



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DA SAÚDE
MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

Vanessa Alexandra Pereira Mendes, nº21906295

2024

www.ulusofona.pt

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DA SAÚDE
MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

Versão final

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 16/ 09/2024, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 897/2024, de 3 de julho, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Vogais: Prof^a. Doutora Ana Sofia Fernandes (Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa) - Arguente

Orientador: Prof. Doutor Nuno Saraiva

Vanessa Alexandra Pereira Mendes, nº21906295

2024

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

Põe quanto És no Mínimo que Fazes.

Ricardo Reis

Agradecimentos

A vida para a qual estamos destinados está cheia de etapas. Esta foi a etapa mais difícil da minha vida, mas até agora a mais bonita e desafiante.

Agradeço a todos os meus colegas, em especial ao Pedro Fernandes e ao Pedro Magalhães, à Marta Marques, à Mariana Borges e à Inês Patriarca.

À minha Lotti que tantas vezes sem sequer saber não me deixou desistir. Tantos áudios longos sobre matéria ou sobre a vida. Estar longe de casa não é fácil, mas ainda mais difícil, é para quem precisa dos seus para respirar. Por isso, todos os dias ir para a faculdade e saber que os tinha lá foi muito importante. Obrigada!

Irei sempre agradecer aos meus pais, por todos os esforços que durante toda a sua vida fizeram. Mas mais ainda, por todos estes anos, em que me apoiaram sempre. Obrigada, mãe, por seres a luz e a força quando me faltam.

Obrigada, João, por teres chegado!

Agradeço também ao Professor Doutor e Orientador Nuno Saraiva por todo o seu apoio ao longo deste percurso.

Sem saber como nem porquê, acabou esta etapa tão bonita.

Muito obrigada

Resumo

À escala mundial, o cancro é a segunda maior causa de morte, possuindo uma média anual de 7 milhões de mortes. Até 2030, estima-se que o número de mortes duplique, pelo que há a necessidade de inovar no desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas e quimioterapêuticas. Uma dessas estratégias pode passar pela adaptação dos hábitos alimentares, e consequentemente, escolha de inclusão de determinados alimentos na dieta.

Está cada vez mais claro que muitos agentes dietéticos, como os isotiocianatos, de vegetais crucíferos, podem retardar ou prevenir o processo de carcinogénese. A erucina é um isotiocianato dietético, que foi recentemente considerado um promissor fitoquímico quimiopreventivo do cancro. Vários estudos realizados em contexto *in vitro* suportam a capacidade de alguns compostos alimentares afetarem processos celulares envolvidos na oncogénese, e na promoção e progressão tumoral.

O carcinoma renal representa mais de 80% dos casos de cancro renal, com aproximadamente 30% dos pacientes a desenvolver metástases após cirurgia. Assim sendo, devido à relevância desta temática, este estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto do isotiocianato erucina, no citoesