apresenta um efeito citotóxico seletivo às diferentes linhagens tumorais de próstata (PC-3, LNCaP, C4-2, C4-2B e DU145), apresentando  $\text{IC}_{50}$  entre a faixa de 75 até 512  $\mu\text{g/mL}$ , em relação a linhagens controle não tumorais (PrEC, HDF), nos quais se exibem valores de  $\text{IC}_{50}$  de 1750 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Também, relataram a indução de eventos de apoptose intrínseca dependente de caspase como mecanismo

citotóxico induzido pelo GE nas células PC-3. Ademais de apresentar um potencial inibitório do crescimento em xenoenxertos de células PC-3 (modelo de adenocarcinoma de próstata humano) implantados em camundongos nude (KARNA et al., 2012).

[6]-Shogaol é um componente bioativo isolado do gengibre muito promissor devido aos diferentes estudos que relatam sua diversa variedade de atividades. Entre as atividades terapêuticas do [6]-Shogaol incluem: antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena em diversos modelos de câncer, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, estudos demonstram como um candidato potencial para o tratamento de um alto espectro de neoplasias, incluindo câncer de pulmão, leucemia, câncer de mama, câncer gástrico e câncer de próstata resistente a quimioterápicos (BAWADOOD et al., 2020; ISHIGURO et al., 2008; KIM et al., 2014; LIU, C.-M. et al., 2017; LIU, Q. et al., 2013; MAO et al., 2019).

Quanto ao potencial antitumoral de [6]-Shogaol, diversos estudos relatam sua versatilidade ao agir em diferentes modelos de câncer, através de diferentes vias celulares. Segundo o estudo de Kim e colaboradores (2014), [6]-Shogaol induz apoptose dependente de caspases efetoras e apresenta efeitos antiproliferativos através da parada do ciclo celular na fase G1 ou G2/M, dependendo da linhagem celular de câncer de pulmão em ensaios *in vitro* (KIM et al., 2014). De acordo com outro estudo, [6]-Shogaol incita eventos de apoptose dependente de caspase 3, associados à indução de estresse no retículo endoplasmático, em linhagens celulares de leucemia humana (LIU, Q. et al., 2013). Segundo Bawadood et al., (2020), [6]-Shogaol apresenta atividade terapêutica contra cultivos celulares de adenocarcinoma de mama humano e carcinoma ductal da mama triplo positivo, através de mecanismos de inibição da proliferação, parada do ciclo celular na fase G2/M para ambas linhagens celulares e estimulação de apoptose (BAWADOOD et al., 2020). A atividade antiproliferativa e inibitória descrita em diversos estudos, poderia dever-se à capacidade de [6]-Shogaol de ligar-se aos grupos sulfidríla (SH) e inibir a polimerização das tubulinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), estruturas diméricas que compõem os microtúbulos e, assim, induzir a parada da divisão celular na fase M, e uma subsequente morte celular, eventos identificados em um estudo *in vitro* de cultura de células de câncer gástrico humano (ISHIGURO et al., 2008).

Seguindo esse enfoque, o presente trabalho visou contribuir com esta busca de medicamentos anticancerígenos, através da identificação e descrição dos efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos induzidos pelo composto fenólico [6]-Shogaol, em células de câncer de bexiga murino (MB49), além de avaliar sua seletividade em relação à linhagem de fibroblastos murinos não tumorais (L929).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar os efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos do composto [6]-Shogaol, extraído do rizoma do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) em células de câncer de bexiga murino da linhagem MB49, em relação aos fibroblastos murinos não tumorais da linhagem L929.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Examinar e comparar os efeitos de [6]-Shogaol sobre a viabilidade das células de câncer de bexiga murino MB49 e os fibroblastos murinos não tumorais L929.
- Avaliar efeitos citotóxicos e citostáticos induzidos pelo composto [6]-Shogaol nas células MB49.
- Analisar os efeitos do [6]-Shogaol sobre o nível intracelular de espécies reativas de oxigênio ROS, nas células tumorais MB49 e não tumorais L929.
- Dimensionar a capacidade do [6]-Shogaol de induzir eventos de morte celular nas células MB49 e L929.
- Qualificar o potencial do composto [6]-Shogaol na inibição de processos migratórios nas células tumorais MB49.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

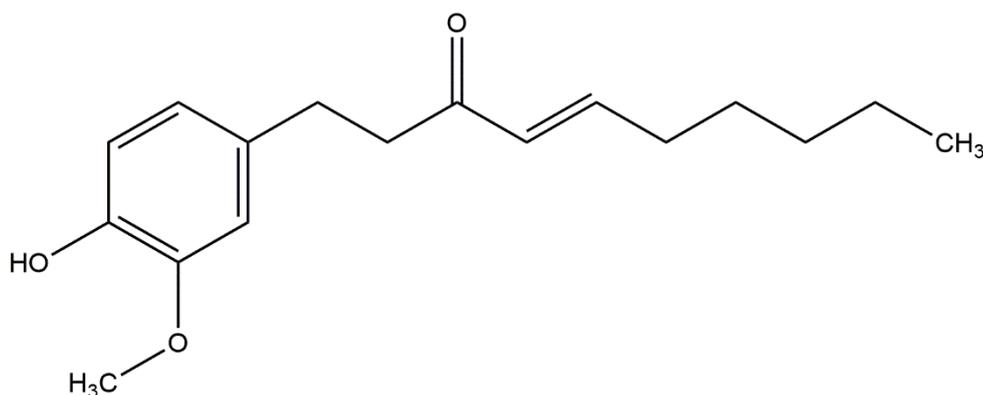
### 4.1. [6]-Shogaol

A extração, isolamento e purificação do composto [6]-Shogaol utilizado neste projeto foi realizada e disponibilizada gentilmente pelo Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio) do Departamento de Farmácia de Lagarto (DFAL) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), sob a supervisão do Prof. Dr. James Almada da Silva.

Para a extração do composto [6]-Shogaol, foram adquiridos gengibres frescos de comércios locais da cidade de Lagarto – SE. Estes rizomas foram lavados, triturados, secados a 40°C, pulverizados e, posteriormente, os pós obtidos foram tamisados e embebidos em etanol absoluto (99,8% v/v) por 72 horas, o qual foi transferido para tubos extratores do tipo Soxhlet e sistemas de cromatografia líquida clássica. O extrato obtido após filtração simples foi concentrado utilizando um evaporador rotativo e tratado por partição líquido-líquido com n-hexano, diclorometano e acetato de etila. O produto obtido a partir da fração de diclorometano foi purificado em uma coluna de fase reversa de óxido de silício (SiO<sub>2</sub>), usando n-hexano / acetato de etila 60:40 (v/v), as frações obtidas da cromatografia foram analisadas usando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em escala semi-preparativa, o comprimento de onda de detecção foi estabelecido em 282 nm e a fase móvel foi metanol / água 75:25 (v/v). A pureza do [6]-Shogaol se determinou mediante análise elemental em um equipamento EA 1108, CHNS-O (Fisons, *Thermo Scientific*), o composto foi purificado com um grau de pureza do 96%.

O procedimento de obtenção e a pureza desta molécula pode ser encontrada na informação suplementar do artigo publicado por (VILLALVILLA et al., 2014).

Para realizar os testes, as substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de até 1%. A estrutura da molécula está representada na Figura 6.



**Figura 6.** Estrutura química do composto [6]-Shogaol ((E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil) dec-4-em-3-ona).

#### 4.2. Linhagens e cultivos celulares

As células da linhagem MB49 são derivadas do tumor urotelial de bexiga de camundongo da linhagem C57BL/6 e as células da linhagem L929 são fibroblasto derivados do tecido areolar e adiposo subcutâneo normal de um camundongo macho da linhagem C3H/An de 100 dias de idade. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose* DMEM (Gibco, *Life Technologies*, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – do inglês *Fetal Bovine Serum*), 2 mM de L-glutamina, 1,5 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 1% de antibiótico penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) (JIANG et al., 2020; WHITE-GILBERTSON et al., 2016; WYŻEWSKI et al., 2019). As duas linhagens foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra, do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da UFSCar.

Ambas as linhagens foram mantidas incubadas com 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub> a 37 °C em ambiente úmido, para posteriormente serem cultivadas em garrafas de cultura ou utilizadas nos experimentos. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização a cada dois dias, utilizando 4 mL de solução de tripsina 0,025% diluída em tampão fosfato salino (PBS, 137 mM NaCl, 3,7 mM KCl, 9,13 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), que em seguida foram incubadas durante 5 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 4 mL de meio de cultura suplementado como descrito anteriormente. O sobrenadante foi removido por centrifugação a  $377 \times g$  por 5 minutos e as células ressuspendidas em 1 mL do meio DMEM suplementado. Posteriormente, as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com o auxílio da solução de azul de trypan a 0,4% (Gibco, *Life Technologies*, EUA) e utilizadas na quantidade adequada para cada experimento.

#### 4.3. Citotoxicidade do dissolvente Dimetilsulfóxido

Considerando que o composto [6]-Shogaol possui um caráter hidrofóbico, para possibilitar sua utilização, foi necessário empregar o dissolvente dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma solução homogênea. A fim de minimizar as possíveis variáveis quanto à toxicidade do composto na presença de DMSO, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando o reagente Brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT), sendo este método colorimétrico amplamente usado para estimar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983a).

Para avaliar os efeitos do DMSO nas células da linhagem MB49 e determinar a concentração máxima a ser utilizada nos diferentes experimentos, foram utilizadas 6

concentrações diferentes de DMSO: 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,1% (v/v), as quais foram diluídas em meio DMEM suplementado, os controles negativos contendo apenas o meio DMEM suplementado e controles positivos contendo uma solução de Triton X-100 (1% v/v). As células MB49 foram semeadas em placas de 96 poços estéreis (*Corning Incorporated, USA*), na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço em 200  $\mu$ L de meio e incubadas por 24 horas para sua adesão. Posteriormente, o meio foi removido e substituído por meio de cultivo fresco, contendo as diferentes concentrações de DMSO. Após o período de incubação (24 e 48 horas), o tratamento foi removido e substituído por 100  $\mu$ L/poço de uma solução de sal de tetrazólio MTT 0,5 mg/mL (dissolvida em meio DMEM suplementado sem fenol) e as placas foram incubadas por 4 horas, em seguida a solução de MTT foi retirada e substituída por 100  $\mu$ L de DMSO, para dissolver os cristais de formazan formados pelas mitocôndrias das células a partir da redução dos sais de MTT. As leituras de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro (*Thermo Multiskan GO 1510-03593, SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers RE, ver 4.1.0.43*) em comprimento de onda de 570 nm. Os dados para avaliar o efeito citotóxico das diferentes concentrações de DMSO e sua relação de dependência com o tempo de exposição, foram apresentados como a média e o desvio padrão (DP) de um experimento independente (n=5) utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0.

#### 4.4. Citotoxicidade

A análise do efeito citotóxico de [6]-Shogaol sobre a viabilidade das linhagens MB49 e L929, foi determinada pelo ensaio colorimétrico MTT (MOSMANN, 1983b; VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). Para o ensaio as células foram plaqueadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Previamente foi realizada uma solução mãe de 100 mM de [6]-Shogaol diluída em DMSO puro. Posteriormente foram preparadas as diferentes concentrações do composto [6]-Shogaol (3,9; 7,8; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000  $\mu$ M) a partir de diluições seriadas com meio de cultivo celular, contendo uma concentração final de DMSO (0,9% v/v), subsequentemente foram adicionadas aos respectivos poços e incubadas por 24 e 48 horas. Em seguida, o ensaio de viabilidade seguiu o mesmo procedimento já mencionado anteriormente. Os dados foram apresentados como a mediana e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) de três experimentos independentes. Os cálculos de IC<sub>50</sub> foram realizados usando a equação de Hill no *software* GraphPad Prism 7.0 (HE et al., 2016; NEVOZHAY, 2014).

#### 4.5. Índice de seletividade

O índice de seletividade (SI) foi calculado como a razão do valor de  $IC_{50}$  médio das células não tumorais L929 expostas a [6]-Shogaol e o valor de  $IC_{50}$  médio das células tumorais MB49 expostas ao composto (BÉZIVIN et al., 2003). A interpretação dos resultados se baseia em que, quanto maior seja o valor do índice de seletividade, o tratamento é considerado mais eficiente e seguro, sugerindo que as células tumorais são mais sensíveis aos efeitos do tratamento com [6]-Shogaol, em relação às células não tumorais.

#### 4.6. Morfologia celular

Para analisar o efeito do composto [6]-Shogaol na morfologia celular das linhagens MB49 e L929, as células foram semeadas ( $1 \times 10^4$  células/poço em 200  $\mu$ L de meio de cultivo celular) em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Após esse período de tempo, o meio de cultivo foi removido dos poços e substituído pelas diferentes concentrações de [6]-Shogaol (31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000  $\mu$ M) e os controles. As imagens foram capturadas em intervalos de tempo de 0,5, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas, com o auxílio de uma câmera fotográfica (CANON Powershot A650 IS 12,1 *Megapixels Live Resolution*) acoplada a um microscópio invertido (Carl Zeiss Primovert) (objetiva 40x). A efetividade do tratamento nesta análise foi comparada em relação ao controle negativo.

#### 4.7. Ensaio clonogênico (formação de colônias)

Este ensaio permite avaliar de maneira direta os efeitos citotóxicos e citostáticos do composto [6]-Shogaol sobre a linhagem tumoral MB49, baseando-se na capacidade proliferativa de uma única célula para se transformar em uma colônia (PUCK ; MARCUS 1956; PUCK et al., 1957).

As células da linhagem MB49 foram semeadas em placas de 6 poços (300 células / poço em 1000  $\mu$ L do meio DMEM suplementado) e incubadas durante 24 horas. Após esse período, o meio foi substituído pelas diferentes concentrações de [6]-Shogaol (15,625  $\mu$ M; 31,25  $\mu$ M e 62,5  $\mu$ M) e as células foram mantidas por 24 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Posteriormente, o tratamento foi substituído por meio fresco e as células incubadas por um período de 5 dias. Após o referido período, o meio foi removido e as células fixadas com uma solução de metanol absoluto gelado por 5 minutos e coradas com uma solução de cristal violeta 0,1% (m/v) por 1 minuto (FRANKEN et al., 2006; RAFEHI et

al., 2011) . As colônias foram contadas e seus tamanhos foram analisados com o auxílio do *software* ImageJ. Os dados foram apresentados como a média e o desvio padrão (DP) de três experimentos independentes (n=3), empregando o *software* GraphPad Prism 7.0.

#### 4.8. Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A mensuração de espécies reativas de oxigênio por meio do uso de sondas fluorescentes permeáveis às células como o 2´7´ diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) é uma forma indireta de estimar o estado redox de uma célula, o qual após penetrar dentro das células por sua característica lipossolúvel é desacetilado pela ação das estereases intracelulares, formando um produto não fluorescente DCFH, que é uma pequena molécula solúvel em água carregada negativamente, que pode ser oxidada a um composto altamente fluorescente DCF por várias espécies reativas de oxigênio (EROs) (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010; SWIFT; SARVAZYAN, 2000).

Para tanto, as células MB49 e L929 foram semeadas em placas de 96 poços (*Black Plate, Clear bottom with lid, Corning Incorporated, USA*) na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em 200 µL de DMEM suplementado, como descrito anteriormente, e foram incubadas por 24 horas. Após o período de tempo, as células foram tratadas com diferentes concentrações de [6]-Shogaol (62,5 µM e 125 µM), por 2 e 4 horas nas mesmas condições descritas acima, e no caso dos poços do controle positivo, 30 minutos antes de cumprir o tempo de exposição ao composto, foi adicionada uma solução de 10 µM e 100 µM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em seguida, os tratamentos foram removidos e as placas foram lavadas com PBS e foram adicionados 100 µL de uma solução de 100 µM de H<sub>2</sub>DCF-DA (*Sigma-Aldrich, D6883*) em meio DMEM sem fenol (sem a complementação de FBS) a cada poço e as placas foram incubadas por 30 minutos no escuro. Posteriormente, o meio com a sonda foi retirado e os poços lavados com PBS. A fluorescência foi mensurada usando leitor de microplacas multimodo SpectraMax i3 (*Molecular Devices*) com comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm. Os dados obtidos foram comparados em relação ao controle células com/sem o veículo DMSO (sem tratamento) (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010; ROYALL; ISCHIROPOULOS, 1993). Os valores de fluorescência foram analisados como a inclinação de 11 leituras de fluorescência realizadas a cada 2 minutos durante 20 minutos, tanto para o tempo de exposição de 2 e 4 horas. Os dados foram apresentados como a média e o desvio padrão (DP), empregando o *software* GraphPad Prism 7.0.

#### 4.9. Ensaio de condensação e fragmentação nuclear

Para identificar se o composto [6]-Shogaol é capaz de induzir danos à estrutura do DNA (quebras nas fitas de DNA) e, subsequentemente, apresentar a morfologia nuclear apoptótica do estágio II, que inclui a condensação da cromatina (colapso nuclear) e o encolhimento e fragmentação do núcleo (desmontagem nuclear) (IGLESIAS-GUIMARAIS et al., 2013). Foi avaliado o efeito do composto nas estruturas nucleares com o auxílio do corante fluorescente 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), o qual exibe vários tipos de ligação ao DNA e é amplamente utilizado para esse tipo de análise.

As células das linhagens MB49 e L929 foram semeadas em placas de 96 poços (*Black Plate, Clear bottom with lid, Corning Incorporated, USA*) na concentração  $5 \times 10^3$  células/poço em 200  $\mu$ L de DMEM suplementado com 10% de FBS e incubadas por 24 horas. Posteriormente as células foram tratadas com diferentes concentrações de [6]-Shogaol (15,625  $\mu$ M; 31,25  $\mu$ M; 62,5  $\mu$ M e 125  $\mu$ M) por 12 horas. Decorrido o tempo de exposição, os tratamentos foram removidos e os poços lavados cuidadosamente com PBS, em seguida, as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% (v/v) durante 10 minutos. Após esse período, as células foram coradas com 100  $\mu$ L de uma solução de DAPI (0,15  $\mu$ g/mL) diluído em PBS por 10 minutos no escuro. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e adicionados 200  $\mu$ L/poço de PBS para a análise qualitativa das imagens. Para a captura das imagens, foi utilizado o sistema automatizado de microscopia epifluorescente de alta resolução *ImageXpress<sup>®</sup> Micro (Molecular Devices, San José, CA, EUA)*, usando a objetiva 40x e o filtro azul (*DAPI*). As imagens obtidas foram comparadas em relação ao controle de células vivas (sem tratamento) e aos controles indutores de morte celular apoptótica camptotecina (100  $\mu$ M) e peróxido de hidrogênio (580 mM).

#### 4.10. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica

A capacidade do [6]-Shogaol de provocar eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica foi avaliada através do uso de marcadores fluorescentes como Laranja de Acridina (*Acridine Orange, AO*) e Iodeto de propídio (*Propidium Iodide, PI*), baseados em sua capacidade de penetração dentro das células e intercalação com o DNA nuclear, segundo o nível de integridade e permeabilidade das membranas celulares (LIU, K. et al., 2015), sendo este ensaio capaz de distinguir entre células normais, células apoptóticas precoces e tardias, e células necróticas (LIU, K. et al., 2015).

As células foram semeadas ( $5 \times 10^3$  células / poço em 200  $\mu$ L do meio DMEM) em placas de 96 poços estéreis (*Black Plate, Clear bottom with lid, Corning Incorporated, USA*) e

incubadas por 24 horas. Passado esse período, as células foram expostas a diferentes concentrações de [6]-Shogaol (15,625  $\mu$ M; 31,25  $\mu$ M; 62,5  $\mu$ M e 125  $\mu$ M,) por 12 horas nas mesmas condições descritas acima, sendo os controles positivos tratados com 100  $\mu$ M de Camptotecina e 580 mM de Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) separadamente. Após o período de tempo de exposição, os tratamentos foram removidos e as placas lavadas cuidadosamente com PBS e em seguida, adicionados 30  $\mu$ L de uma solução de 5% (v/v) de Laranja de acridina (1 mg/mL) e 5% (v/v) de Iodeto de propídio (1 mg/mL) dissolvida em PBS a cada poço. A placa foi incubada por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente, o qual posteriormente foi adicionado 150  $\mu$ L de PBS a cada poço e a solução com os corantes foi retirada. As análises das imagens com marcações fluorescentes foram realizadas com o sistema automatizado de microscopia epifluorescente de alta resolução *ImageXpress*<sup>®</sup> Micro (*Molecular Devices*, San José, CA, EUA), usando a objetiva 40x e os filtros verde FITC (Laranja de acridina) e vermelho Texas red (Iodeto de propídio). As imagens obtidas do ensaio de apoptose foram comparadas em relação ao controle de células vivas (sem tratamento) e aos controles indutores de morte celular apoptótica camptotecina (100  $\mu$ M) e peróxido de hidrogênio (580 mM), respectivamente.

#### **4.11. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica por citometria de fluxo**

Este ensaio é baseado na capacidade de ligação que possuem o complexo Ficoeritrina (PE) - Anexina-V e o corante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) às estruturas celulares alteradas durante processos de morte celular apoptótica e necrótica. Anexina-V é uma proteína que tem afinidade ao fosfolípido fosfatidilserina, encontrado predominantemente na parte interna das membranas plasmáticas eucarióticas, no entanto, durante as fases iniciais da apoptose, surge uma redistribuição de fosfolípidios e a fosfatidilserina é translocada para a parte extracelular da membrana plasmática, uma vez que nesta posição atua como uma importante sinal de marcação, que garante o reconhecimento e captação de células apoptóticas por fagócitos. Por outro lado, o corante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) possui uma afinidade de ligação ao DNA, o qual consegue entrar nas células, após a perda da integridade da membrana plasmática e cora a área nuclear, indicando um estágio mais avançado do processo apoptótico ou necrótico (COSSARIZZA et al., 2019; CHAURIO et al., 2009; KOOPMAN et al., 1994; SCHLEGEL; WILLIAMSON, 2001).

Para confirmar os dados obtidos pelas imagens do ensaio anterior, a atividade pró-apoptótica do composto [6]-Shogaol sobre as linhagens MB49 e L929, foi analisada através de citometria de fluxo utilizando o kit *PE-Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences).

As células foram semeadas ( $1 \times 10^5$  células / poço em 1000  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo celular) em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas, em seguida foram tratadas com diferentes concentrações de [6]-Shogaol (62,5  $\mu\text{M}$  e 125  $\mu\text{M}$ ) por 12 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram centrifugadas a  $320 \times g$  por 10 minutos a 4 °C e lavadas cuidadosamente com PBS, para depois serem suspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação. Em seguida, as células foram desprendidas da placa e transferidas para microtubos, os quais foram incubados a temperatura ambiente com 1  $\mu\text{L}$  de PE - Anexina-V e 1  $\mu\text{L}$  7-AAD por 15 minutos ao abrigo da luz. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas a  $320 \times g$  por 10 minutos a 4 °C e as soluções com os corantes foram descartadas cuidadosamente. Posteriormente as células foram suspensas em 300  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação (VAN ENGELAND et al., 1996). As amostras foram analisadas em um citômetro *BD Accuri C6* (BD Biosciences) e a fluorescência emitida por cada corante foi quantificada através do *software CSampler*. As análises dos Dot plots biparamétricos foram realizadas no *software FCS Express*. Os dados foram apresentados como a média e o desvio padrão (DP) empregando o *software* GraphPad Prism 7.0.

#### 4.12. Ensaio de migração celular (*Wound Healing*)

O ensaio de *Wound healing* é utilizado para avaliar a capacidade de um composto de interferir no processo migratório, permitindo apreciar a migração celular e sua biologia adjacente (JONKMAN et al., 2014; YARROW et al., 2004).

Para avaliar os efeitos de [6]-Shogaol sobre a migração celular da linhagem tumoral MB49, as células foram semeadas ( $5 \times 10^5$  células/poço em 1000  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo) em placas de 12 poços e incubadas a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Em seguida, foi realizada a sincronização e parada do ciclo celular, a fim de evitar a proliferação excessiva e, assim, apenas avaliar o efeito migratório, através da substituição do meio suplementado com 10% FBS por meio com 1% FBS e sua incubação por 24 horas (HUANG et al., 2018; TAO et al., 2017). Após esse período, com o auxílio de uma ponteira de 200  $\mu\text{L}$  e uma régua estéril, foi feito um risco na porção central de cada poço e cada poço foi lavado cuidadosamente com PBS para remover as células no sobrenadante e os fragmentos celulares remanescentes da área riscada. Então, as células foram tratadas com diferentes concentrações de [6]-Shogaol (7,8  $\mu\text{M}$ ; 15,625  $\mu\text{M}$  e 31,25  $\mu\text{M}$ ), exceto os poços controles (sem tratamento). As imagens foram capturadas em intervalos de tempo de 0, 24 e 48 horas, com o auxílio de uma câmera fotográfica (CANON Powershot A650 IS 12,1 *Megapixels Live Resolution*) acoplada a um microscópio invertido (Carl Zeiss Primovert) (objetiva 10x). A área de fechamento do risco pela migração celular foi medida através do *software ImageJ* e a porcentagem de fechamento

da ferida foi calculada comparando os tempos de 0, 24 e 48 horas, utilizando a fórmula descrita abaixo (YUE et al., 2010). Os dados foram apresentados como a média e o desvio padrão (DP) de três experimentos independentes (n=3), empregando o *software* GraphPad Prism 7.0.

$$\% \text{ fechamento da risca} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} \times (100\%)$$

Onde  $A_{t=0h}$  é a medida da área riscada imediatamente após sua realização e  $A_{t=\Delta h}$  é a área riscada medida no tempo de 24 ou 48 horas após a incubação com o composto [6]-Shogaol.

#### 4.13. Análise estatística

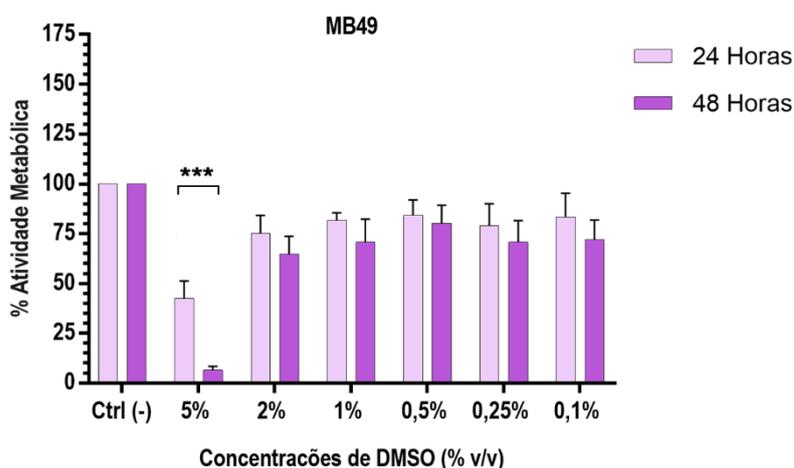
A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 7.0. Para avaliar se os dados obtidos possuem uma distribuição paramétrica foram avaliados os valores estatísticos, a frequência de distribuição em histogramas e foi aplicado o teste de normalidade Shapiro Wilk, segundo sua classificação, os dados paramétricos foram representados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP), no entanto, os dados não paramétricos foram apresentados como a mediana e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Posteriormente, para os dados paramétricos foi realizada análise de variância *One-way* ANOVA e pós-teste de Dunnett para determinar se os resultados foram estatisticamente diferentes em relação aos controles, no caso das comparações entre dois grupos foi utilizado o teste *2-way* ANOVA e pós-teste de Sidak. Já para os dados não paramétricos foram utilizados o teste de Kruskal Wallis e o pós-teste de Dunn's (*Dunn's Multiple Comparison Test*). O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%, sendo \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeitos citotóxicos do dissolvente Dimetilsulfóxido

O [6]-Shogaol é um composto promissor como agente anticancerígeno, porém a eficácia do tratamento é limitada por sua baixa solubilidade em água, e por esta razão, para seu uso é necessária a solubilização previa. Diversos estudos têm relatado o uso de DMSO como agente solubilizante, e baseados nestas informações, o mesmo foi utilizado para este fim neste estudo.

Com o objetivo de avaliar o grau de citotoxicidade do DMSO quando empregado na dissolução de [6]-Shogaol e minimizar as possíveis variáveis quanto à toxicidade do composto na presença de DMSO, diferentes concentrações foram testadas e avaliadas quanto à viabilidade da linhagem MB49. Na Figura 7, pode ser observado que apenas a concentração mais alta empregada e descrita na literatura como não citotóxica (5% DMSO) (BRANCH et al., 1994; DA VIOLANTE et al., 2002), foi capaz de causar uma diminuição significativa na viabilidade celular para ambos os tempos analisados (24 e 48 horas). Portanto, pensando em obter um composto totalmente solúvel e que apresente apenas seu efeito citotóxico, para os subsequentes ensaios foi escolhida a concentração de 0,25% v/v de DMSO, com exceção dos ensaios de viabilidade celular com MTT e análise morfológico, nos quais foi escolhida a concentração de 0,9% v/v de DMSO pela necessidade de dissolver concentrações mais altas do composto (500 e 1000  $\mu$ M) evitando usar concentrações superiores a 1%.

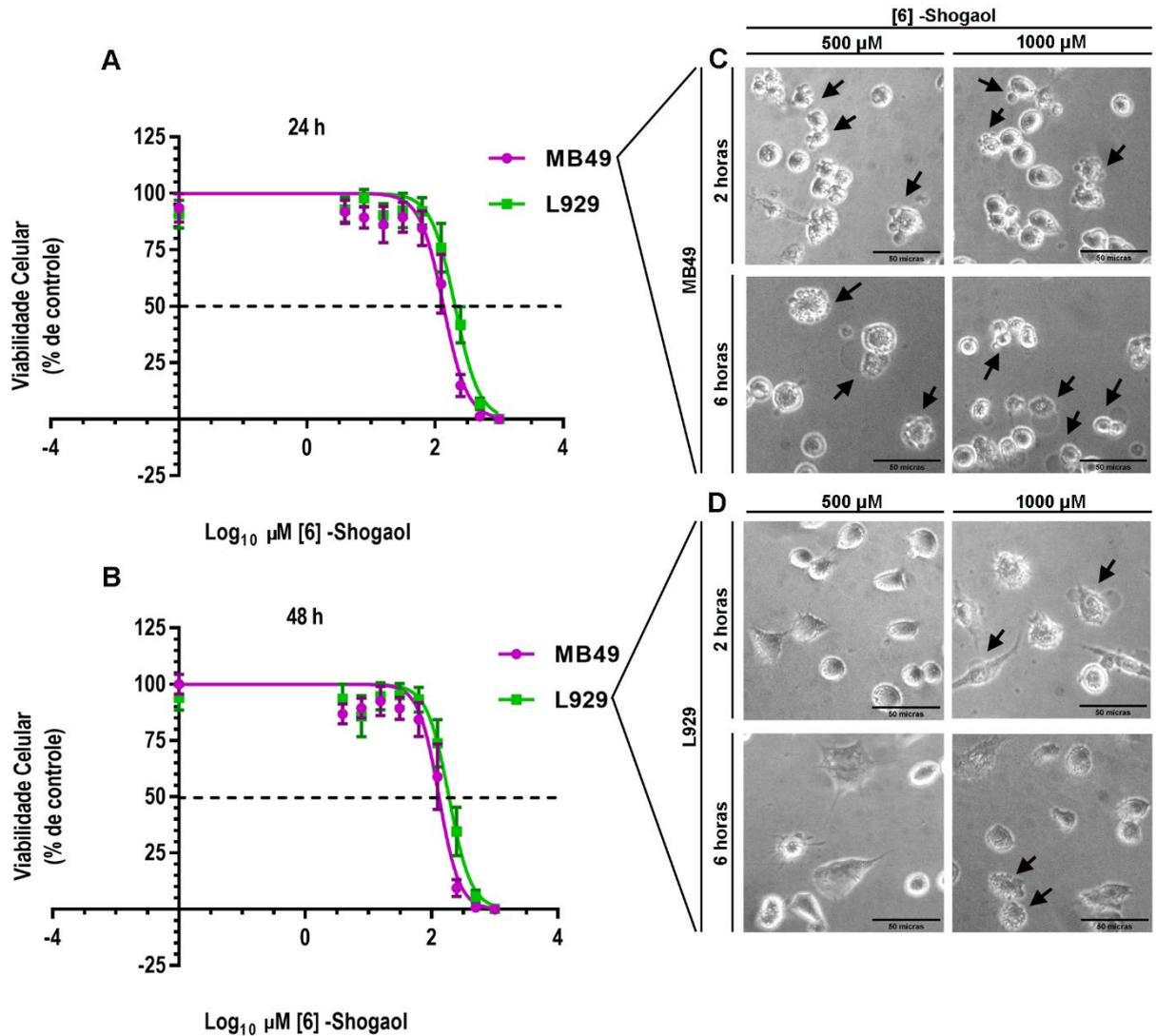


**Figura 7.** Efeito do dissolvente DMSO sobre a viabilidade das células MB49, após 24 e 48 horas de exposição. As células foram tratadas com as concentrações indicadas de DMSO por 24 e 48 horas e a porcentagem da atividade metabólica foi medida por espectrofotometria a 570 nm após incubação com a solução de MTT. Cada barra representa a média  $\pm$  DP de um experimento independente (n=5). Os dados foram considerados como paramétricos e a análise estatística foi realizada pelo teste 2-way ANOVA e pós-teste de Sidak, sendo observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos expostos a 5% (v/v) DMSO. \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5.2. Citotoxicidade

A fim de investigar os efeitos das diferentes concentrações do [6]-Shogaol sobre a viabilidade das células tumorais MB49 e não tumorais L929, foi realizado o ensaio de MTT, a partir do qual foi possível evidenciar que o [6]-Shogaol induziu danos celulares que comprometeram a funcionalidade metabólica e a viabilidade celular de ambas linhagens celulares e não se logrou evidenciar um efeito seletivo significativo às células tumorais MB49 em relação às células L929. Porém, é possível observar que as células tumorais MB49 aparentemente parecem ser um pouco mais sensíveis aos efeitos do composto, no entanto, esse efeito não é o suficientemente significativo, como para sugerir a existência de uma possível seletividade do composto às células tumorais MB49. Essa interpretação foi deduzida a partir da pouca distância da sobreposição das curvas de concentração – resposta de 24 e 48 horas de exposição ao composto (Figura 8A e 8B), pelos valores da concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ) estimados a partir das curvas e apresentados na Tabela 2 (135,5  $\mu$ M para MB49 e 205,3  $\mu$ M para L929, para 24 horas) que não eram consideravelmente diferentes, pelos valores de índice de seletividade exibidos na Tabela 2, tanto para 24 horas (1,52), quanto para 48 horas (1,44), que não foram significativamente altos, e pelas diferenças morfológicas observadas nas micrografias de ambas linhagens celulares (Figura 8C e 8D), nas quais é possível evidenciar alterações morfológicas só um pouco mais proeminentes nas células MB49 em relação às células L929. Além disso, poderíamos associar algumas dessas alterações morfológicas presentes nas células tumorais MB49 com fenótipos compatíveis aos processos de morte celular (corpos apoptóticos e oncoses), em ambas as concentrações (500 e 1000  $\mu$ M). No entanto, nas células L929 as alterações morfológicas eram reduzidas e apenas evidenciadas na concentração de 1000  $\mu$ M (eventos de oncoses).

Paralelamente foi realizado o mesmo ensaio para avaliar a existência de uma relação tempo-dependente com a citotoxicidade induzida pelo [6]-Shogaol, usando um maior período de exposição (48 horas) (Figura 8B), no qual, não foi evidenciado uma diminuição significativa do perfil de viabilidade em relação ao tempo de 24 horas (Figura 8A), tampouco foi observado uma diferença significativa nos valores de  $IC_{50}$  para ambas as células. Esses resultados foram confirmados pela proximidade dos valores do índice de seletividade (IS), tanto para o tempo de 24 e 48 horas. (Figura 19, Anexos).



**Figura 8.** Efeito do composto [6]-Shogaol sobre a viabilidade das células MB49 e L929 após 24 e 48 horas de exposição. Células MB49 e L929 expostas a diferentes concentrações de [6]-Shogaol durante 24 e 48 horas. (A, B) Gráfico do IC<sub>50</sub> das células MB49 e L929 após 24 e 48 horas de exposição ao [6]-Shogaol. Os dados representam a mediana e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) de três experimentos independentes (n=4), respectivamente. (C, D) as imagens capturadas (aumento de 400x) correspondem às células MB49 e L929 após 2 e 6 horas de exposição a 500 e 1000 µM de [6]-Shogaol. As setas indicam alterações morfológicas associadas a processos de morte celular nas primeiras horas após a exposição ao composto. Barras de escala = 50 µm. **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> do [6]-Shogaol para as células MB49 e L929 após 24 e 48 horas de exposição.

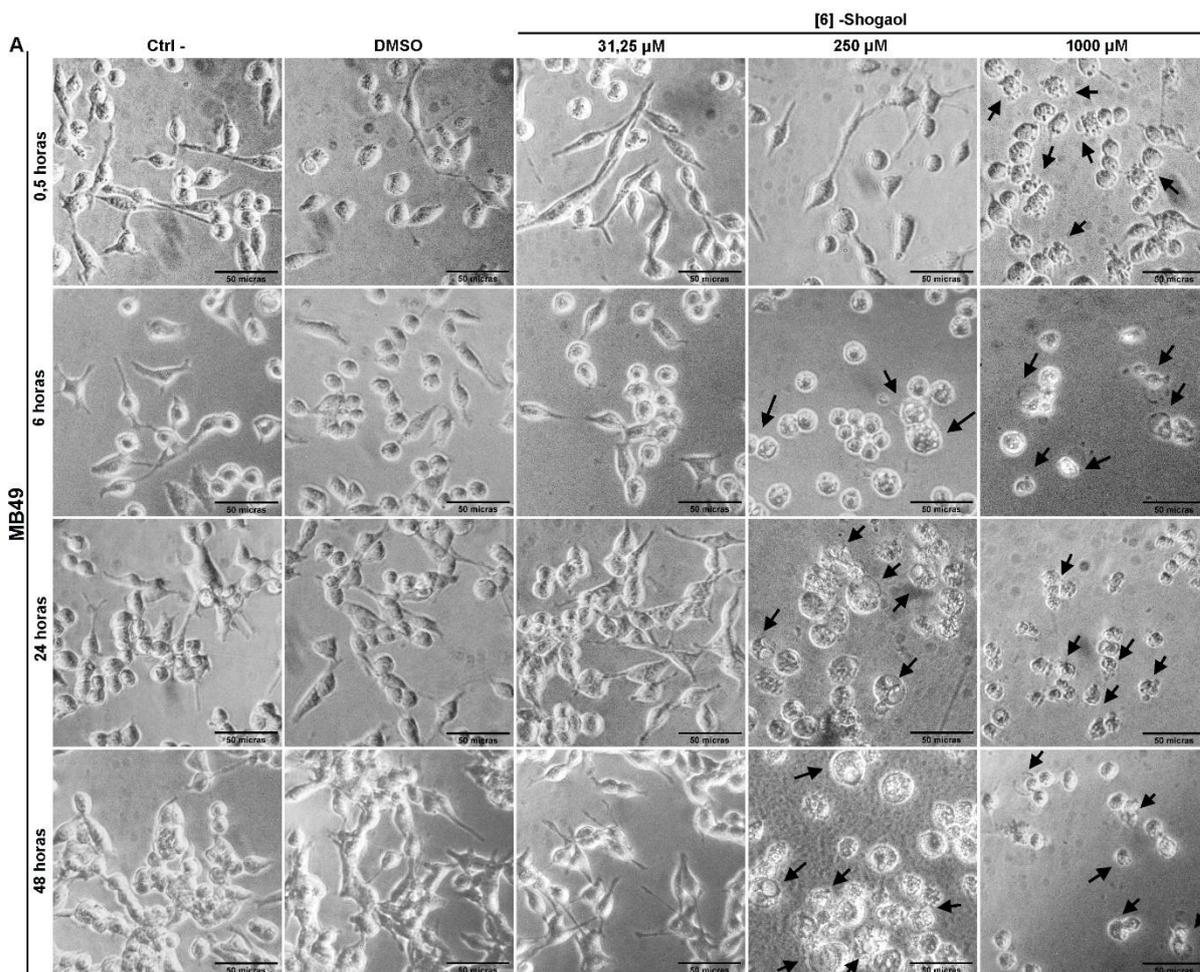
<b>IC<sub>50</sub> (µM) 24 horas</b>			
<b>Linhagem celular</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µM) ± DP</b>	<b>Intervalo de confiança 95% (µM)</b>	<b>Índice de seletividade (IS)</b>
MB49	135,5 ± 55,9	122,9 até 148,4	1,52
L929	205,3 ± 72,2	188,4 até 223,3	
<b>IC<sub>50</sub> (µM) 48 horas</b>			
<b>Linhagem celular</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µM) ± DP</b>	<b>Intervalo de confiança 95% (µM)</b>	<b>Índice de seletividade (IS)</b>
MB49	131,5 ± 37,8	120,2 até 143,2	1,44
L929	189,1 ± 44,1	172,7 até 206,8	

Os valores são expressos como o IC<sub>50</sub> ± DP de três experimentos independentes, respectivamente (n=4). IC 95% = Intervalo de confiança de 95%. DP = Desvio padrão. IS = Índice de seletividade (IC<sub>50</sub> L929 / IC<sub>50</sub> MB49). **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

### 5.3. Morfologia celular

Paralelamente ao ensaio de citotoxicidade, foram realizados os ensaios de morfologia celular para avaliar qualitativamente o efeito do [6]-Shogaol sobre as linhagens celulares em estudo.

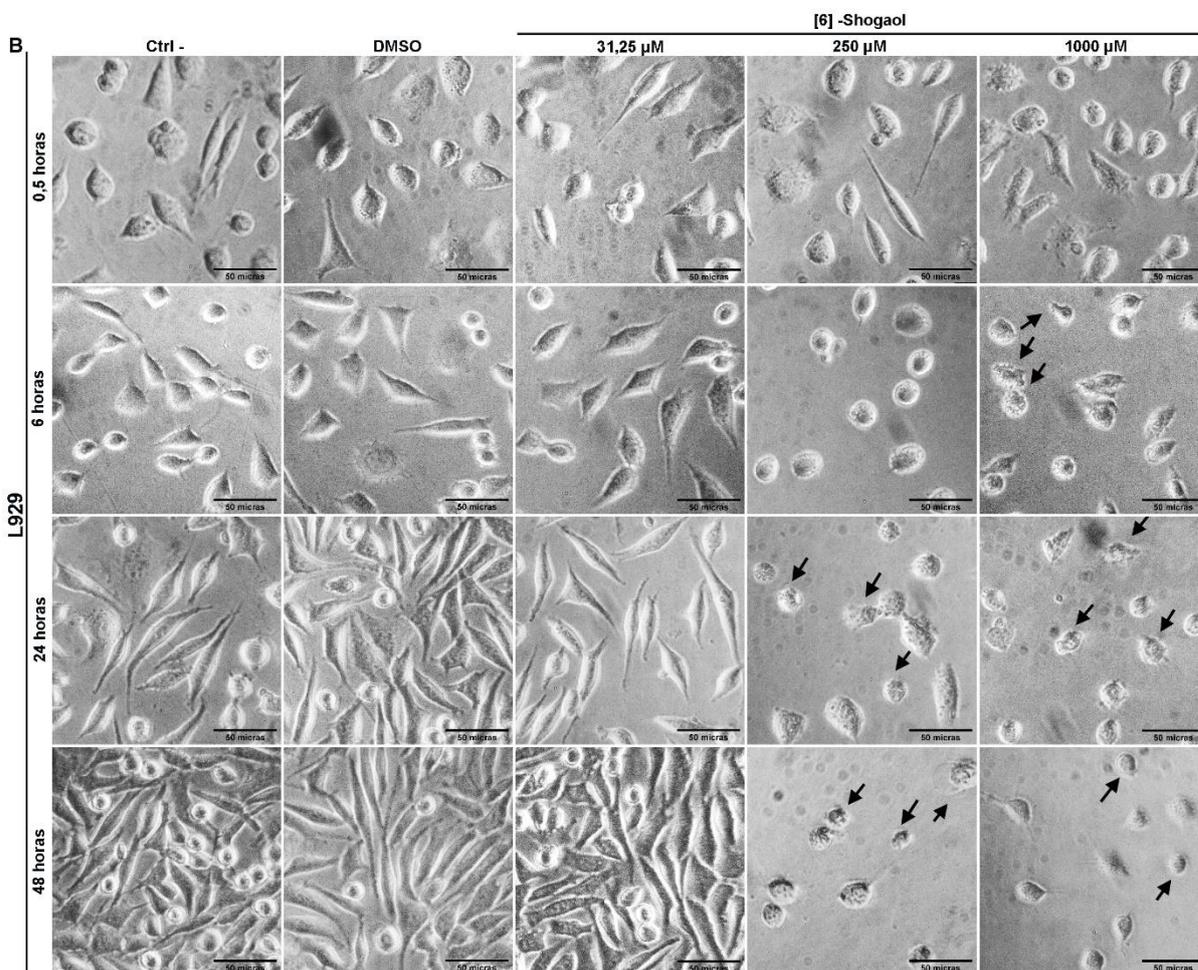
O estresse celular e as lesões induzidas por agentes externos, em muitas situações, podem ser graves e considerados como subletais ou letais, dependendo do grau de comprometimento celular, chegando a induzir alterações na morfologia celular, devido à relação entre a função-estrutura. No ensaio de avaliação da citotoxicidade, foi evidenciado a relação entre a funcionalidade e a conformação estrutural. A partir dos resultados é possível identificar que em concentrações altas de [6]-Shogaol (1000 µM) o dano provocado em ambas as células foi grave, provocando conseqüentemente um declínio da atividade metabólica das células quase imediatamente após a exposição ao [6]-Shogaol. Da mesma forma, também foi evidenciado através do ensaio da avaliação morfológica nas Figuras 9 e 10, fenótipos letais, especificamente nas células MB49, observando, principalmente o encolhimento das células, as quais apresentavam múltiplas protrusões citoplasmáticas com aparente preservação da membrana celular (corpos apoptóticos) e um inchaço celular e a aparição de bolhas citoplasmáticas de grande dimensão (eventos de oncoses) (Figura 8C). No entanto, para as células L929, apenas na concentração de 1000 µM, foi observado o encolhimento e presença de bolhas citoplasmáticas.



**Figura 9.** Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células MB49. As alterações morfológicas e o desprendimento celular foram visualizadas desde as primeiras horas após a exposição ao tratamento. As imagens capturadas (aumento 400x) correspondem a uma replicata representativa de três experimentos independentes ( $n = 4$ ). As setas indicam as alterações morfológicas e de aderência promovidas pelo composto [6]-Shogaol *in vitro*. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .  
**Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

Da mesma forma, foi possível evidenciar diferenças na morfologia das células tumorais MB49 tratadas com [6]-Shogaol em relação ao controle, a partir da concentração de 250  $\mu\text{M}$  (Figura 9). Os danos induzidos pelo composto aparentemente são irreversíveis, uma vez que, com o passar do tempo, não pode ser evidenciada a recuperação do fenótipo típico destas células, sendo estas mudanças capazes de alterar sua aderência com a superfície dos poços. De igual modo, as células não tumorais L929, apresentaram alterações morfológicas de semelhante magnitude às exibidas nas células tumorais MB49, sendo em ambos casos suficientes como para comprometer sua viabilidade, quando tratadas com concentrações acima de 250  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol (Figura 10), porém, as alterações morfológicas observadas em ambas linhagens celulares após a exposição aos tratamentos eram distintas. Estes resultados corroboram os resultados de estimação de atividade metabólica apresentados

anteriormente e, desvendam o efeito citotóxico que induz [6]-Shogaol às células tumorais e não tumorais (Figuras 20 e 21, Anexos).

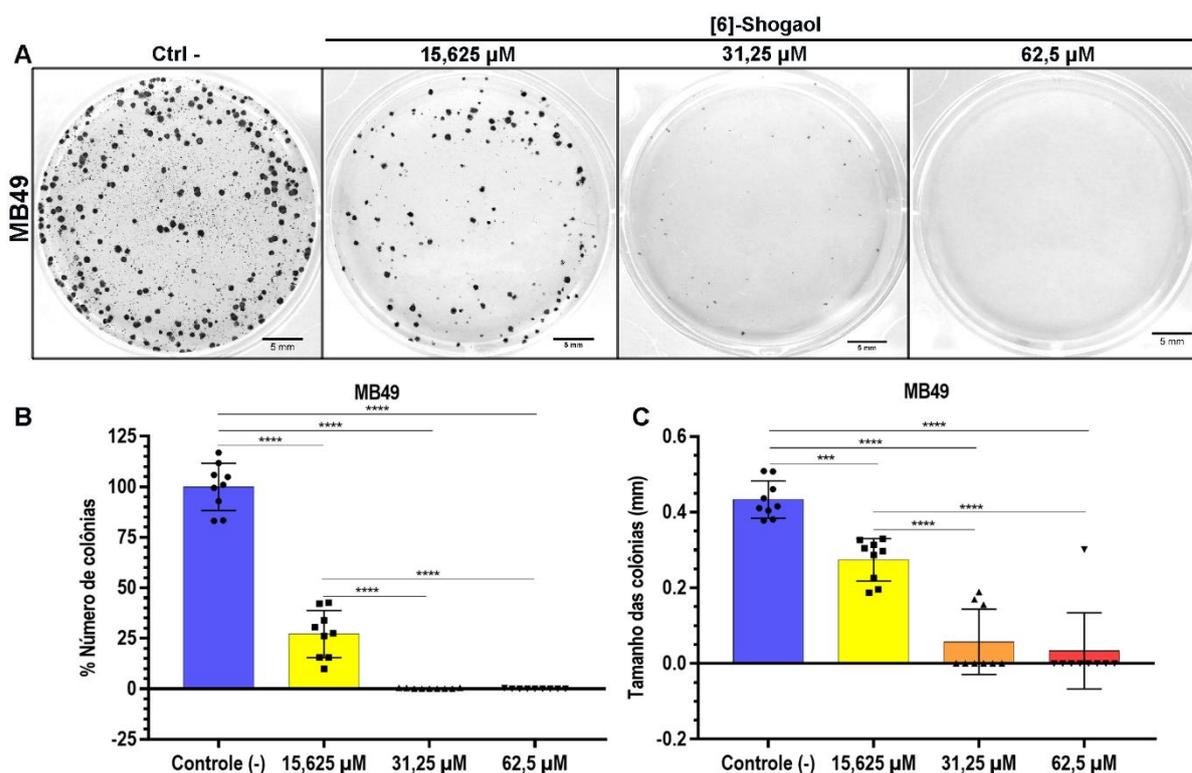


**Figura 10.** Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células L929. As alterações morfológicas e o desprendimento celular foram visualizados desde as primeiras horas após a exposição ao tratamento. As imagens capturadas (aumento 400x) correspondem a uma replicata representativa de três experimentos independentes ( $n = 4$ ). As setas indicam as alterações morfológicas e de aderência promovidas pelo composto [6]-Shogaol *in vitro*. Barra de escala = 50 µm. **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

#### 5.4. Ensaio clonogênico

Através do ensaio clonogênico, foi possível evidenciar a atividade citotóxica direta e citostática promissora do [6]-Shogaol. Os resultados demonstraram que o composto foi capaz de inibir completamente a formação de colônias das células tumorais MB49 na concentração de 62,5 µM (Figura 11). Também pode-se verificar que há uma relação concentração/efeito, já que o potencial citotóxico e citostático foi diminuindo em relação à diminuição da concentração, uma vez que na concentração de 31,25 µM se pode observar a existência de colônias de tamanho inferior (Figura 11A e 11C). No entanto, ao realizar a contagem de

colônias muitas destas não foram tomadas em conta, por possuir um número inferior de células (aproximadamente menos de 50 células) e não possuir a dimensão estabelecida (0,148 mm), como demonstrado na concentração de 15,625  $\mu$ M, uma vez que o efeito do composto ainda é persistente (Figura 11A, 11B e 11C). A partir destes resultados poderíamos sugerir que os efeitos citotóxicos e citostáticos do composto [6]-Shogaol são aparentemente dependentes da concentração.



**Figura 11.** Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol sobre a formação de colônias nas células MB49, após 24 horas de exposição. Células MB49 expostas ao [6]-Shogaol (15,625  $\mu$ M, 31,25  $\mu$ M e 62,5  $\mu$ M) por 24 horas e incubadas durante 5 dias para análise da formação de colônias. (A) A imagem corresponde a uma replicata representativa de três experimentos independentes (n=3). (B) Gráfico do número de colônias normalizadas em relação ao controle (-). (C) Gráfico do tamanho das colônias em relação ao controle (-). Cada barra representa a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes em triplicata (n=3); A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla Tukey, sendo observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (-) em relação aos grupos expostos a [6]-Shogaol, sendo \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Barra de escala = 5 mm. **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

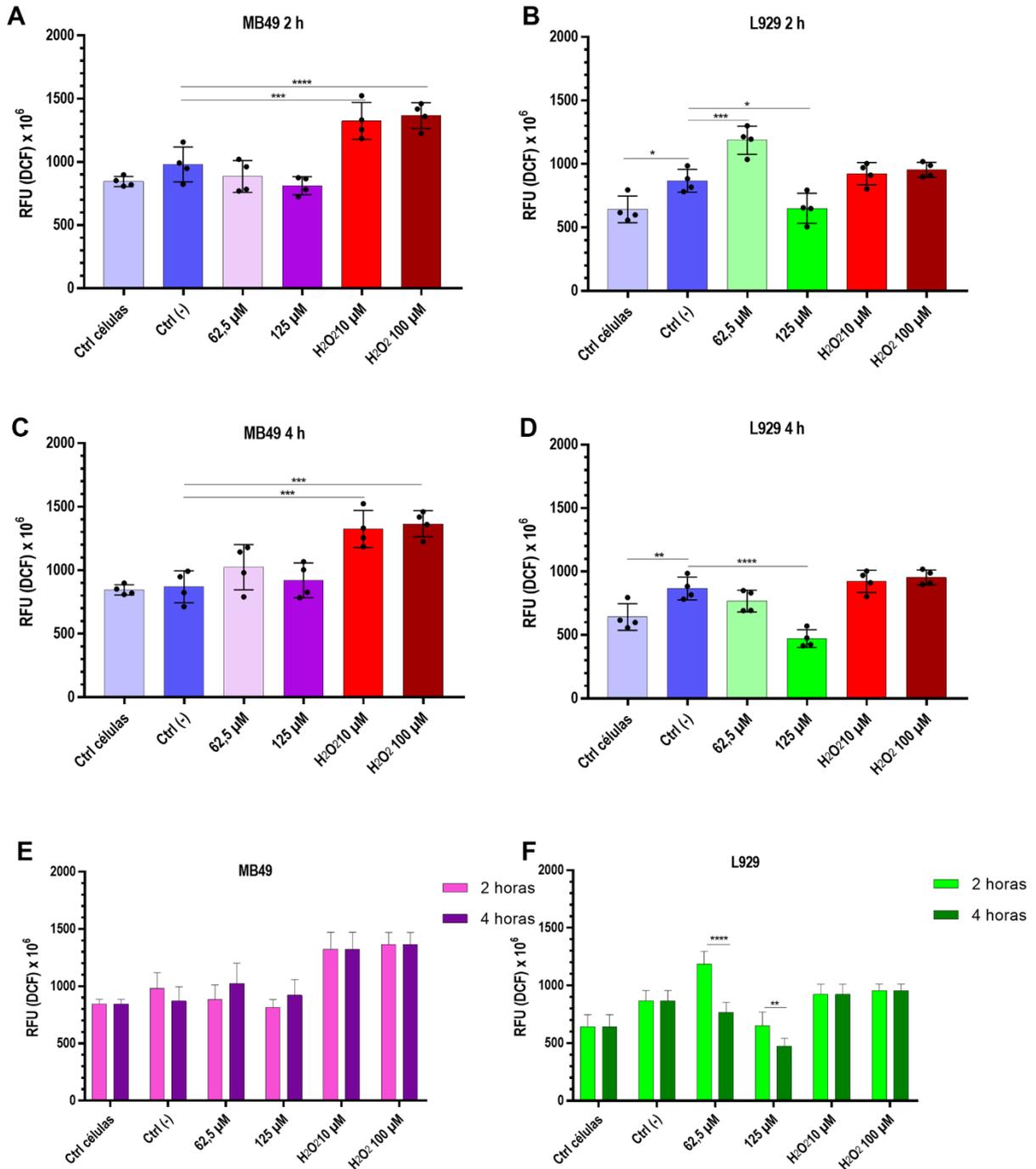
O efeito citostático promovido por [6]-Shogaol é claramente evidenciado na Figura 11C, no qual o tamanho das colônias aparentemente depende da concentração do [6]-Shogaol, apesar de não induzir um efeito citotóxico letal nas concentrações mais baixas (15,625  $\mu$ M e 31,25  $\mu$ M), é possível observar que existe algum tipo de alteração nas vias envolvidas na divisão celular. O efeito citotóxico letal direto do [6]-Shogaol em concentrações acima de 62,5  $\mu$ M foi confirmado com este ensaio, uma vez que os danos gerados pelo composto parecem não ser reversíveis, induzindo um processo de morte celular (Figura 11B).

### 5.5. Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são continuamente geradas em processos celulares normais e desempenham diferentes papéis em diversas doenças como por exemplo: diabetes, doenças neurodegenerativas e o câncer, sendo essenciais para o desenvolvimento de certos processos fisiológicos e para manutenção desses estados patológicos ao desempenhar funções importantes na ativação de genes, crescimento celular e reações químicas nas células. Porém, quando sua produção é exacerbada, causam estresse oxidativo, dando origem aos danos celulares que podem ser irreversíveis e letais (COTTET-ROUSSELLE et al., 2011).

Com a finalidade de elucidar os principais mecanismos desencadeantes dos efeitos citotóxicos de [6]-Shogaol, foram mensurados os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas linhagens celulares em estudo, após períodos de exposição de 2 e 4 horas. Como mostrado nas figuras 12A e 12C, nenhuma das concentrações testadas foi capaz de causar um aumento significativo no conteúdo de EROs intracelular nas células tumorais MB49, em relação aos controles. No entanto, para as células não tumorais L929, houve um aumento significativo da fluorescência emitida pela concentração de EROs presente no interior das células quando expostas à concentração de 62,5  $\mu\text{M}$ , após 2 horas de tratamento (Figura 12B).

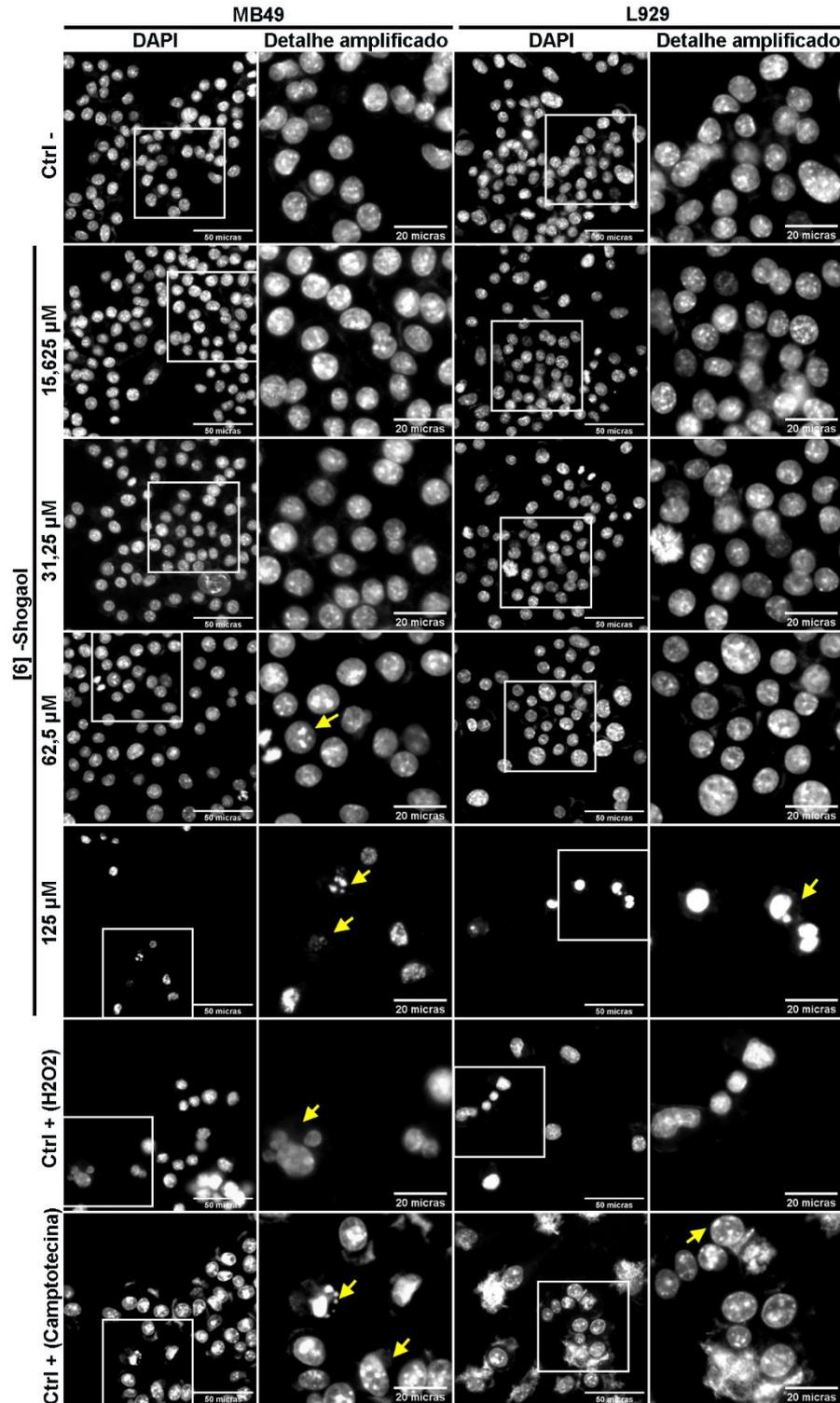
A partir da análise comparativa do tempo de exposição de [6]-Shogaol nas células MB49 (Figura 12E) e L929 (Figura 12F), poderia-se afirmar que, o composto aparentemente não estimula um desequilíbrio no sistema REDOX, por um aumento no conteúdo de EROs, principalmente nas células MB49, mesmo que observado o aumento para a linhagem L929 com o tratamento de 62,5  $\mu\text{M}$ . A partir destes resultados poderíamos indicar que, para as células de câncer de bexiga utilizadas nesse estudo, o estresse oxidativo não é um mecanismo causante dos efeitos citotóxicos de [6]-Shogaol.



**Figura 12.** Efeito do [6]-Shogaol sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células MB49 e L929. As células MB49 e L929 tratadas com as concentrações indicadas de [6]-Shogaol por 2 horas (A, B) e 4 horas (C, D). Os dados foram considerados paramétricos e apresentados como a média  $\pm$  DP de um experimento independente ( $n=4$ ). A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, sendo \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (E, F) O efeito de [6]-Shogaol sobre a produção de EROS nas células MB49 e L929 segundo o tempo de exposição, foi analisado agrupando os dados obtidos por cada tempo de exposição para cada linhagem celular separadamente, sendo que cada barra representa a média  $\pm$  DP ( $n=4$ ). A análise estatística comparativa foi realizada pelo teste 2-way ANOVA e pós-teste Dunnett, sendo \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

### **5.6. Avaliação da condensação e fragmentação nuclear.**

Entre as alterações nucleares associadas aos processos apoptóticos, estão a condensação parcial da cromatina nuclear em torno da membrana nuclear (morfologia nuclear apoptótica do tipo I) e a fragmentação do núcleo em massas de cromatina condensada (morfologia nuclear apoptótica tipo II), sendo esta última alteração uma das mais representativas dos processos apoptóticos (GARCIA-BELINCHÓN et al., 2015; IGLESIAS-GUIMARAIS et al., 2013; WEERASINGHE; BUJA, 2012). A fim de avaliar se [6]-Shogaol induz alguma destas alterações na morfologia nuclear das células MB49 e L929, com o auxílio do corante fluorescente DAPI, foi possível observar a presença de eventos de condensação e fragmentação nuclear para concentrações acima de 62,5  $\mu\text{M}$ , uma vez visualizados núcleos fragmentados na maioria das células, além da diminuição no número de células em relação ao controle para ambas as linhagens celulares (Figura 13). Estes resultados sugerem que um dos eventos que incitam a morte celular poderia ser o comprometimento e danificação do núcleo celular e, que o processo de morte desencadeado poderia ser a apoptose.

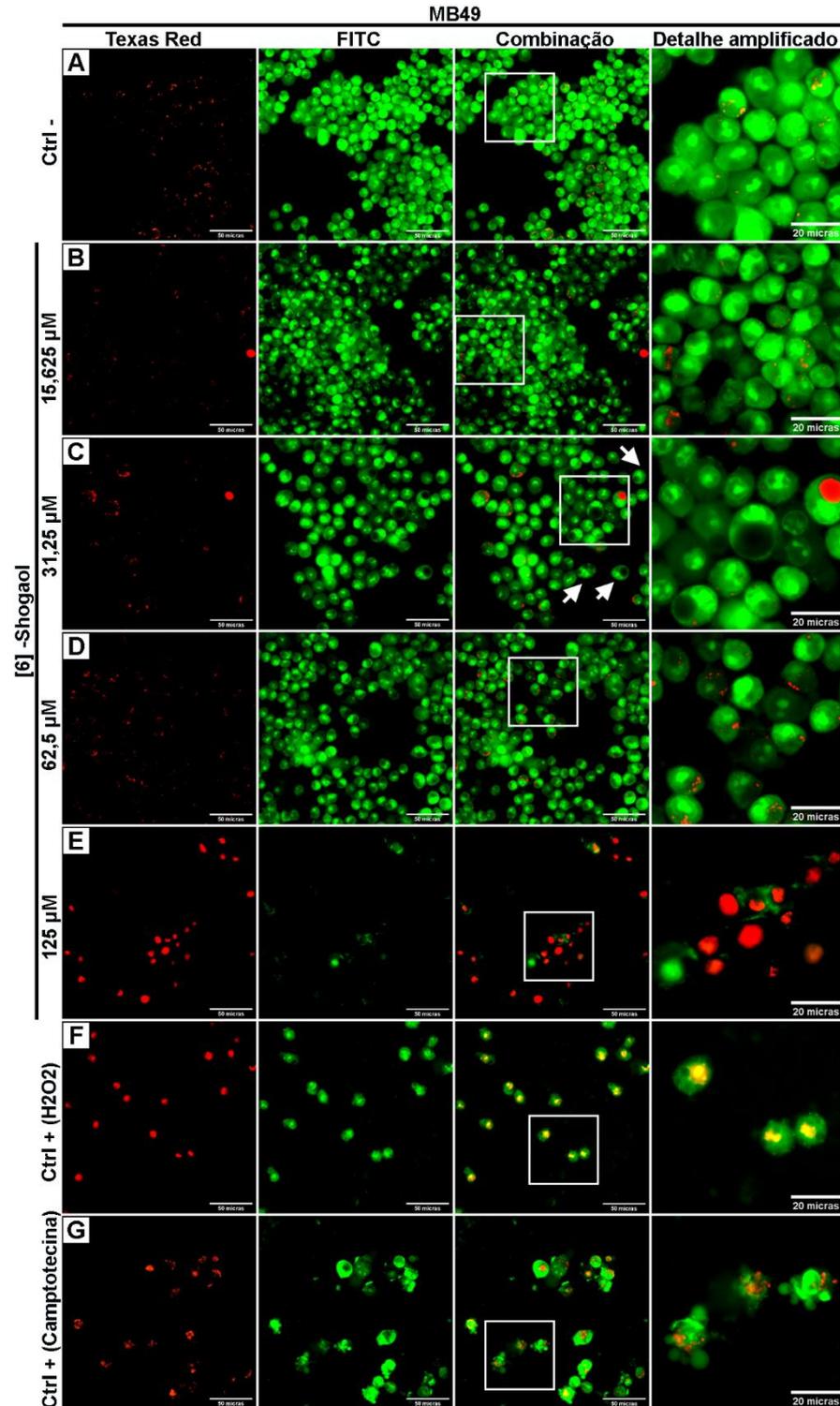


**Figura 13.** Efeitos do composto [6]-Shogaol no DNA das células MB49 e L929. Fotomicrografias fluorescentes representativas mostrando estágios de condensação e fragmentação nuclear nas células MB49 e L929, após o tratamento com [6]-Shogaol por 12 horas. Camptotecina (100 μM) foi usada como controle (+) conjuntamente com o peróxido de hidrogênio (580 mM). As células foram coradas com DAPI e as imagens foram capturadas com o auxílio do equipamento de *epifluorescência Image Xpress Micro*, com amplificação de 400x. As setas amarelas indicam núcleos fragmentados e eventos de condensação da cromatina nuclear. Barra de escala: 50 e 20 μm. **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

### 5.7. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica

A capacidade de detectar células tumorais e promover apoptose de maneira seletiva, é uma das maneiras de medir a eficácia de novas drogas anticancerígenas (LIU, K. et al., 2015). Para confirmar o efeito do [6]-Shogaol na indução de morte celular apoptótica, foi realizado o ensaio de determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica, baseado na capacidade dos corantes fluorescentes laranja de acridina e iodeto de propídio de penetrar nas células, segundo o estado de integridade das membranas celulares e ligar-se ao núcleo.

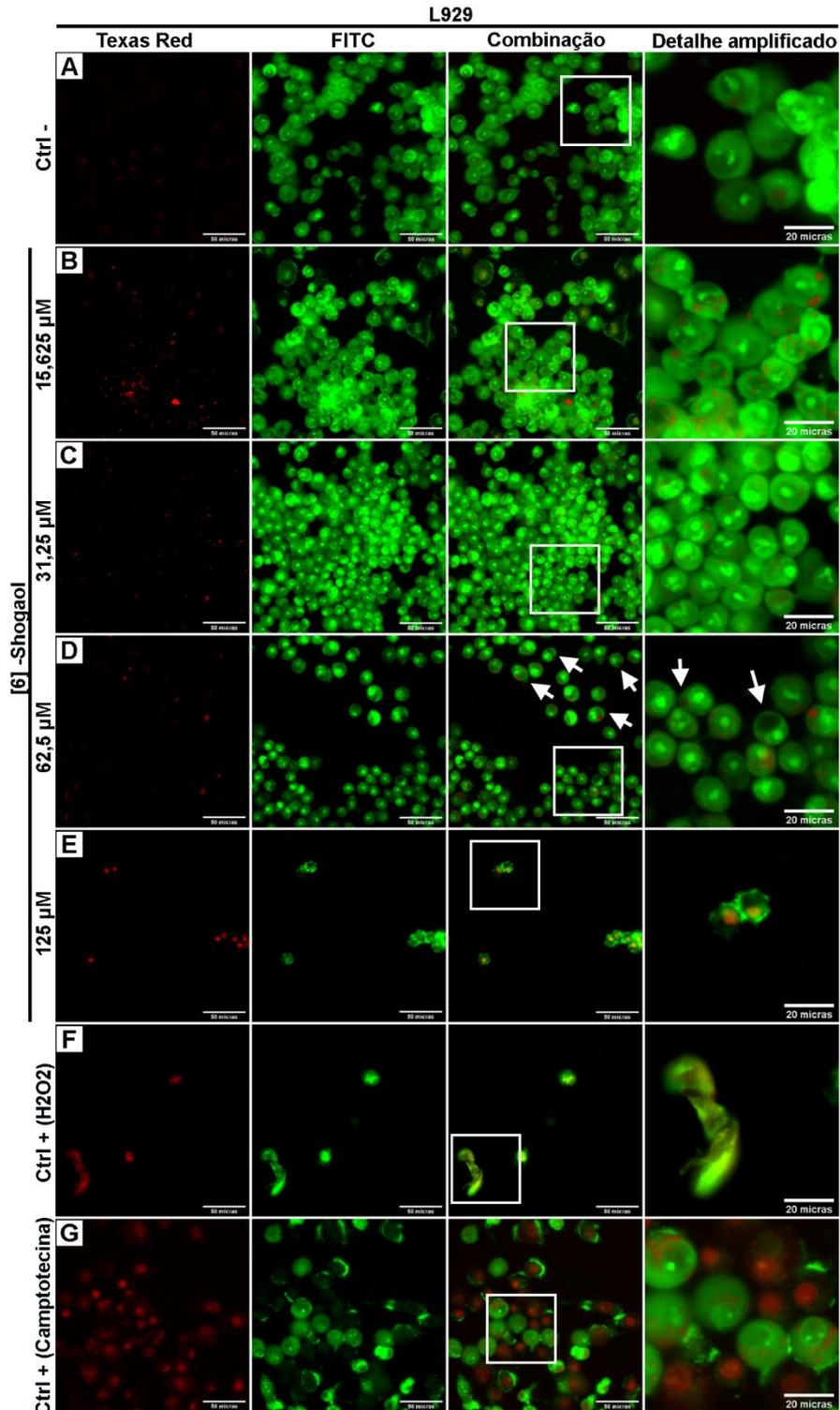
Na Figura 14, se pode observar que após 12 horas de exposição ao composto [6]-Shogaol, se evidenciam fenótipos associados ao processo de morte celular apoptótico nas amostras de células tumorais em concentrações acima de 62,5  $\mu\text{M}$ , uma vez que as células MB49 apresentaram regiões nucleares ligadas ao fluoróforo Laranja de Acridina acompanhados de regiões do citoplasma tênue e difusamente coradas (apoptose precoce) (Figura 14D), sendo que também se pode observar eventos de fragmentação nuclear em algumas destas células (Figura 14D). Por outro lado, na concentração de 125  $\mu\text{M}$ , o efeito letal do composto é mais proeminente, sendo evidenciado pela diminuição do número de células e a apresentação de um fenótipo aparentemente necrótico na maioria das células, o qual é caracterizado pela coloração avermelhada nos núcleos celulares (Figura 14E), porém, também é observável algumas células com uma dupla ligação a ambos os fluoróforos Laranja de acridina e Iodeto de propídio na região nuclear, apresentando fluorescência laranja (apoptose tardia) (Figura 14E).



**Figura 14.** Fotomicrografias de eventos de apoptose e necrose detectadas pelo ensaio de coloração AO/PI nas células MB49 expostas a [6]-Shogaol por 12 horas. Células MB49 tratadas por 12 horas com [6]-Shogaol em diferentes concentrações, posteriormente foram coradas com AO/PI e as imagens correspondem a uma replicata representativa (n=5), capturadas com o auxílio do equipamento de epifluorescência *Image Xpress Micro* (400x), usando os filtros *Texas red* para PI e *FITC* para AO. Os fenótipos evidenciados após os tratamentos foram os seguintes: (A) grupo controle de células MB49 viáveis; (B) células MB49 tratadas com 15,625  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol, não se evidenciou eventos de morte celular; (C) células MB49 tratadas com 31,25  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol, se observa células viáveis em sua maioria, porém, algumas apresentam o fenótipo de apoptose precoce, o qual é identificado pela marcação do núcleo e uma tênue e difusa fluorescência no citoplasma emitida por AO; (D) células

MB49 tratadas com 62,5  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol, é apreciável fenótipos de apoptose caracterizados por uma fragmentação nuclear e uma tênue quase inexistente fluorescência no citoplasma; (E) células MB49 tratadas com 125  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol, se observa células com coloração avermelhada nos núcleos, pela ligação ao fluoróforo PI associado a eventos de necrose; (F) células MB49 tratadas com 580 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentam apoptose tardia pela dupla ligação de ambos os fluoróforos AO/PI aos núcleos; (G) células MB49 tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de camptotecina, se observa a presença de corpos apoptóticos. (C) As setas indicam estruturas celulares de diferentes dimensões que poderiam associar-se com eventos de vacuolização induzidas pelo estresse gerado por [6]-Shogaol. Barra de escala: 50 e 20  $\mu\text{m}$ . **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

Na Figura 15 é possível observar o comportamento das células L929 após a exposição a diferentes concentrações de [6]-Shogaol. Pode-se observar que o efeito do composto foi de semelhante magnitude letal ao evidenciado nas células MB49, sendo possível observar na concentração de 62,5  $\mu\text{M}$  uma menor proporção de células com fenótipo apoptótico precoce e não é observado células com fenótipos de apoptose tardia (Figura 11D). No entanto, na concentração de 125  $\mu\text{M}$ , o comportamento letal do composto é muito semelhante ao apresentado nas células MB49.



**Figura 15.** Fotomicrografias de eventos de apoptose e necrose detectadas pelo ensaio de coloração AO/PI nas células L929 expostas a [6]-Shogaol por 12 horas. Células L929 tratadas por 12 horas com [6]-Shogaol em diferentes concentrações, posteriormente foram coradas com AO/PI e as imagens correspondem a uma replicata representativa (n=5), capturadas com o auxílio do equipamento de epifluorescência *Image Xpress Micro* (400X), usando os filtros *Texas red* para PI e *FITC* para AO. Os fenótipos evidenciados após os tratamentos foram os seguintes: (A) grupo controle de células L929 viáveis; (B) células L929 tratadas com 15,625  $\mu$ M de [6]-Shogaol não se evidênciam eventos de morte celular; (C) células L929 tratadas com 31,25  $\mu$ M de [6]-Shogaol, não se observa fenótipos associados a eventos de morte celular; (D) células L929 tratadas com 62,5  $\mu$ M de [6]-Shogaol, é apreciável células

viáveis e células que apresentam uma tênue e difusa fluorescência no citoplasma (apoptose precoce); (E) células L929 tratadas com 125  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol, se observa células com coloração alaranjada nos núcleos, pela dupla ligação aos fluoróforos AO e PI associados a eventos de apoptose tardia; (F) células L929 tratadas com 580  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentam apoptose tardia pela dupla ligação de ambos os fluoróforos AO/PI aos núcleos; (G) células MB49 tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de camptotecina, observa-se a presença de eventos de apoptose tardia. (D) As setas indicam estruturas celulares de diferentes dimensões que poderiam associar-se com eventos de vacuolização induzidas pelo estresse gerado por [6]-Shogaol. Barra de escala: 50 e 20  $\mu\text{m}$ . **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

É possível deduzir a partir das imagens obtidas neste ensaio, que a apoptose é o tipo de morte celular mais predominante induzido pelo [6]-Shogaol para a concentração de 62,5  $\mu\text{M}$ . No entanto, também foram observadas células com fenótipos associados a eventos necróticos e de apoptose tardia para a concentração de 125  $\mu\text{M}$ , para as duas linhagens celulares em estudo.

A partir destas imagens, foram observadas estruturas citoplasmáticas de diferentes dimensões, não relatadas anteriormente em outros estudos semelhantes. Estas estruturas foram evidenciadas nas células expostas a concentrações aparentemente subletais, como 31,25  $\mu\text{M}$  para células MB49 (Figura 14C, setas brancas) e 62,5  $\mu\text{M}$  para células L929 (Figura 15D, setas brancas), uma vez que algumas destas estruturas armazenaram o corante iodeto de propídio em seu interior.

Este fenômeno também pode ser observado quando as células foram coradas com o auxílio do panóptico rápido, uma vez que foi possível identificar que essas estruturas aparentemente têm pH neutro pela ausência de coloração interna, nos sugerindo que poderiam ser compostas de água ou outros componentes com pH neutro. No entanto, estas estruturas apenas foram visualizadas nas células MB49 expostas na concentração de 31,25  $\mu\text{M}$  do [6]-Shogaol (Figura 22C, Anexos).

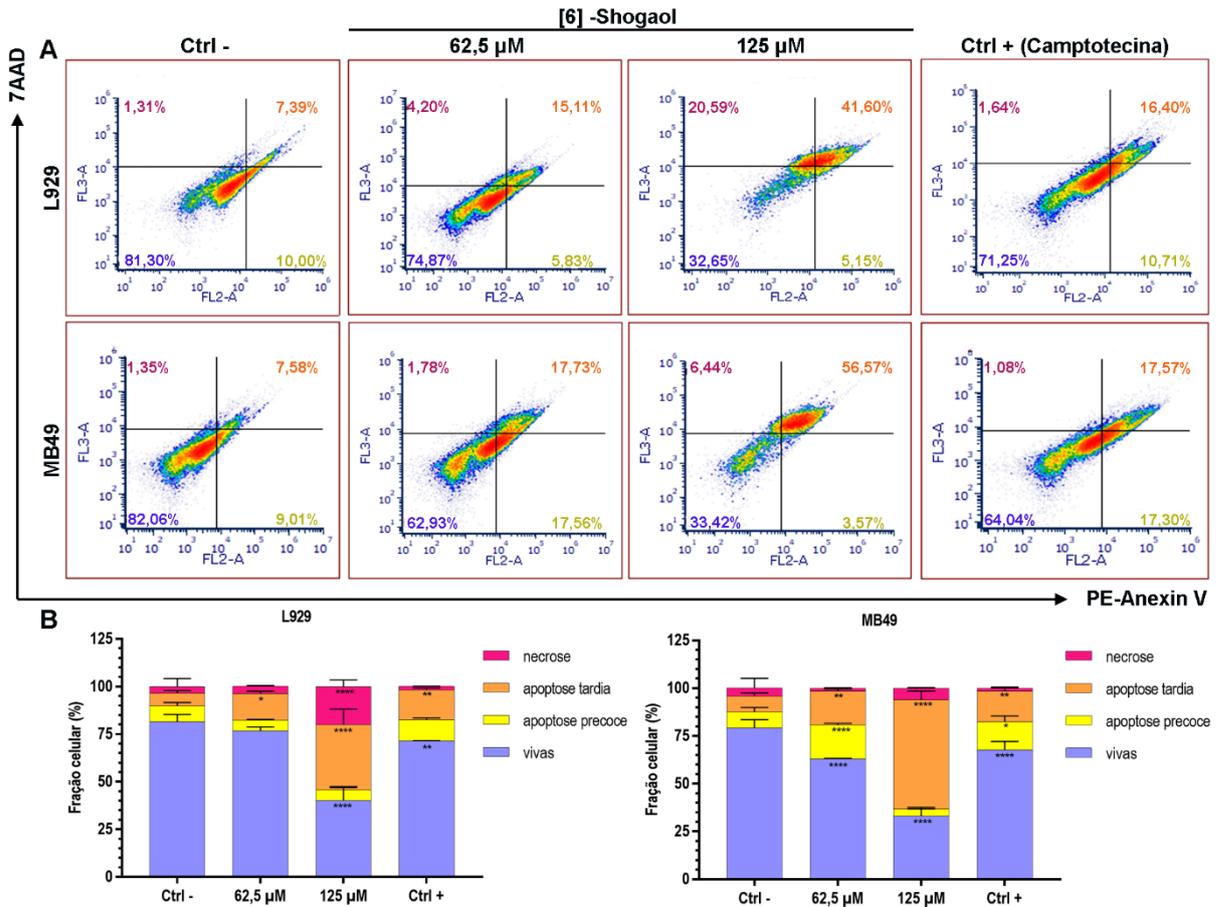
### **5.8. Determinação de eventos de morte celular apoptótica e/ou necrótica por citometria de fluxo**

Células viáveis geralmente restringem o fosfolípido fosfatidilserina (PS) à parte interna da membrana plasmática. No entanto, no processo de indução da apoptose, as células perdem a assimetria da membrana e redistribuem os fosfolípidos de maneira randomizada, através de suas proteínas transmembrana (scramblases), translocando a fosfatidilserina para a superfície da célula, mantendo a integridade da membrana intacta, onde serve como uma sinal para uma posterior fagocitose (SCHLEGEL; WILLIAMSON, 2001). Este processo pode ser monitorado utilizando a proteína Anexina-V, a qual tende a se ligar PS de uma maneira dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  (CHAURIO et al., 2009; VAN ENGELAND et al., 1996).

Considerando a alta especificidade da proteína Anexina-V em reconhecer eventos de apoptose, a mesma foi usada em conjunto com o corante 7-AAD, o qual possui alta afinidade pelo DNA e apenas consegue penetrar nas células que possuem perda da integridade da membrana celular, sendo útil na detecção de eventos de apoptose tardia e necrose. A interpretação dos resultados foi baseada na distribuição das células nos 4 quadrantes do diagrama de *Dot blott density*, os quais são divididos por marcações diferenciais:

- Quadrante inferior esquerdo: Anexina-V (-) e 7-AAD (-), representa às células vivas.
- Quadrante inferior direito: Anexina-V (+) e 7-AAD (-), representa às células no processo apoptótico precoce ou inicial.
- Quadrante superior direito: Anexina-V (+) e 7-AAD (+), representa células no processo apoptótico tardio.
- Quadrante superior esquerdo: Anexina-V (-) e 7-AAD (+), representa células que sofreram o processo necrótico.

Na Figura 16 é possível observar pela distribuição das células nos quadrantes, que os efeitos citotóxicos de [6]-Shogaol provocam um processo de morte celular apoptótica maioritariamente em ambas as linhagens celulares. Logrando-se evidenciar que o [6]-Shogaol na concentração de 62,5  $\mu\text{M}$  e 125  $\mu\text{M}$  é capaz de provocar um 35,48% e 60,94% de eventos de morte celular apoptótica nas células tumorais MB49, respectivamente, e apenas um 1,53% e 6% de eventos de morte celular necrótica, respectivamente. Já nas células não tumorais L929 o composto [6]-Shogaol nas concentrações de 62,5  $\mu\text{M}$  e 125  $\mu\text{M}$  só incitou um 19,41% e 39,76% de eventos de morte celular apoptótica, respectivamente, no entanto, foi capaz de induzir um 3,75% e 19,95% de eventos de morte celular necrótica, respectivamente. A partir destes resultados, é possível sugerir que o [6]-Shogaol além de induzir eventos de morte celular apoptótica de maneira maioritária em ambas as linhagens celulares, também incitou em menor proporção eventos de morte celular necrótica significativos nas células não tumorais L929, mas, só foi na concentração de 125  $\mu\text{M}$ . Sendo ambos efeitos dependentes da concentração. A partir destes dados, poderíamos propor que as células tumorais MB49 são um pouco mais sensíveis aos efeitos pró-apoptóticos do composto [6]-Shogaol em relação às células não tumorais L929, porém dita sensibilidade não é muito acentuada como para considerar-se significativa. Estes resultados validam os resultados apresentados anteriormente.



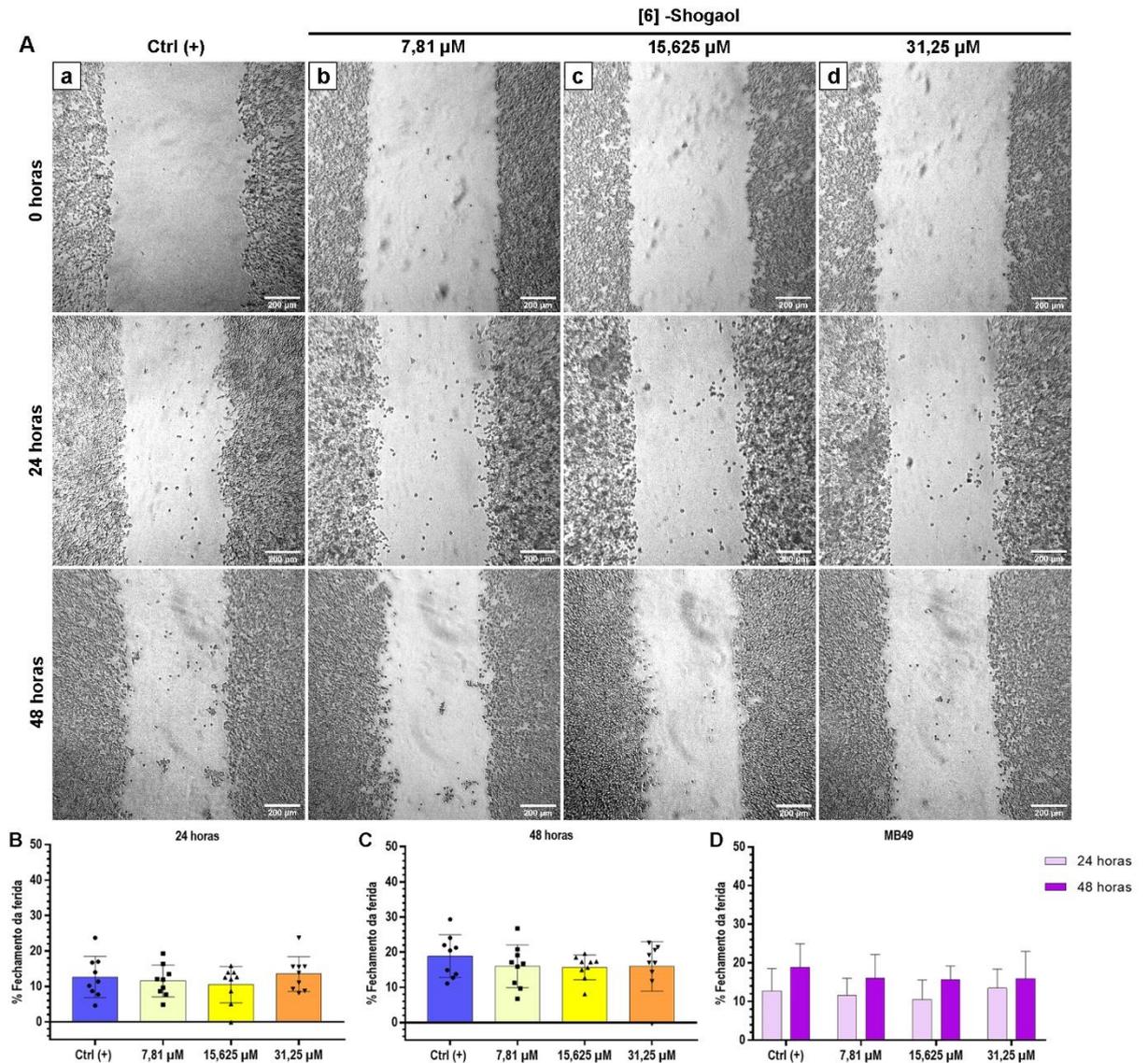
**Figura 16.** Efeito do [6]-Shogaol na indução de eventos de morte celular apoptótica e necrótica nas células MB49 e L929. Células MB49 e L929 tratadas com as concentrações indicadas de [6]-Shogaol por 12 horas e coradas com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7AAD (detectado no canal FL3-A). Camptotecina (100 $\mu$ M) foi usado como controle (+) de apoptose. (A) diagramas de *dot blot density* apresentando as percentagens de apoptose e necrose induzidas por [6]-Shogaol nas células MB49 e L929. (B) Diagrama de barras representando as percentagens das células MB49 e L929 nos diferentes estágios de morte celular apoptótica e necrose. Os dados representam a média  $\pm$  DP de um experimento independente em triplicata (n=3). Os dados foram considerados como paramétricos e a análise estatística foi realizada pelo teste 2-way ANOVA e pós-teste Dunnett, sendo \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

### 5.9. Determinação do potencial anti-migratório.

O ensaio de migração celular (*Wound healing*) avalia a migração celular coletiva, sendo o tipo de migração exibida por monocamadas de células epiteliais e endoteliais, as quais se movimentam em duas dimensões, enquanto mantem suas junções intercelulares (JONKMAN et al., 2014). Este tipo de migração acontece frequentemente em processos metastáticos e em lesões teciduais, nas quais um grupo de células coordena seus movimentos em direção a um gradiente quimiotático (migração unidirecional) (JONKMAN et al., 2014; NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Para avaliar o potencial anti-migratório que exerce o composto [6]-Shogaol na capacidade migratória das células MB49, foi estimada a porcentagem de migração direcionada das células em relação à área determinada (risca).

Na Figura 17 é possível observar que o tratamento com [6]-Shogaol não inibiu de maneira significativa a migração celular na área riscada em nenhuma das concentrações testadas em relação ao grupo controle (Figura 17A), tendo aparentemente o mesmo perfil de migração e motilidade durante todo o tempo de exposição ao composto (Figura 17D). A partir destes resultados, é possível insinuar que [6]-Shogaol não apresentou um potencial anti-migratório promissor nas células MB49 em relação ao controle.



**Figura 17.** Efeito do [6]-Shogaol na migração das células MB49. Células MB49 tratadas por 48 horas com [6]-Shogaol em diferentes concentrações. As imagens foram fotografadas nos intervalos de tempo de 0, 24 e 48 horas (amplificação 100x) e correspondem a uma replicata representativa de três experimentos independentes ( $n=3$ ). (A.a) grupo controle de células MB49 tratadas apenas com o meio; (A.b) células MB49 tratadas com 7,81  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (A.c) células tratadas com 15,625  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (A.d) células MB49 tratadas com 31,25  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol. Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ . (B, C e D) Os resultados são expressos em percentagem de fechamento da risca. A área de fechamento foi calculada de acordo com o descrito por Yue et al. (2010), com o auxílio do *software* ImageJ. Os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes em triplicata ( $n=3$ ). Os dados foram considerados como paramétricos e a análise estatística comparativa foi realizada pelo teste 2-way ANOVA e pós-teste Tukey. **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).

## 6. DISCUSSÃO

O câncer de bexiga é uma neoplasia originada no urotélio da bexiga, que dependendo de sua via patogênica pode desenvolver-se em duas variantes: câncer de bexiga não invasivo muscular, que abrange aproximadamente 80% destas neoplasias e câncer de bexiga invasivo muscular que agrupa os 20% restantes. Apesar, que a maior porcentagem destas variantes é catalogada como superficial, estas conformações tumorosas possuem a tendência de recorrer e progredir, gerando uma necessidade de vigilância e seguimento médico contínuo. Habitualmente o tratamento do câncer de bexiga abrange: remoção cirúrgica do tecido neoplásico, administração de quimioterápicos e uso de radioterapia, os quais podem ser utilizados de maneira única ou combinada. No entanto, em muitos casos os tratamentos disponíveis não são eficazes, pela geração de mecanismos de resistência por parte das células tumorais e/ou os efeitos colaterais em tecidos não alvo, afetando consideravelmente a qualidade de vida do paciente. Além disso, a estes problemas pode-se adicionar os altos custos das avaliações diagnósticas repetidas e os esquemas de tratamentos utilizados. Esta série de problemas enfatizam a necessidade da busca de novos medicamentos com um maior perfil de segurança e que sejam mais específicos e seletivos.

Diversos estudos relatam o potencial que possuem os compostos fitoquímicos para a prevenção e tratamento de uma ampla variedade de cânceres. Do total de medicamentos anticancerígenos aprovados desde 1981 até 2019, cerca do 50% são derivados de produtos naturais (NEWMAN, 2020). A investigação de fitoquímicos como alternativas terapêuticas para o câncer de bexiga, é uma área de investigação promissória, devido a que muitos destes compostos são específicos e seletivos às células tumorais, e alguns deles possuem um bom perfil de segurança, eventos relatados em diferentes estudos que usam tanto cultivos celulares, quanto organismos vivos, com o fim de simular as condições desta neoplasia.

Estudos publicados anteriormente relatam a potencial atividade citotóxica e indutora de apoptose de [6]-Shogaol em células de câncer de pulmão, próstata, colorretal, cérvico-uterino, mama e hematológicas (BAWADOOD et al., 2020; KIM et al., 2014; LI; CHIANG, 2017; LIU, Q. et al., 2012; LIU, Q. et al., 2013; SAHA et al., 2014).

[6]-Shogaol é um dos compostos mais lipofílicos que compõem o rizoma do gengibre, e para sua utilização neste estudo, foi necessário utilizar o dissolvente DMSO. Devido à capacidade do DMSO de interagir com as membranas, ao incorporar-se no interior da bicamada e gerar um maior espaço livre dentro da região hidrofóbica, possibilitando a formação de poros transitórios de água, sua avaliação citotóxica foi primordial e nos revelou que concentrações abaixo de 2% não foram capazes de comprometer a viabilidade celular inclusive após tempos prolongados de exposição (48 horas) (BRANCH et al., 1994; DA

VIOLANTE et al., 2002; DE MENORVAL et al., 2012; GURTOVENKO; ANWAR, 2007; HAMMOUDEH; HAMMOUDEH; HAMOUDI, 2019; NOTMAN et al., 2006).

A partir dos resultados do ensaio de citotoxicidade foi observado que [6]-Shogaol é capaz de reduzir a viabilidade de maneira dependente da concentração para ambas as linhagens celulares, apresentando um valor estimado de  $IC_{50} = 135,5 \mu M$  para as células tumorais MB49, e  $IC_{50} = 205,3 \mu M$  para os fibroblastos não tumorais L929. Com base nestes valores, é possível sugerir que as células tumorais apresentam maior sensibilidade aos efeitos do composto em relação aos fibroblastos não tumorais, porém dita sensibilidade não é tão marcada, como para sugerir um efeito seletivo às células tumorais. Estudos anteriores demonstraram que [6]-Shogaol induz efeitos citotóxicos letais de maneira seletiva às células tumorais em diferentes tipos de cânceres, como no estudo de Annamalai (2016), no qual foi relatado que o composto demonstra um efeito seletivo às células de carcinoma de laringe humano (Hep-2) em relação aos fibroblastos gengivais (HGF-1), exibindo  $IC_{50} = 20 \mu M$  para Hep-2 e  $IC_{50} = 80 \mu M$  para HGF-1 (ANNAMALAI; KATHIRESAN; KANNAPPAN, 2016). Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram com o potencial citotóxico de [6]-Shogaol reportado no estudo de Bawadood e colaboradores (2020), no qual [6]-Shogaol mostra efeitos citotóxicos notáveis nas linhagens celulares de carcinoma ductal de mama triplo positivo (T47D) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), exibindo  $IC_{50} = 0,5 \pm 0,1 \mu M$  para T47D e  $IC_{50} = 23,3 \mu M$  para MCF-7, valores consideravelmente baixos, que ressaltam a potência do composto nessas linhagens de câncer de mama (BAWADOOD et al., 2020). O potencial anticancerígeno de [6]-Shogaol também foi relatado no estudo de Ishiguro e colaboradores (2008), no qual descrevem uma redução da viabilidade dependente da concentração, em células de câncer gástrico humano (HCG-27), apresentando  $IC_{50} = 32 \mu M$  de [6]-Shogaol (ISHIGURO et al., 2008).

A partir das imagens obtidas na análise morfológica das células expostas a [6]-Shogaol, é possível sugerir que, além de evidenciar o efeito concentração-dependente demonstrado anteriormente, também se identificou um efeito tempo-dependente nas modificações morfológicas induzidas por [6]-Shogaol para ambas as linhagens celulares. No entanto, é possível observar que as células tumorais MB49 evidentemente são mais sensíveis aos efeitos que induz [6]-Shogaol, já que as alterações que apresentam são mais aberrantes e grosseiras em comparação com as células não tumorais L929. Inclusive é possível observar a seguinte sequência de alterações morfológicas, além da aparente ausência de proliferação, identificada a partir da comparação do número de células em relação aos controles. Na Figura 20 (Anexos) pode-se observar que as células MB49 mudam de um formato alongado e distendido próprio da aderência com a superfície do poço para um formato arredondado, característico de processos de desaderência, que conseqüentemente diminui seu volume

celular, encolhendo-se e desprendendo-se, chegando a apresentar em alguns casos protrusões ou *blebs* de diferentes dimensões na membrana plasmática, que aparentemente se externalizam. Também é possível observar que para os tempos mais prolongados ou altas concentrações do composto (1000 e 500  $\mu\text{M}$ ), os danos provocados são mais drásticos e inclusive as células parecem desaparecer da superfície do poço (Figura 20, anexos). Isto presumivelmente poderia dever-se a uma degradação por parte das enzimas lisossômicas liberadas ao ambiente, pelas mesmas células, como consequência de sua deterioração. De acordo com as alterações estruturais observadas induzidas por [6]-Shogaol, muitas destas modificações se encaixam dentro das características morfológicas associadas à apoptose, relatadas por diferentes estudos, os quais descrevem que, a morfologia celular típica de processos apoptóticos geralmente caracteriza-se por um arredondamento, encolhimento e descolamento das células, e posteriormente formação de bolhas na membrana celular e liberação de corpos apoptóticos (MOOREN; KRÜGER, 2015; RYBCZYNSKA et al., 2018; WEERASINGHE; BUJA, 2012). Todavia, com a integridade da membrana plasmática intacta, subsequentemente advém a ocorrência da condensação da cromatina (picnose), seguida da fragmentação nuclear (cariorrexe) e fragmentação do DNA e prossegue com a presença de fagocitose (MOOREN; KRÜGER, 2015; RYBCZYNSKA et al., 2018). Assim, estas concordâncias nos sugerem que a diminuição da viabilidade celular após a exposição a [6]-Shogaol poderia ser provocada aparentemente pela indução de processos apoptóticos.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de formação de colônias, poderíamos propor que [6]-Shogaol, possui potencial citotóxico e citostático ao evidenciar uma regulação negativa da proliferação celular para as concentrações de 62,5; 31,25 e 15,625  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol. Uma vez demonstrado que o efeito é dependente da concentração, é possível considerar que a ausência de colônias e células na concentração de 62,5  $\mu\text{M}$ , poderia ser devido aos seguintes fatores: 1) evidência de um efeito citotóxico letal; 2) parada do ciclo ou; 3) alteração estrutural dos microtúbulos do fuso celular, que subsequentemente poderia induzir um bloqueio mitótico. Considerando que as células expostas à concentração mencionada evidenciaram apenas a presença de restos celulares, não foi possível identificar se o estímulo desencadeante foi direto ou indireto, pois eventos de mitose aberrante podem provocar morte celular (BAWADOOD et al., 2020). Já nas concentrações abaixo de 31,25  $\mu\text{M}$ , foi possível verificar a diminuição no fluxo de divisão celular, representado pela diminuição da dimensão das colônias. Porém, é importante ressaltar que apesar dessa modulação nos eventos de divisão celular, as células ainda eram viáveis. Considerando como relatado por outros estudos que o [6]-Shogaol induz a parada do ciclo e interfere na formação do fuso mitótico a nível dos microtúbulos, é possível que um destes eventos esteja relacionado à regulação negativa da proliferação e ao efeito citostático observado após o tratamento com

[6]-Shogaol (BAWADOOD et al., 2020; ISHIGURO et al., 2008; LIU, Q. et al., 2012). De acordo com o estudo de Bawadood *et al.*, (2020), a indução da parada do ciclo celular nas fases G2/M após a exposição a [6]-Shogaol em células de câncer de mama MCF-7 e T47D, pode se dar através da regulação negativa da expressão do gene Ciclina D1, o qual desempenha funções na regulação do ciclo celular (BAWADOOD et al., 2020). No entanto, este não seria o único mecanismo de regulação da divisão celular, induzido por [6]-Shogaol. Segundo o estudo de Ishiguro e colaboradores (2008), [6]-Shogaol pode provocar alterações na estrutura dos microtúbulos, ao reagir com dímeros de tubulina, através da ligação com os grupos sulfidríla dos resíduos de cisteína das tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$ , o que subsequentemente inibe a polimerização da tubulina, eventos relatados a partir de estudos *in vitro* em células de câncer gástrico humano HGC-27 (ISHIGURO et al., 2008). Levando em consideração que os microtúbulos são componentes do citoesqueleto e estão envolvidos em diversos processos celulares, como a mitose, uma interferência em sua dinâmica é capaz de induzir a parada do ciclo celular durante a fase M, incitando um tipo de morte denominado catástrofe mitótica. (ISHIGURO et al., 2008). Além do potencial lesivo, a atuação a nível dos microtúbulos também poderia afetar outra *Hallmarks* dos processos cancerosos, que é a angiogênese, através da alteração e comprometimento da motilidade das células endoteliais (ISHIGURO et al., 2008).

Geralmente, na maioria dos estudos, está amplamente estabelecido que as células tumorais se caracterizam por apresentarem um nível de EROs intracelular superior em comparação com suas contrapartes normais, originando um ambiente com maior estresse oxidativo (PERILLO et al., 2020; WANG; MCKENNEY, 2019). Enquanto nos tecidos cancerosos predominam as alterações genéticas, aumento da taxa metabólica, disfunção mitocondrial e a hipóxia relativa, ao contrário, nas células normais se têm evidenciado níveis baixos de EROs, regulados pelas diferentes vias antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Assim, é frequente associar que um aumento nos níveis de EROs nas células tumorais, possa desencadear um desequilíbrio REDOX, que comprometa sua viabilidade, considerando que o conteúdo de EROs superior ao pré-existente nas células tumorais as tornam mais sensíveis aos danos gerados pelas EROs (PERILLO et al., 2020; WANG; MCKENNEY, 2019). As EROs são moléculas altamente reativas que incluem radicais livres como o ânion superóxido, radical hidroxila, além do peróxido de hidrogênio, um derivado do metabolismo normal do oxigênio. Estas são produzidas majoritariamente nas mitocôndrias pela cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, mas também podem ser produzidas nos peroxissomos pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, no retículo endoplasmático através da oxidação de proteínas e no citosol pelos sistemas NADPH oxidase (PÉCHERY et al., 2016; PERILLO et al., 2020).

No geral, é razoável supor que os processos oxidativos poderiam mediar a liberação de fatores pró-apoptóticos das mitocôndrias. No entanto, em nosso trabalho não foi

identificado que [6]-Shogaol induza um aumento do nível de EROs intracelular. Dessa forma, foi possível sugerir que [6]-Shogaol não induz a ocorrência desses eventos no interior das células e que os eventos subsequentes aos danos celulares exibidos, aparentemente não são mediados por este mecanismo. Sendo este acontecimento não esperado, já que foi amplamente relatado por outros estudos que um dos mecanismos chave da citotoxicidade induzida por [6]-Shogaol deviam-se ao aumento de EROs intracelular, induzindo consequentemente, o comprometimento da funcionalidade do retículo endoplasmático, ativação de caspase e indução de apoptose intrínseca (células Jurkat de leucemia humana) (LIU, Q. et al., 2013). Essa relação de dependência entre o aumento de EROs e o desencadeamento de um processo apoptótico posterior, também foi relatado no estudo de Yadav *et al.*, (2020), no qual descrevem o papel das EROs na ocorrência dos eventos subsequentes da: modulação de STAT3, fragmentação do DNA, ativação da caspase 9, clivagem de PARP, e inibição do crescimento. Ademais, evidenciaram que após o co-tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC), a ocorrência dos eventos induzidos por [6]-Shogaol foi revertida, nos sugerindo que a sequência desses acontecimentos finaliza no processo apoptótico e é dependente do aumento de EROs intracelular mediado por [6]-Shogaol, eventos evidenciados em células de liposarcoma humano (SW872) (YADAV; JANG, 2020). No entanto, [6]-Shogaol não só induz efeitos pró-oxidantes nas células tumorais, como também foi reportado em diferentes estudos a característica dicotômica que possui este composto em relação à modulação de EROs intracelular. No estudo de Chen e colaboradores (2014), foi descrito que [6]-Shogaol regula positivamente a expressão e translocação ao núcleo do fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 (Nrf2). Uma vez no núcleo, Nrf2 regula a transcrição de diferentes genes, como o gene que codifica a subunidade catalítica de glutamato-cisteína ligase (GCLC) e o gene que codifica a subunidade modificadora de glutamato-cisteína ligase (GCLM), as quais participam na síntese da glutathiona (GSH), o principal tripeptídeo responsável por reduzir o nível de EROs intracelular por meio de sua ação antioxidante, esta regulação parece ser mediada pela inibição de Keap1 (inibidor da translocação de Nrf2), desencadeada pela modificação que causa [6]-Shogaol a vários resíduos de cisteína da proteína Keap1, porém, a ativação de Nrf2 também é mediada pelas vias MAPKs e PI3K / AKT, que aparentemente também são reguladas por [6]-Shogaol, eventos identificados em células de carcinoma de cólon humano HCT-116 (CHEN et al., 2014). Na realidade, [6]-Shogaol pode induzir diferentes comportamentos no sistema oxido-redução das células, incitando, em alguns casos, efeitos pró-oxidantes e em outros antioxidantes, porém mais estudos são necessários para identificar se alguma alteração neste sistema é responsável ou mediadora dos efeitos citotóxicos observados nas células tumorais de bexiga MB49.

Com base nas imagens obtidas no ensaio de condensação e fragmentação nuclear, é possível sugerir que um dos mecanismos envolvidos na atividade citotóxica de [6]-Shogaol, aparentemente são os danos às estruturas nucleares, evidenciada pela presença de eventos de condensação de cromatina em torno do envelope nuclear e a fragmentação nuclear, acontecimentos típicos da apoptose, designados classicamente como morfologia nuclear apoptótica de estágio I e II respectivamente (GARCIA-BELINCHÓN et al., 2015; IGLESIAS-GUIMARAIS et al., 2013). Segundo o estudo de Iglesias-Guimaraes (2013), a morfologia nuclear apoptótica de estágio II está associada à ativação do fator de fragmentação de DNA (DFF40 / CAD), uma endonuclease ativada pela caspase-3 que hidrolisa o DNA em fragmentos de tamanho oligonucleossômico, sendo a atividade catalítica desta endonuclease necessária para a ocorrência da fragmentação nuclear (IGLESIAS-GUIMARAIS et al., 2013). De acordo com o estudo de Annamalai e colaboradores (2016), foi relatado que [6]-Shogaol inibe a proliferação das células de câncer de laringe Hep-2 por meio da indução de um processo apoptótico mediado por dano mitocondrial dependente de EROs, provocada por uma série de eventos que envolvem a modulação da expressão das proteínas Bcl-2 e Bax, liberação do citocromo-c, ativação das caspases 9 e 3, dano oxidativo ao DNA e a fragmentação nuclear (ANNAMALAI et al., 2016). No estudo de Li e colaboradores (2017), da mesma forma, os autores relatam que [6]-Shogaol é capaz de induzir fragmentação nuclear como parte de uma série de efeitos citotóxicos, nas células de câncer de colorretal humano HT-29, que culminam na morte celular apoptótica mediada por caspases. Porém, nesse estudo [6]-Shogaol também induziu morte celular autofágica (LI; CHIANG, 2017). Levando em consideração estas informações, podemos sugerir que os acontecimentos de fragmentação nuclear evidenciados em nosso estudo, poderiam estar mediados por caspases. No entanto, análises mais específicas são necessárias.

Baseados nos resultados descritos anteriormente e nos diversos estudos que relatam o potencial pró-apoptótico de [6]-Shogaol (BAWADOOD et al., 2020; KIM et al., 2014; LI; CHIANG, 2017; LIU, Q. et al., 2012), foi analisada qualitativa e quantitativamente a capacidade de [6]-Shogaol de incitar a ocorrência deste processo de morte celular nas células em estudo. Assim, através das imagens obtidas com o auxílio dos fluorocromos, foi possível observar os fenótipos associados a eventos de apoptose dependentes da concentração, porém, também foi possível identificar alguns eventos de necrose na maior concentração testada, resultados que foram validados posteriormente com a citometria de fluxo. Nesta, não só foi verificado que [6]-Shogaol induz predominantemente um processo apoptótico, assim como também se evidenciou que as células tumorais MB49 apresentavam maior sensibilidade aos efeitos do composto, em relação às células não tumorais L929. Apesar de não ter registro na literatura de algum estudo que revele os efeitos de [6]-Shogaol em células de câncer de

bexiga, modelos celulares ou ensaios *in vivo*, estes resultados concordam com diferentes estudos que avaliam o potencial pró-apoptótico de [6]-Shogaol em outros modelos de cânceres, como o estudo de Liu e colaboradores (2013), no qual descrevem uma relação concentração-dependente na indução da apoptose, após a exposição a [6]-Shogaol por 24 horas em células Jurkat, U937 e HL-60 (células de leucemia humana), além de também observar um efeito seletivo às células tumorais em relação às células mononucleares da medula óssea normal (LIU, Q. et al., 2013). A capacidade de [6]-Shogaol de iniciar o processo de apoptose em células tumorais, também foi descrito no estudo de Yadav e colaboradores (2020), no qual relatam que [6]-Shogaol reduziu o nível de expressão e fosforilação do gene STAT3, um gene que possui um papel crucial na proliferação e que é ativado constitutivamente em diferentes neoplasias. Porém, quando este gene é inibido, induz a supressão do crescimento e leva à apoptose, fato que foi confirmado ao realizar seu silenciamento com siRNA e ao usar um inibidor de pan-caspase, evidenciando a partir desses acontecimentos que [6]-Shogaol induz apoptose de maneira dependente de caspase e através da modulação da expressão e fosforilação de STAT3 em células de lipossarcoma humano (SW872) (YADAV; JANG, 2020).

As imagens obtidas do ensaio com os marcadores fluorescentes AO e PI, além de apresentar os fenótipos de morte celular apoptótica e necrótica induzidos por [6]-Shogaol, mostraram um tipo de estruturas celulares semelhantes a vesículas de diferentes dimensões, sendo o tamanho de algumas delas comparáveis ao do núcleo. Uma das características destacáveis destas estruturas foi que, apesar das células serem expostas a concentrações consideradas como não letais, este evento não foi isolado, já que, quando foram replicadas as mesmas condições do ensaio, a fim de observar melhor estas estruturas, com o auxílio da coloração de panóptico rápido, só foram visualizadas nas células tumorais (Figura 22C, Anexos). Dessa forma, foi possível identificar que essas estruturas se assemelhavam a vacúolos e que seu conteúdo não era o suficientemente ácido para sequestrar ao fluorocromo AO e, descartando assim, a possibilidade de que fossem lisossomos ou autofagolisossomos. Baseados em todas as características identificadas, é possível sugerir que estes eventos poderiam ser resultado de um processo de vacuolização citoplasmática denominado macropinocitose.

A macropinocitose é uma via de endocitose inespecífica, que se caracteriza pela internalização em macropinosomas, de grandes quantidades de fluido extracelular, que inclui uma diversa gama de moléculas presentes na mesma, como nutrientes, fragmentos de membrana plasmática e antígenos (LIN; MINTERN; GLEESON, 2020). Esta via endocítica é parte de diferentes processos fisiológicos, como apresentação antigênica, detecção e endocitose de nutrientes em períodos de inanição, reciclagem de proteínas, sinalização e

migração (LIN et al., 2020). No entanto, a macropinocitose também é capaz de induzir morte celular por um processo desregulado de vacuolização excessiva e tráfego disfuncional denominado metuose, o qual é um fenótipo de morte celular não apoptótica, caracterizado pela acumulação de macropinosomas no citoplasma, que induz a perda da capacidade metabólica e da integridade da membrana plasmática (HA; BIDLINGMAIER; LIU, 2016; MALTESE; OVERMEYER, 2014). Nossas descobertas também são concordantes em certo grau com a revisão de Golstein e colaboradores (2007), na qual relataram a existência de um modelo de morte celular associada à vacuolização que não está relacionado à autofagia em células de glioblastoma U251, onde foram observados um acúmulo de vacúolos que excluem o marcador de autofagia LC3 (GOLSTEIN; KROEMER, 2007). A partir destas informações, é possível sugerir que os eventos de vacuolização observados corresponderiam a um processo de macropinocitose, possivelmente induzido por danos e estresse incitados por [6]-Shogaol. Porém é necessário a realização de outros ensaios para confirmar esta hipótese.

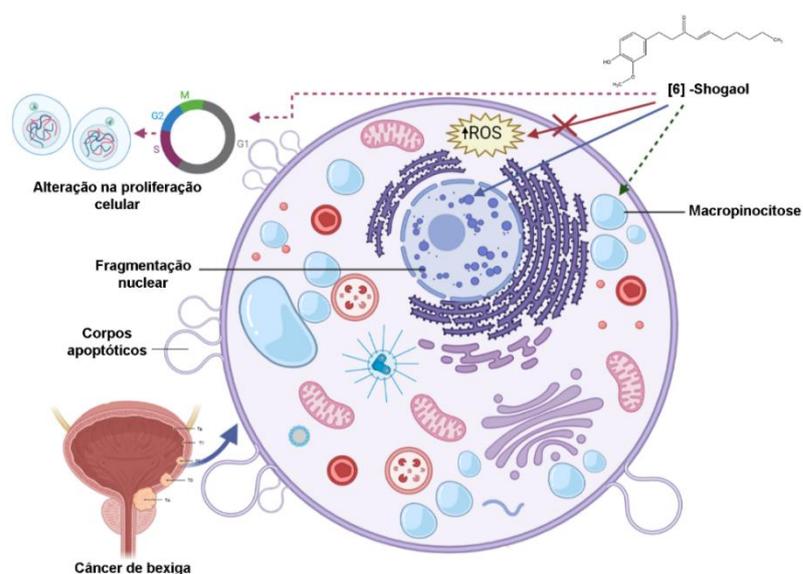
Considerando o processo de migração celular, foi evidenciado que [6]-Shogaol aparentemente não inibiu a migração das células MB49, em nenhuma das concentrações testadas, conforme a semelhança dos perfis de migração das células expostas a [6]-Shogaol e as células controle. Segundo estas avaliações, é possível indicar que [6]-Shogaol parece não apresentar uma atividade anti-migratória neste modelo celular, porém, não descartamos que o composto induza este tipo de atividade em outro modelo celular de câncer de bexiga. No entanto, a utilização desta linhagem celular para este tipo de avaliação é comum, já que apesar de não evidenciar eventos migratórios proeminentes nas células controle, a migração evidenciada é suficiente para avaliar possíveis potenciais anti-migratórios provocados pelos tratamentos em estudo.

## 7. CONCLUSÕES

O presente trabalho identificou o efeito citotóxico e pró-apoptótico do composto [6]-Shogaol em células tumorais de câncer de bexiga.

[6]-Shogaol apresentou efeitos citotóxicos semelhantes na inibição metabólica das células tumorais de bexiga MB49 em relação aos fibroblastos não tumorais L929, e mostrou que os efeitos citotóxicos do composto são capazes de modificar a morfologia dessas células. Também inibiu a capacidade clonôgenica de formação de colônias das células tumorais, além de apresentar um efeito citostático que alterou o processo de divisão celular típico das células tumorais. O composto [6]-Shogaol também foi capaz de induzir eventos de fragmentação nuclear que possivelmente foram promotores da apoptose induzida por este composto. Porém, observamos que a via não foi incitada por uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio. Também não se identificou a existência de um potencial anti-migratório induzido por [6]-Shogaol.

Esses resultados mostram que o [6]-Shogaol possui potencial como um novo alvo de pesquisa direcionado na procura de agentes terapêuticos para os tratamentos do câncer de bexiga. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados com a finalidade de confirmar e investigar as vias envolvidas nos efeitos de citotoxicidade evidenciados e, partir desses resultados complementares plantear combinações com outros agentes terapêuticos usados nos regimes de tratamento do câncer de bexiga, para melhorar sua eficácia e seu perfil de segurança, e assim, posteriormente verificar seus efeitos em modelos animais, *in vivo*.



**Figura 18.** Resumo da atuação de [6]-Shogaol nas células de câncer de bexiga murino MB49 *in vitro*. [6]-Shogaol induziu a morte celular apoptótica, a qual foi mediada pela fragmentação nuclear em ensaios *in vitro*. Também apresentou um potencial citostático mediado por uma alteração no processo de divisão celular e aparentemente incitou eventos de macropinocitose em ensaios *in vitro*. **Fonte:** Autor (2021), realizado com o auxílio de Biorender.

## 8. REFERÊNCIAS.

ABBAOUI, B.; LUCAS, C. R.; RIEDL, K. M.; CLINTON, S. K.; MORTAZAVI, A. Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Bladder Cancer Prevention. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 18, p. e1800079-e1800079, 2018.

Agência Internacional de Pesquisa do Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC). *GLOBOCAN 2020: estimativa de incidência, mortalidade e prevalência de câncer em todo o mundo em 2020 a 2030*. [homepage na internet]; 2020 [citado em 22 de abril de 2021]. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

ANNAMALAI, G.; KATHIRESAN, S.; KANNAPPAN, N. [6]-Shogaol, a dietary phenolic compound, induces oxidative stress mediated mitochondrial dependant apoptosis through activation of proapoptotic factors in Hep-2 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 226-236, 2016/08/01/ 2016.

ANTONI, S.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ZNAOR, A.; JEMAL, A.; BRAY, F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **Eur Urol**, v. 71, n. 1, p. 96-108, Jan 2017.

APOLO, A. B.; VOGELZANG, N. J.; THEODORESCU, D. New and promising strategies in the management of bladder cancer. **American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting**, p. 105-112, 2015.

BABJUK, M. Trends in Bladder Cancer Incidence and Mortality: Success or Disappointment? **European Urology**, v. 71, n. 1, p. 109-110, 2017/01/01/ 2017.

BABJUK, M.; BÖHLE, A.; BURGER, M.; CAPOUN, O.; COHEN, D.; COMPÉRAT, E. M.; HERNÁNDEZ, V.; KAASINEN, E.; PALOU, J.; ROUPRÊT, M.; VAN RHIJN, B. W. G.; SHARIAT, S. F.; SOUKUP, V.; SYLVESTER, R. J.; ZIGEUNER, R. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. **Eur Urol**, v. 71, n. 3, p. 447-461, Mar 2017.

BABJUK, M.; BURGER, M.; COMPÉRAT, E. M.; GONTERO, P.; MOSTAFID, A. H.; PALOU, J.; VAN RHIJN, B. W. G.; ROUPRÊT, M.; SHARIAT, S. F.; SYLVESTER, R.; ZIGEUNER, R.; CAPOUN, O.; COHEN, D.; ESCRIG, J. L. D.; HERNÁNDEZ, V.; PEYRONNET, B.; SEISEN, T.; SOUKUP, V. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. **European Urology**, v. 76, n. 5, p. 639-657, 2019/11/01/ 2019.

BAWADOOD, A. S.; AL-ABBASI, F. A.; ANWAR, F.; EL-HALAWANY, A. M.; AL-ABD, A. M. 6-Shogaol suppresses the growth of breast cancer cells by inducing apoptosis and suppressing autophagy via targeting notch signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 110302, 2020/08/01/ 2020.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6, p. 499-503, 2003/01/01/ 2003.

BIRDER, L.; ANDERSSON, K.-E. Urothelial signaling. **Physiological reviews**, v. 93, n. 2, p. 653-680, 2013.

BRANCH, D. R.; CALDERWOOD, S.; CECUTTI, M. A.; HERST, R.; SOLH, H. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. **Transfusion**, v. 34, n. 10, p. 887-90, Oct 1994.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CARIOLI, G.; BERTUCCIO, P. Cancer mortality predictions for 2019 in Latin America. v. 147, n. 3, p. 619-632, Aug 1 2020.

COMPÉRAT, E.; VARINOT, J.; MOROCH, J.; EYMERIT-MORIN, C.; BRIMO, F. A practical guide to bladder cancer pathology. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 3, p. 143-154, 2018/03/01 2018.

COSSARIZZA, A.; CHANG, H.-D.; RADBRUCH, A.; ACS, A.; ADAM, D.; ADAM-KLAGES, S.; AGACE, W. W.; AGHAEPOUR, N.; AKDIS, M.; ALLEZ, M.; ALMEIDA, L. N.; ALVISI, G.; ANDERSON, G.; ANDRĂ, I.; ANNUNZIATO, F.; ANSELMO, A.; BACHER, P.; BALDARI, C. T.; BARI, S.; BARNABA, V.; BARROS-MARTINS, J.; BATTISTINI, L.; BAUER, W.; BAUMGART, S.; BAUMGARTH, N.; BAUMJOHANN, D.; BAYING, B.; BEBAWY, M.; BECHER, B.; BEISKER, W.; BENES, V.; BEYAERT, R.; BLANCO, A.; BOARDMAN, D. A.; BOGDAN, C.; BORGER, J. G.; BORSELLINO, G.; BOULAIS, P. E.; BRADFORD, J. A.; BRENNER, D.; BRINKMAN, R. R.; BROOKS, A. E. S.; BUSCH, D. H.; BÜSCHER, M.; BUSHNELL, T. P.; CALZETTI, F.; CAMERON, G.; CAMMARATA, I.; CAO, X.; CARDELL, S. L.; CASOLA, S.; CASSATELLA, M. A.; CAVANI, A.; CELADA, A.; CHATENAUD, L.; CHATTOPADHYAY, P. K.; CHOW, S.; CHRISTAKOU, E.; ČIČIN-ŠAIN, L.; CLERICI, M.; COLOMBO, F. S.; COOK, L.; COOKE, A.; COOPER, A. M.; CORBETT, A. J.; COSMA, A.; COSMI, L.; COULIE, P. G.; CUMANO, A.; CVETKOVIC, L.; DANG, V. D.; DANG-HEINE, C.; DAVEY, M. S.; DAVIES, D.; DE BIASI, S.; DEL ZOTTO, G.; DELA CRUZ, G. V.; DELACHER, M.; DELLA BELLA, S.; DELLABONA, P.; DENIZ, G.; DESSING, M.; DI SANTO, J. P.; DIFENBACH, A.; DIELI, F.; DOLF, A.; DÖRNER, T.; DRESS, R. J.; DUDZIAK, D.; DUSTIN, M.; DUTERTRE, C.-A.; EBNER, F.; ECKLE, S. B. G.; EDINGER, M.; EEDE, P.; EHRHARDT, G. R. A.; EICH, M.; ENGEL, P.; ENGELHARDT, B.; ERDEI, A.; ESSER, C.; EVERTS, B.; EVRARD, M.; FALK, C. S.; FEHNIGER, T. A.; FELIPO-BENAVENT, M.; FERRY, H.; FEUERER, M.; FILBY, A.; FILKOR, K.; FILLATREAU, S.; FOLLO, M.; FÖRSTER, I.; FOSTER, J.; FOULDS, G. A.; FREHSE, B.; FRENETTE, P. S.; FRISCHBUTTER, S.; FRITZSCHE, W.; GALBRAITH, D. W.; GANGAEV, A.; GARBI, N.; GAUDILLIERE, B.; GAZZINELLI, R. T.; GEGINAT, J.; GERNER, W.; GHERARDIN, N. A.; GHORESCHI, K.; GIBELLINI, L.;

GINHOX, F.; GODA, K.; GODFREY, D. I.; GOETTLINGER, C.; GONZÁLEZ-NAVAJAS, J. M.; GOODYEAR, C. S.; GORI, A.; GROGAN, J. L.; GRUMMITT, D.; GRÜTZKAU, A.; HAFTMANN, C.; HAHN, J.; HAMMAD, H.; HÄMMERLING, G.; HANSMANN, L.; HANSSON, G.; HARPUR, C. M.; HARTMANN, S.; HAUSER, A.; HAUSER, A. E.; HAVILAND, D. L.; HEDLEY, D.; HERNÁNDEZ, D. C.; HERRERA, G.; HERRMANN, M.; HESS, C.; HÖFER, T.; HOFFMANN, P.; HOGQUIST, K.; HOLLAND, T.; HÖLLT, T.; HOLMDAHL, R.; HOMBRINK, P.; HOUSTON, J. P.; HOYER, B. F.; HUANG, B.; HUANG, F.-P.; HUBER, J. E.; HUEHN, J.; HUNDEMER, M.; HUNTER, C. A.; HWANG, W. Y. K.; IANNONE, A.; INGELFINGER, F.; IVISON, S. M.; JÄCK, H.-M.; JANI, P. K.; JÁVEGA, B.; JONJIC, S.; KAISER, T.; KALINA, T.; KAMRADT, T.; KAUFMANN, S. H. E.; KELLER, B.; KETELAARS, S. L. C.; KHALILNEZHAD, A.; KHAN, S.; KISIELOW, J.; KLENERMAN, P.; KNOPF, J.; KOAY, H.-F.; KOBOW, K.; KOLLS, J. K.; KONG, W. T.; KOPF, M.; KORN, T.; KRIEGSMANN, K.; KRISTYANTO, H.; KRONEIS, T.; KRUEGER, A.; KÜHNE, J.; KUKAT, C.; KUNKEL, D.; KUNZE-SCHUMACHER, H.; KUROSAKI, T.; KURTS, C.; KVISTBORG, P.; KWOK, I.; LANDRY, J.; LANTZ, O.; LANUTI, P.; LAROSA, F.; LEHUEN, A.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; LEIPOLD, M. D.; LEUNG, L. Y. T.; LEVINGS, M. K.; LINO, A. C.; LIOTTA, F.; LITWIN, V.; LIU, Y.; LJUNGGREN, H.-G.; LOHOFF, M.; LOMBARDI, G.; LOPEZ, L.; LÓPEZ-BOTET, M.; LOVETT-RACKE, A. E.; LUBBERTS, E.; LUCHE, H.; LUDEWIG, B.; LUGLI, E.; LUNEMANN, S.; MAECKER, H. T.; MAGGI, L.; MAGUIRE, O.; MAIR, F.; MAIR, K. H.; MANTOVANI, A.; MANZ, R. A.; MARSHALL, A. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, A.; MARTRUS, G.; MARVENTANO, I.; MASLINSKI, W.; MATARESE, G.; MATTIOLI, A. V.; MAUERÖDER, C.; MAZZONI, A.; MCCCLUSKEY, J.; MCGRATH, M.; MCGUIRE, H. M.; MCINNES, I. B.; MEI, H. E.; MELCHERS, F.; MELZER, S.; MIELENZ, D.; MILLER, S. D.; MILLS, K. H. G.; MINDERMAN, H.; MJÖSBERG, J.; MOORE, J.; MORAN, B.; MORETTA, L.; MOSMANN, T. R.; MÜLLER, S.; MULTHOFF, G.; MUÑOZ, L. E.; MÜNZ, C.; NAKAYAMA, T.; NASI, M.; NEUMANN, K.; NG, L. G.; NIEDOBITEK, A.; NOURSHARGH, S.; NÚÑEZ, G.; O'CONNOR, J.-E.; OCHEL, A.; OJA, A.; ORDONEZ, D.; ORFAO, A.; ORLOWSKI-OLIVER, E.; OUYANG, W.; OXENIUS, A.; PALANKAR, R.; PANSE, I.; PATTANAPANYASAT, K.; PAULSEN, M.; PAVLINIC, D.; PENTER, L.; PETERSON, P.; PETH, C.; PETRIZ, J.; PIANCONE, F.; PICKL, W. F.; PICONESI, S.; PINTI, M.; POCKLEY, A. G.; PODOLSKA, M. J.; POON, Z.; PRACHT, K.; PRINZ, I.; PUCILLO, C. E. M.; QUATAERT, S. A.; QUATRINI, L.; QUINN, K. M.; RADBRUCH, H.; RADSTAKE, T. R. D. J.; RAHMIG, S.; RAHN, H.-P.; RAJWA, B.; RAVICHANDRAN, G.; RAZ, Y.; REBHAHN, J. A.; RECKTENWALD, D.; REIMER, D.; REIS E SOUSA, C.; REMMERSWAAL, E. B. M.; RICHTER, L.; RICO, L. G.; RIDDELL, A.; RIEGER, A. M.; ROBINSON, J. P.; ROMAGNANI, C.; RUBARTELLI, A.; RULAND, J.; SAALMÜLLER, A.; SAEYS, Y.; SAITO, T.; SAKAGUCHI, S.; SALA-DE-OYANGUREN, F.; SAMSTAG, Y.; SANDERSON, S.; SANDROCK, I.; SANTONI, A.; SANZ, R. B.; SARESELLA, M.; SAUTESFRIDMAN, C.; SAWITZKI, B.; SCHADT, L.; SCHEFFOLD, A.; SCHERER, H. U.; SCHIEMANN, M.; SCHILDBERG, F. A.; SCHIMISKY, E.; SCHLITZER, A.; SCHLOSSER, J.; SCHMID, S.; SCHMITT, S.; SCHÖBER, K.; SCHRAIVOGEL, D.; SCHUH, W.; SCHÜLER, T.; SCHULTE, R.; SCHULZ, A. R.; SCHULZ, S. R.; SCOTTÁ, C.; SCOTT-ALGARA, D.; SESTER, D. P.; SHANKEY, T. V.; SILVA-SANTOS, B.; SIMON, A. K.; SITNIK, K. M.; SOZZANI, S.; SPEISER, D. E.; SPIDLEN, J.; STAHLBERG, A.; STALL, A. M.; STANLEY, N.; STARK, R.; STEHLE, C.; STEINMETZ, T.; STOCKINGER, H.; TAKAHAMA, Y.; TAKEDA, K.; TAN, L.; TÁRNOK, A.; TIEGS, G.; TOLDI, G.; TORNACK, J.; TRAGGIAI, E.; TREBAK, M.; TREE, T. I. M.; TROTTER, J.; TROWSDALE, J.; TSOUMAKIDOU, M.; ULRICH, H.; URBANCZYK, S.; VAN DE VEEN, W.; VAN DEN BROEK, M.; VAN DER POL, E.; VAN GASSEN, S.; VAN ISTERDAEL, G.; VAN LIER, R. A. W.; VELDHOEN, M.; VENTO-ASTURIAS, S.; VIEIRA, P.; VOEHRINGER, D.; VOLK, H.-D.; VON BORSTEL, A.; VON VOLKMANN, K.; WAISMAN, A.; WALKER, R. V.; WALLACE, P. K.; WANG, S. A.; WANG, X. M.; WARD, M. D.; WARDHARTSTONGE, K. A.; WARNATZ, K.; WARNES, G.; WARTH, S.; WASKOW, C.; WATSON, J. V.; WATZL, C.; WEGENER, L.; WEISENBURGER, T.; WIEDEMANN, A.; WIENANDS, J.; WILHARM, A.; WILKINSON, R. J.; WILLIMSKY, G.; WING, J. B.; WINKELMANN, R.; WINKLER, T. H.; WIRZ, O. F.; WONG, A.; WURST, P.; YANG, J. H. M.; YANG, J.; YAZDANBAKHSH, M.; YU, L.; YUE, A.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZIEGLER, S. M.; ZIELINSKI,

C.; ZIMMERMANN, J.; ZYCHLINSKY, A. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). **European journal of immunology**, v. 49, n. 10, p. 1457-1973, 2019.

COTTET-ROUSSELLE, C.; RONOT, X.; LEVERVE, X.; MAYOL, J. F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. **Cytometry A**, v. 79, n. 6, p. 405-25, Jun 2011.

CUMBERBATCH, M. G. K.; JUBBER, I.; BLACK, P. C.; ESPERTO, F.; FIGUEROA, J. D.; KAMAT, A. M.; KIEMENEY, L.; LOTAN, Y.; PANG, K.; SILVERMAN, D. T.; ZNAOR, A.; CATTO, J. W. F. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. **Eur Urol**, v. 74, n. 6, p. 784-795, Dec 2018.

CHAURIO, R. A.; JANKO, C.; MUÑOZ, L. E.; FREY, B.; HERRMANN, M.; GAIPL, U. S. Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 12, p. 4892-4914, 2009.

CHEN, H.; FU, J.; CHEN, H.; HU, Y.; SOROKA, D. N.; PRIGGE, J. R.; SCHMIDT, E. E.; YAN, F.; MAJOR, M. B.; CHEN, X.; SANG, S. Ginger compound [6]-shogaol and its cysteine-conjugated metabolite (M2) activate Nrf2 in colon epithelial cells in vitro and in vivo. **Chemical research in toxicology**, v. 27, n. 9, p. 1575-1585, 2014.

CHOUDHARI, A. S.; MANDAVE, P. C.; DESHPANDE, M.; RANJEKAR, P.; PRAKASH, O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1614-1614, 2020.

DA VIOLANTE, G.; ZERROUK, N.; RICHARD, I.; PROVOT, G.; CHAUMEIL, J. C.; ARNAUD, P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 12, p. 1600-3, Dec 2002.

DANDAWATE, P. R.; SUBRAMANIAM, D.; JENSEN, R. A.; ANANT, S. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. **Seminars in cancer biology**, v. 40-41, p. 192-208, 2016.

DARWICHE, N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 7, p. 1954-1978, 2020.

DE MENORVAL, M. A.; MIR, L. M.; FERNANDEZ, M. L.; REIGADA, R. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41733, 2012.

DINNEY, C. P. N.; MCCONKEY, D. J.; MILLIKAN, R. E.; WU, X.; BAR-ELI, M.; ADAM, L.; KAMAT, A. M.; SIEFKER-RADTKE, A. O.; TUZIAK, T.; SABICHI, A. L.; GROSSMAN, H. B.;

BENEDICT, W. F.; CZERNIAK, B. Focus on bladder cancer. **Cancer Cell**, v. 6, n. 2, p. 111-116, 2004.

DOBRUCH, J.; DANESHMAND, S.; FISCH, M.; LOTAN, Y.; NOON, A. P.; RESNICK, M. J.; SHARIAT, S. F.; ZLOTTA, A. R.; BOORJIAN, S. A. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. **European Urology**, v. 69, n. 2, p. 300-310, 2016/02/01/ 2016.

DONSKY, H.; COYLE, S.; SCOSYREV, E.; MESSING, E. M. Sex differences in incidence and mortality of bladder and kidney cancers: National estimates from 49 countries. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 1, p. 40.e23-40.e31, 2014/01/01/ 2014.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In: ARMSTRONG, D. (Ed.). **Advanced Protocols in Oxidative Stress II**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p.57-72. ISBN 978-1-60761-411-1.

FIDLER, M. M.; BRAY, F.; SOERJOMATARAM, I. The global cancer burden and human development: A review. **Scand J Public Health**, v. 46, n. 1, p. 27-36, Feb 2018.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006/12/01 2006.

GALON, J.; BRUNI, D. Tumor immunology and tumor evolution: intertwined histories. **Immunity**, v. 52, n. 1, p. 55-81, 2020.

GARCIA-BELINCHÓN, M.; SÁNCHEZ-OSUNA, M.; MARTÍNEZ-ESCARDÓ, L.; GRANADOS-COLOMINA, C.; PASCUAL-GUIRAL, S.; IGLESIAS-GUIMARAIS, V.; CASANELLES, E.; RIBAS, J.; YUSTE, V. J. An Early and Robust Activation of Caspases Heads Cells for a Regulated Form of Necrotic-like Cell Death. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 34, p. 20841-20855, 2015.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. A multiplicity of cell death pathways. **EMBO reports**, v. 8, n. 9, p. 829-833, 2007.

GURTOVENKO, A. A.; ANWAR, J. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 35, p. 10453-10460, 2007/09/01 2007.

HA, K. D.; BIDLINGMAIER, S. M.; LIU, B. Macropinocytosis Exploitation by Cancers and Cancer Therapeutics. **Front Physiol**, v. 7, p. 381, 2016.

HAMMOUDEH, S. M.; HAMMOUDEH, A. M.; HAMOUDI, R. High-throughput quantification of the effect of DMSO on the viability of lung and breast cancer cells using an easy-to-use spectrophotometric trypan blue-based assay. **Histochem Cell Biol**, v. 152, n. 1, p. 75-84, Jul 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HE, Y.; ZHU, Q.; CHEN, M.; HUANG, Q.; WANG, W.; LI, Q.; HUANG, Y.; DI, W. The changing 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 43, p. 70803-70821, 2016.

HORNE, S. D.; POLLICK, S. A.; HENG, H. H. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. **Int J Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2012-21, May 1 2015.

HORWICH, A.; BABJUK, M.; BELLMUNT, J.; BRUINS, H. M.; DE REIJKE, T. M.; DE SANTIS, M.; GILLESSEN, S.; JAMES, N.; MACLENNAN, S.; PALOU, J.; POWLES, T.; RIBAL, M. J.; SHARIAT, S. F.; VAN DER KWAST, T.; XYLINAS, E.; AGARWAL, N.; ARENDS, T.; BAMIAS, A.; BIRTLE, A.; BLACK, P. C.; BOCHNER, B. H.; BOLLA, M.; BOORMANS, J. L.; BOSSI, A.; BRIGANTI, A.; BRUMMELHUIS, I.; BURGER, M.; CASTELLANO, D.; CATHOMAS, R.; CHITI, A.; CHOUDHURY, A.; COMPÉRAT, E.; CRABB, S.; CULINE, S.; DE BARI, B.; DEBLOK, W.; DE VISSCHERE, P. J. L.; DECAESTECKER, K.; DIMITROPOULOS, K.; DOMINGUEZ-ESCRIG, J. L.; FANTI, S.; FONTEYNE, V.; FRYDENBERG, M.; FUTTERER, J. J.; GAKIS, G.; GEAVLETE, B.; GONTERO, P.; GRUBMÜLLER, B.; HAFEEZ, S.; HANSEL, D. E.; HARTMANN, A.; HAYNE, D.; HENRY, A. M.; HERNANDEZ, V.; HERR, H.; HERRMANN, K.; HOSKIN, P.; HUGUET, J.; JERECZEK-FOSSA, B. A.; JONES, R.; KAMAT, A. M.; KHOO, V.; KILTIE, A. E.; KREGE, S.; LADOIRE, S.; LARA, P. C.; LELIVELD, A.; LINARES-ESPINÓS, E.; LØGAGER, V.; LORCH, A.; LORIOT, Y.; MEIJER, R.; CARMEN MIR, M.; MOSCHINI, M.; MOSTAFID, H.; MÜLLER, A. C.; MÜLLER, C. R.; N'DOW, J.; NECCHI, A.; NEUZILLET, Y.; ODDENS, J. R.; OLDENBURG, J.; OSANTO, S.; OYEN, W. J. G.; PACHECO-FIGUEIREDO, L.; PAPPOT, H.; PATEL, M. I.; PIETERS, B. R.; PLASS, K.; REMZI, M.; RETZ, M.; RICHENBERG, J.; RINK, M.; ROGHMANN, F.; ROSENBERG, J. E.; ROUPRÊT, M.; ROUVIÈRE, O.; SALEMBIER, C.; SALMINEN, A.; SARGOS, P.; SENGUPTA, S.; SHERIF, A.; SMEENK, R. J.; SMITS, A.; STENZL, A.; THALMANN, G. N.; TOMBAL, B.; TURKBEY, B.; VAHR LAURIDSEN, S.; VALDAGNI, R.; VAN DER HEIJDEN, A. G.; VAN POPPEL, H.; VARTOLOMEI, M. D.; VESKIMÄE, E.; VILASECA, A.; VIVES RIVERA, F. A.; WIEGEL, T.; WIKLUND, P.; WILLIAMS, A.; ZIGEUNER, R.; WITJES, J. A. EAU-ESMO consensus statements on the management of advanced and variant bladder cancer-an international collaborative multi-stakeholder effort: under the auspices of the EAU and ESMO Guidelines Committees†. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 30, n. 11, p. 1697-1727, 2019.

HUANG, Y.; ZHOU, S.; HE, C.; DENG, J.; TAO, T.; SU, Q.; DARKO, K. O.; PENG, M.; YANG, X. Phenformin alone or combined with gefitinib inhibits bladder cancer via AMPK and EGFR pathways. **Cancer Communications**, v. 38, n. 1, p. 50, 2018/07/27 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: Estatísticas do câncer de bexiga: INCA, 2021.

IGLESIAS-GUIMARAIS, V.; GIL-GUIÑÓN, E.; SÁNCHEZ-OSUNA, M.; CASANELLES, E.; GARCÍA-BELINCHÓN, M.; COMELLA, J. X.; YUSTE, V. J. Chromatin collapse during caspase-dependent apoptotic cell death requires DNA fragmentation factor, 40-kDa subunit-/caspase-activated deoxyribonuclease-mediated 3'-OH single-strand DNA breaks. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 13, p. 9200-9215, 2013.

ISHIGURO, K.; ANDO, T.; WATANABE, O.; GOTO, H. Specific reaction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds such as 6-shogaol with sulfhydryl groups in tubulin leading to microtubule damage. **FEBS Letters**, v. 582, n. 23, p. 3531-3536, 2008/10/15/ 2008.

JIANG, L.; LIU, B.; QI, Y.; ZHU, L.; CUI, X.; LIU, Z. Antagonistic effects of activin A and TNF- $\alpha$  on the activation of L929 fibroblast cells via Smad3-independent signaling. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 20623-20623, 2020.

JONKMAN, J. E. N.; CATHCART, J. A.; XU, F.; BARTOLINI, M. E.; AMON, J. E.; STEVENS, K. M.; COLARUSSO, P. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell adhesion & migration**, v. 8, n. 5, p. 440-451, 2014.

KAMAT, A. M.; HAHN, N. M.; EFSTATHIOU, J. A.; LERNER, S. P.; MALMSTRÖM, P.-U.; CHOI, W.; GUO, C. C.; LOTAN, Y.; KASSOUF, W. Bladder cancer. **The Lancet**, v. 388, n. 10061, p. 2796-2810, 2016/12/03/ 2016.

KARNA, P.; CHAGANI, S.; GUNDALA, S. R.; RIDA, P. C.; ASIF, G.; SHARMA, V.; GUPTA, M. V.; ANEJA, R. Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. **Br J Nutr**, v. 107, n. 4, p. 473-84, Feb 2012.

KHANDELWAL, P.; ABRAHAM, S. N.; APODACA, G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 297, n. 6, p. F1477-F1501, 2009.

KIM, M. O.; LEE, M.-H.; OI, N.; KIM, S.-H.; BAE, K. B.; HUANG, Z.; KIM, D. J.; REDDY, K.; LEE, S.-Y.; PARK, S. J.; KIM, J. Y.; XIE, H.; KUNDU, J. K.; RYOO, Z. Y.; BODE, A. M.; SURH, Y.-J.; DONG, Z. [6]-Shogaol inhibits growth and induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells by directly regulating Akt1/2. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 3, p. 683-691, 2014.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A.; KEEHNEN, R. M.; PALS, S. T.; VAN OERS, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-1420, 1994/09// 1994.

LEE, L. J.; KWON, C. S.; FORSYTHE, A.; MAMOLO, C. M.; MASTERS, E. T.; JACOBS, I. A. Humanistic and Economic Burden of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: Results of Two Systematic Literature Reviews. **ClinicoEconomics and outcomes research : CEOR**, v. 12, p. 693-709, 2020.

LI, T.-Y.; CHIANG, B.-H. 6-shogaol induces autophagic cell death then triggered apoptosis in colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 208-217, 2017/09/01/ 2017.

LIN, X. P.; MINTERN, J. D.; GLEESON, P. A. Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. **Membranes**, v. 10, n. 8, p. 177, 2020.

LIU, C.-M.; KAO, C.-L.; TSENG, Y.-T.; LO, Y.-C.; CHEN, C.-Y. Ginger Phytochemicals Inhibit Cell Growth and Modulate Drug Resistance Factors in Docetaxel Resistant Prostate Cancer Cell. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 9, p. 1477, 2017.

LIU, K.; LIU, P.-C.; LIU, R.; WU, X. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. **Medical science monitor basic research**, v. 21, p. 15-20, 2015.

LIU, Q.; PENG, Y.-B.; QI, L.-W.; CHENG, X.-L.; XU, X.-J.; LIU, L.-L.; LIU, E. H.; LI, P. The Cytotoxicity Mechanism of 6-Shogaol-Treated HeLa Human Cervical Cancer Cells Revealed by Label-Free Shotgun Proteomics and Bioinformatics Analysis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 278652, 2012/11/11 2012.

LIU, Q.; PENG, Y.-B.; ZHOU, P.; QI, L.-W.; ZHANG, M.; GAO, N.; LIU, E. H.; LI, P. 6-Shogaol induces apoptosis in human leukemia cells through a process involving caspase-mediated cleavage of eIF2 $\alpha$ . **Molecular cancer**, v. 12, n. 1, p. 135-135, 2013.

LORTET-TIEULENT, J.; GEORGES, D.; BRAY, F. Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. v. 147, n. 11, p. 3029-3036, Dec 1 2020.

MALTESE, W. A.; OVERMEYER, J. H. Methuosis: Nonapoptotic Cell Death Associated with Vacuolization of Macropinosome and Endosome Compartments. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 6, p. 1630-1642, 2014/06/01/ 2014.

MAO, Q.-Q.; XU, X.-Y.; CAO, S.-Y.; GAN, R.-Y.; CORKE, H.; BETA, T.; LI, H.-B. Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 6, p. 185, 2019.

MARSHALL, G.; FERRECCIO, C.; YUAN, Y.; BATES, M. N.; STEINMAUS, C.; SELVIN, S.; LIAW, J.; SMITH, A. H. Fifty-Year Study of Lung and Bladder Cancer Mortality in Chile Related

to Arsenic in Drinking Water. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 12, p. 920-928, 2007.

MATULEWICZ, R. S.; STEINBERG, G. D. Non-muscle-invasive Bladder Cancer: Overview and Contemporary Treatment Landscape of Neoadjuvant Chemoablative Therapies. **Reviews in urology**, v. 22, n. 2, p. 43-51, 2020.

MOOREN, F. C.; KRÜGER, K. Chapter Seventeen - Exercise, Autophagy, and Apoptosis. In: BOUCHARD, C. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**: Academic Press, v.135, 2015. p.407-422. ISBN 1877-1173.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55, 1983a.

\_\_\_\_\_. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983b.

NEVOZHAY, D. Cheburator software for automatically calculating drug inhibitory concentrations from in vitro screening assays. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106186-e106186, 2014.

NEWMAN, D. J. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. v. 83, n. no. 3, p. pp. 770-803-2020 v.83 no.3, 2020-03-12 2020.

NOTMAN, R.; NORO, M.; O'MALLEY, B.; ANWAR, J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. **J Am Chem Soc**, v. 128, n. 43, p. 13982-3, Nov 1 2006.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; ALITALO, K.; ALLEN, E.; ANISIMOV, A.; APLIN, A. C.; AUERBACH, R.; AUGUSTIN, H. G.; BATES, D. O.; VAN BEIJNUM, J. R.; BENDER, R. H. F.; BERGERS, G.; BIKFALVI, A.; BISCHOFF, J.; BÖCK, B. C.; BROOKS, P. C.; BUSSOLINO, F.; CAKIR, B.; CARMELIET, P.; CASTRANOVA, D.; CIMPEAN, A. M.; CLEAVER, O.; COUKOS, G.; DAVIS, G. E.; DE PALMA, M.; DIMBERG, A.; DINGS, R. P. M.; DJONOV, V.; DUDLEY, A. C.; DUFTON, N. P.; FENDT, S.-M.; FERRARA, N.; FRUTTIGER, M.; FUKUMURA, D.; GHESQUIÈRE, B.; GONG, Y.; GRIFFIN, R. J.; HARRIS, A. L.; HUGHES, C. C. W.; HULTGREN, N. W.; IRUELA-ARISPE, M. L.; IRVING, M.; JAIN, R. K.; KALLURI, R.; KALUCKA, J.; KERBEL, R. S.; KITAJEWSKI, J.; KLAASSEN, I.; KLEINMANN, H. K.; KOOLWIJK, P.; KUCZYNSKI, E.; KWAK, B. R.; MARIEN, K.; MELERO-MARTIN, J. M.; MUNN, L. L.; NICOSIA, R. F.; NOEL, A.; NURRO, J.; OLSSON, A.-K.; PETROVA, T. V.; PIETRAS, K.; PILI, R.; POLLARD, J. W.; POST, M. J.; QUAX, P. H. A.; RABINOVICH, G. A.; RAICA, M.; RANDI, A. M.; RIBATTI, D.; RUEGG, C.; SCHLINGEMANN, R. O.; SCHULTE-MERKER, S.; SMITH, L. E. H.; SONG, J. W.; STACKER, S. A.; STALIN, J.; STRATMAN, A. N.; VAN DE VELDE, M.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; VERMEULEN, P. B.; WALTENBERGER, J.; WEINSTEIN, B. M.; XIN, H.; YETKIN-ARIK, B.; YLA-HERTTUALA, S.;

YODER, M. C.; GRIFFIOEN, A. W. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. **Angiogenesis**, v. 21, n. 3, p. 425-532, 2018.

O'DONNELL, M. A. Optimizing BCG therapy. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 27, n. 3, p. 325-328, 2009/05/01/ 2009.

ORABI, H.; BOUHOUT, S.; MORISSETTE, A.; ROUSSEAU, A.; CHABAUD, S.; BOLDUC, S. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: advances from bench to patients. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 154564-154564, 2013.

PADUCH, R. Theories of cancer origin. **Eur J Cancer Prev**, v. 24, n. 1, p. 57-67, Jan 2015.

PÉCHERY, A.; FAUCONNET, S.; BITTARD, H.; LASCOMBE, I. Apoptotic effect of the selective PPAR $\beta/\delta$  agonist GW501516 in invasive bladder cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14789-14802, 2016/11/01 2016.

PERILLO, B.; DI DONATO, M.; PEZONE, A.; DI ZAZZO, E.; GIOVANNELLI, P.; GALASSO, G.; CASTORIA, G.; MIGLIACCIO, A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192-203, 2020/02/01 2020.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 5, p. 653-666, 1956.

PUCK, T. T.; MORKOVIN, D.; MARCUS, P. I.; CIECIURA, S. J. Action of x-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissues. **The Journal of experimental medicine**, v. 106, n. 4, p. 485-500, 1957.

RAFEHI, H.; ORLOWSKI, C.; GEORGIADIS, G. T.; VERVERIS, K.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. Clonogenic assay: adherent cells. **J Vis Exp**, n. 49, Mar 13 2011.

RAY, A.; VASUDEVAN, S.; SENGUPTA, S. 6-Shogaol Inhibits Breast Cancer Cells and Stem Cell-Like Spheroids by Modulation of Notch Signaling Pathway and Induction of Autophagic Cell Death. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137614, 2015.

REED, O.; JUBBER, I.; GRIFFIN, J.; NOON, A. P. Occupational bladder cancer: A cross section survey of previous employments, tasks and exposures matched to cancer phenotypes. v. 15, n. 10, p. e0239338, 2020.

ROYALL, J. A.; ISCHIROPOULOS, H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 302, n. 2, p. 348-55, May 1993.

RYBCZYNSKA, A. A.; BOERSMA, H. H.; DE JONG, S.; GIETEMA, J. A.; NOORDZIJ, W.; DIERCKX, R. A. J. O.; ELSINGA, P. H.; VAN WAARDE, A. Avenues to molecular imaging of dying cells: Focus on cancer. **Medicinal research reviews**, v. 38, n. 6, p. 1713-1768, 2018.

SAGINALA, K.; BARSOUK, A.; ALURU, J. S.; RAWLA, P.; PADALA, S. A.; BARSOUK, A. Epidemiology of Bladder Cancer. **Medical sciences (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 1, p. 15, 2020.

SAHA, A.; BLANDO, J.; SILVER, E.; BELTRAN, L.; SESSLER, J.; DIGIOVANNI, J. 6-Shogaol from Dried Ginger Inhibits Growth of Prostate Cancer Cells Both *In Vitro* and *In Vivo* through Inhibition of STAT3 and NF- $\kappa$ B Signaling. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 6, p. 627-638, 2014.

SANLI, O.; DOBRUCH, J.; KNOWLES, M. A.; BURGER, M.; ALEMOZAFFAR, M.; NIELSEN, M. E.; LOTAN, Y. Bladder cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17022, 2017/04/13 2017.

SCOSYREV, E.; NOYES, K.; FENG, C.; MESSING, E. Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. **Cancer**, v. 115, n. 1, p. 68-74, 2009.

SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death Differ**, v. 8, n. 6, p. 551-63, Jun 2001.

STEINMAUS, C. M.; FERRECCIO, C.; ROMO, J. A.; YUAN, Y.; CORTES, S.; MARSHALL, G.; MOORE, L. E.; BALMES, J. R.; LIAW, J.; GOLDEN, T.; SMITH, A. H. Drinking Water Arsenic in Northern Chile: High Cancer Risks 40 Years after Exposure Cessation. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22, n. 4, p. 623-630, 2013.

SWIFT, L. M.; SARVAZIAN, N. Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 278, n. 3, p. H982-H990, 2000.

TAO, T.; HE, C.; DENG, J.; HUANG, Y.; SU, Q.; PENG, M.; YI, M.; DARKO, K. O.; ZOU, H.; YANG, X. A novel synthetic derivative of quercetin, 8-trifluoromethyl-3,5,7,3',4'-O-pentamethyl-quercetin, inhibits bladder cancer growth by targeting the AMPK/mTOR signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 71657-71671, 2017.

TEOH, J. Y.; HUANG, J.; KO, W. Y.; LOK, V.; CHOI, P.; NG, C. F.; SENGUPTA, S.; MOSTAFID, H.; KAMAT, A. M.; BLACK, P. C.; SHARIAT, S.; BABJUK, M.; WONG, M. C. Global Trends of Bladder Cancer Incidence and Mortality, and Their Associations with Tobacco Use and Gross Domestic Product Per Capita. **Eur Urol**, v. 78, n. 6, p. 893-906, Dec 2020.

TIMOTEO, F.; KORKES, F.; BACCAGLINI, W.; GLINA, S. Bladder cancer trends and mortality in the brazilian public health system. **Int Braz J Urol**, v. 46, n. 2, p. 224-233, Mar-Apr 2020.

TRAN, L.; XIAO, J.-F.; AGARWAL, N.; DUEX, J. E.; THEODORESCU, D. Advances in bladder cancer biology and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 2, p. 104-121, 2021/02/01 2021.

VAN ENGELAND, M.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. **Cytometry**, v. 24, n. 2, p. 131-9, Jun 1 1996.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, p. 47-47, 2015.

VANDER HEIDEN, M. G.; DEBERARDINIS, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 657-669, 2017.

VILLALVILLA, A.; DA SILVA, J. A.; LARGO, R.; GUALILLO, O.; VIEIRA, P. C.; HERRERO-BEAUMONT, G.; GOMEZ, R. 6-Shogaol inhibits chondrocytes' innate immune responses and cathepsin-K activity. **Mol Nutr Food Res**, v. 58, n. 2, p. 256-66, Feb 2014.

WANG, G.; MCKENNEY, J. K. Urinary Bladder Pathology: World Health Organization Classification and American Joint Committee on Cancer Staging Update. **Arch Pathol Lab Med**, v. 143, n. 5, p. 571-577, May 2019.

WEERASINGHE, P.; BUJA, L. M. Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 93, n. 3, p. 302-308, 2012/12/01/ 2012.

WHITE-GILBERTSON, S.; DAVIS, M.; VOELKEL-JOHNSON, C.; KASMAN, L. M. Sex differences in the MB49 syngeneic, murine model of bladder cancer. **Bladder (San Francisco, Calif.)**, v. 3, n. 1, p. e22, 2016.

WITJES, J. A.; BRUINS, H. M.; CATHOMAS, R.; COMPÉRAT, E. M.; COWAN, N. C.; GAKIS, G.; HERNÁNDEZ, V.; LINARES ESPINÓS, E.; LORCH, A.; NEUZILLET, Y.; ROUANNE, M.; THALMANN, G. N.; VESKIMÄE, E.; RIBAL, M. J.; VAN DER HEIJDEN, A. G. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. **European Urology**, v. 79, n. 1, p. 82-104, 2021/01/01/ 2021.

WONG, M. C. S.; FUNG, F. D. H.; LEUNG, C.; CHEUNG, W. W. L.; GOGGINS, W. B.; NG, C. F. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1129-1129, 2018.

WU, Q.; WONG, J. P. C.; KWOK, H. F. Putting the Brakes on Tumorigenesis with Natural Products of Plant Origin: Insights into the Molecular Mechanisms of Actions and Immune Targets for Bladder Cancer Treatment. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1213, 2020.

WU, X.-R. Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. **Cancer metastasis reviews**, v. 28, n. 3-4, p. 281-290, 2009.

WYŻEWSKI, Z.; GREGORCZYK-ZBOROCH, K. P.; MIELCARSKA, M. B.; BOSSOWSKA-NOWICKA, M.; STRUZIŁ, J.; SZCZEPANOWSKA, J.; TOKA, F. N.; NIEMIAŁTOWSKI, M. G.; SZULC-DĄBROWSKA, L. Mitochondrial Heat Shock Response Induced by Ectromelia Virus is Accompanied by Reduced Apoptotic Potential in Murine L929 Fibroblasts. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 67, n. 6, p. 401-414, 2019.

YADAV, A. K.; JANG, B.-C. Anti-Survival and Pro-Apoptotic Effects of 6-Shogaol on SW872 Human Liposarcoma Cells via Control of the Intrinsic Caspase Pathway, STAT-3, AMPK, and ER Stress. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1380, 2020.

YARROW, J. C.; PERLMAN, Z. E.; WESTWOOD, N. J.; MITCHISON, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC biotechnology**, v. 4, p. 21-21, 2004.

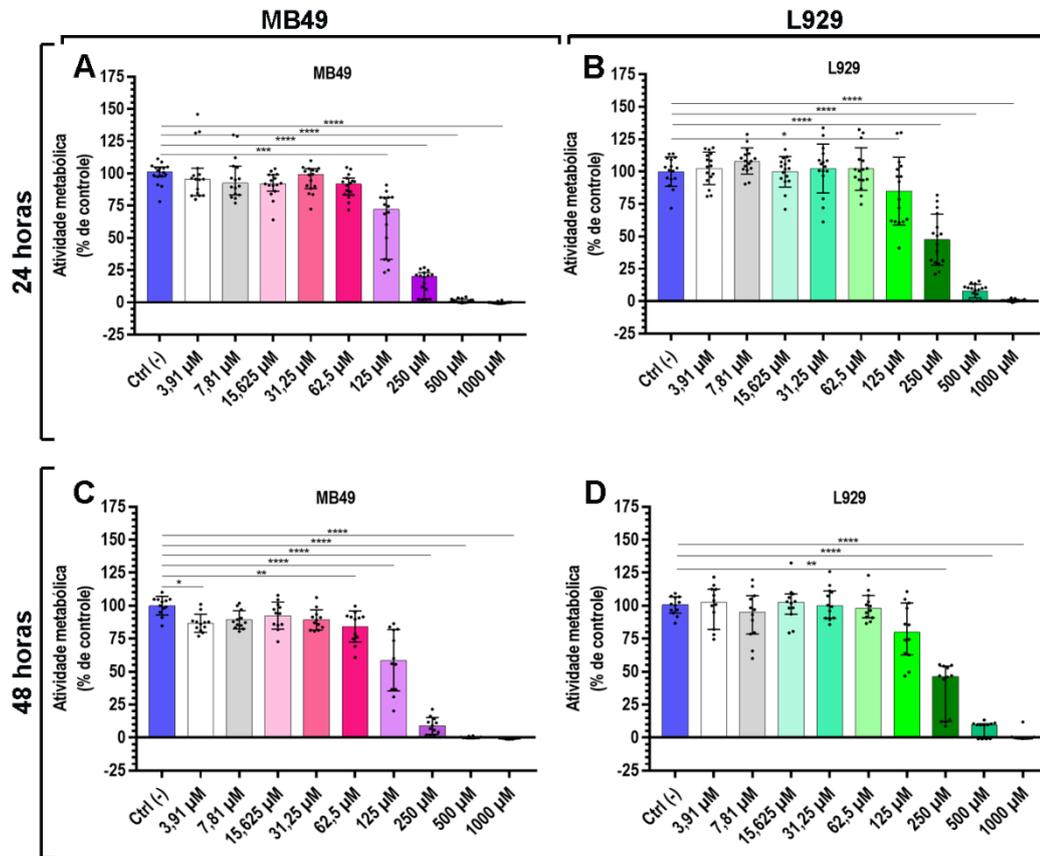
YU, E. Y.-W.; NEKEMAN, D.; BILLINGHAM, L. J.; JAMES, N. D.; CHENG, K. K.; BRYAN, R. T.; WESSELIUS, A.; ZEEGERS, M. P. Health-related quality of life around the time of diagnosis in patients with bladder cancer. **BJU international**, v. 124, n. 6, p. 984-991, 2019.

YUE, P. Y.; LEUNG, E. P.; MAK, N. K.; WONG, R. N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v. 15, n. 4, p. 427-33, Apr 2010.

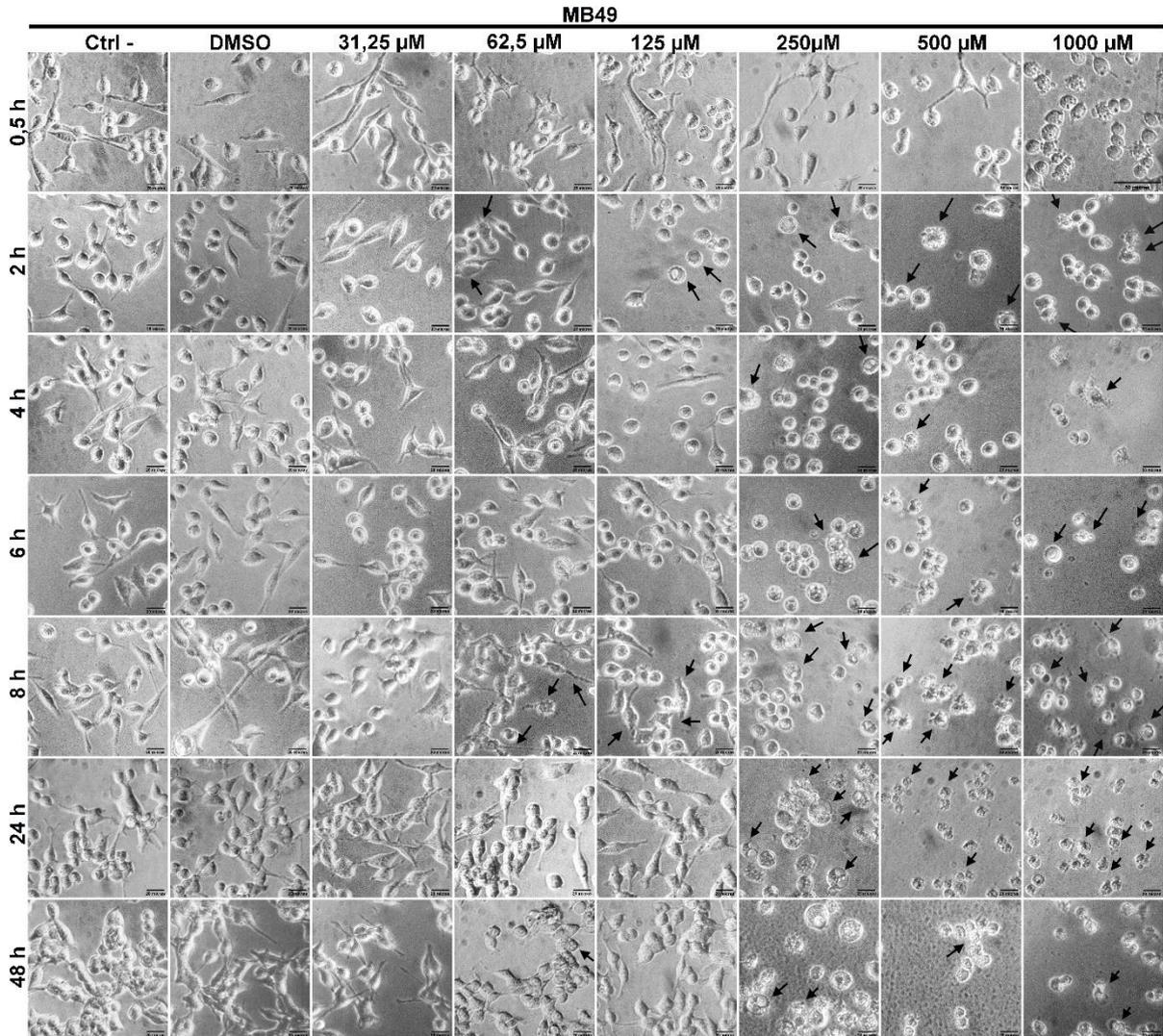
ZHENG, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; XU, D.-P.; LI, S.; LI, H.-B. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 495, 2016.

ZHOU, L.; QI, L.; JIANG, L.; ZHOU, P.; MA, J.; XU, X.; LI, P. Antitumor activity of gemcitabine can be potentiated in pancreatic cancer through modulation of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling by 6-shogaol. **The AAPS journal**, v. 16, n. 2, p. 246-257, 2014.

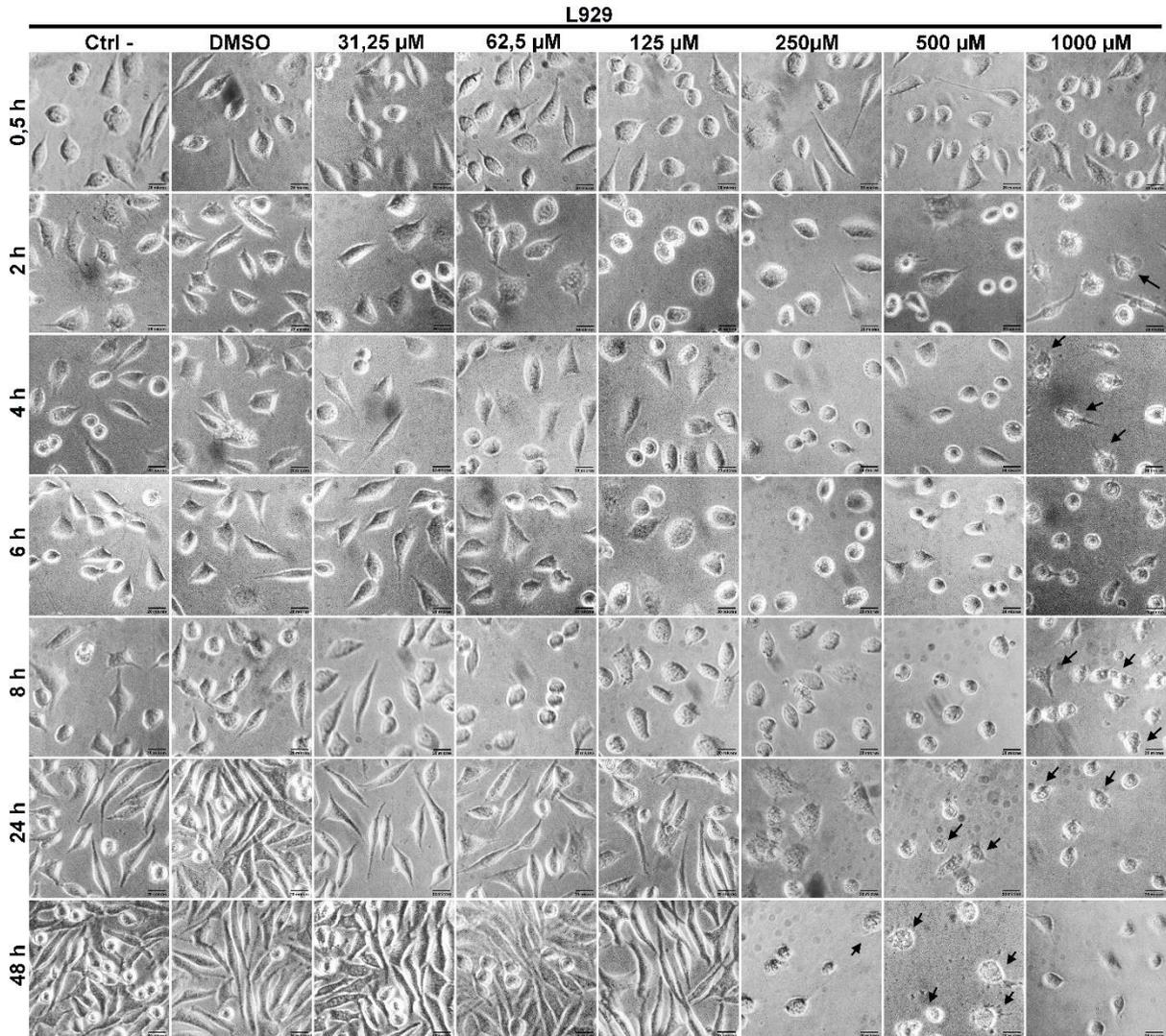
## 9. ANEXOS



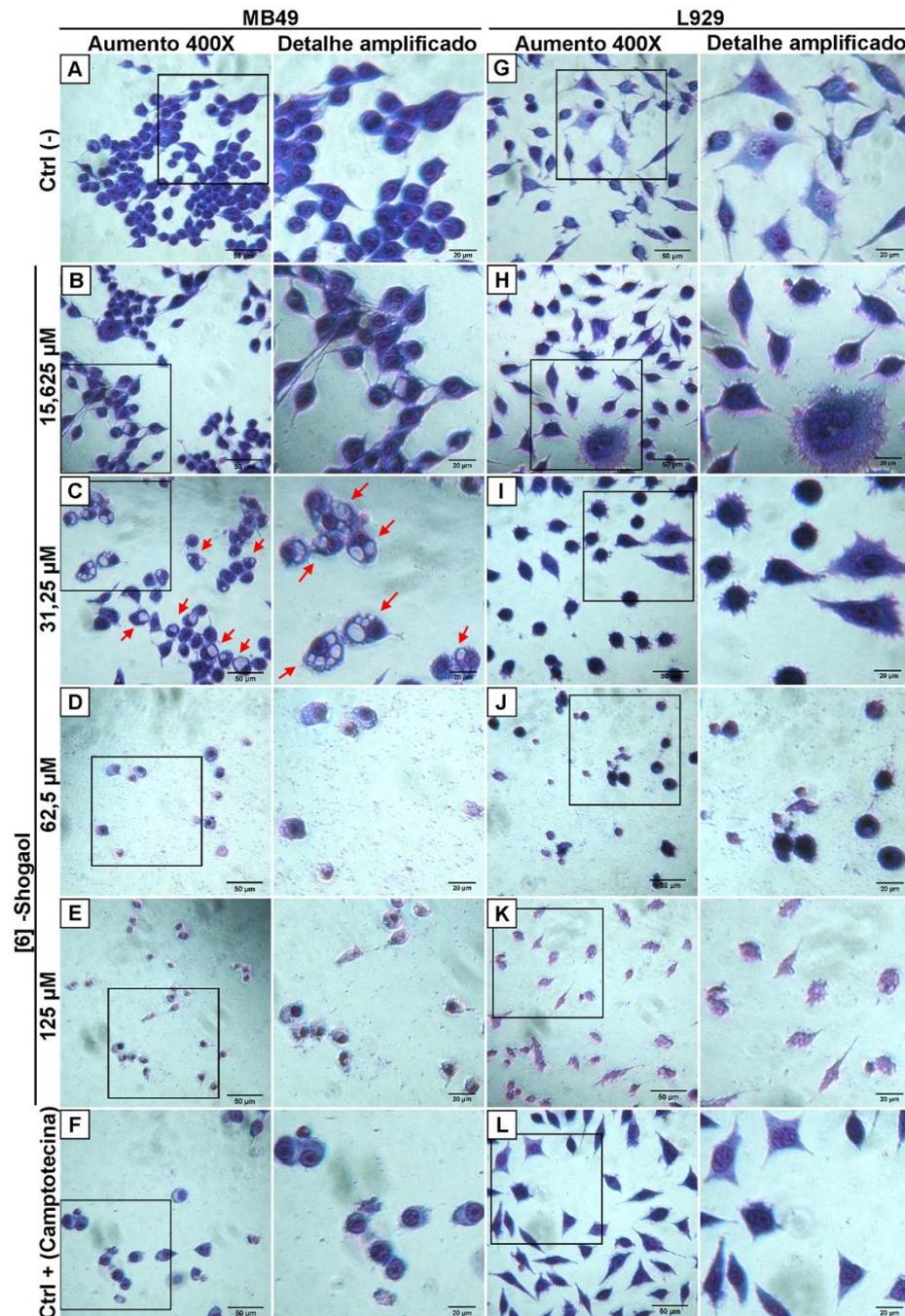
**Figura 19.** Efeito do [6]-Shogaol sobre a viabilidade das células MB49 e L929. (A, B) Células MB49 e L929 expostas a diferentes concentrações de [6]-Shogaol durante 24 horas. (C, D) Células MB49 e L929 expostas a diferentes concentrações de [6]-Shogaol durante 48 horas. Os dados dos gráficos B e C foram considerados como paramétricos e foram apresentados como a média  $\pm$  DP, no entanto, os dados dos gráficos A e D como não paramétricos e foram apresentados como a mediana e IC95%, correspondentes a três experimentos independentes ( $n=4$ ). A análise estatística para os dados paramétricos foi realizada pelo teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, no caso dos dados não paramétricos se utilizo o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's, sendo  $* p \leq 0,05$ ;  $** p < 0,01$ ;  $* * * p < 0,001$ ;  $* * * * p < 0,0001$ . **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).



**Figura 20.** Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células MB49. Células MB49 foram tratadas com as concentrações indicadas de [6]-Shogaol e as alterações morfológicas e o desprendimento celular foram visualizadas desde as primeiras horas após a exposição ao tratamento. As imagens capturadas (aumento 400x) correspondem a uma replicata representativa de três experimentos independentes ( $n = 4$ ). As setas indicam as alterações morfológicas e de aderência promovidas pelo composto [6]-Shogaol *in vitro*. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ . **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).



**Figura 21.** Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e aderência das células L929. Células L929 foram tratadas com as concentrações indicadas de [6]-Shogaol e as alterações morfológicas e o desprendimento celular foram visualizados desde as primeiras horas após a exposição ao tratamento. As imagens capturadas (aumento 400x) correspondem a uma replicata representativa de três experimentos independentes ( $n = 4$ ). As setas indicam as alterações morfológicas e de aderência promovidas pelo composto [6]-Shogaol *in vitro*. Barra de escala = 20  $\mu$ m. **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).



**Figura 22.** Efeito das diferentes concentrações de [6]-Shogaol na morfologia e viabilidade das células MB49 e L929 pelo ensaio de coloração com panóptico rápido. Células MB49 e L929 tratadas por 12 horas com [6]-Shogaol em diferentes concentrações, posteriormente foram coradas com panóptico rápido e as imagens correspondem a uma replicata representativa de um experimento independente ( $n=4$ ). Capturadas com o auxílio de uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio invertido (400x). (A) grupo controle de células MB49 viáveis; (B) células MB49 tratadas com 15,625  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (C) células MB49 tratadas com 31,25  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol, as setas indicam estruturas celulares de diferentes dimensões que poderiam associar-se com eventos de vacuolização citoplasmática induzidas pelo estresse gerado por [6]-Shogaol; (D) células MB49 tratadas com 62,5  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (E) células MB49 tratadas com 125  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (F) células MB49 tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de camptotecina; (G) grupo controle de células L929 viáveis; (H) células L929 tratadas com 15,625  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (I) células L929 tratadas com 31,25  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (J) células MB49 tratadas com 62,5  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (K) células MB49 tratadas com 125  $\mu\text{M}$  de [6]-Shogaol; (L) células MB49 tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de camptotecina. Barra de escala: 50 e 20  $\mu\text{m}$ . **Fonte:** Arquivo pessoal (2021).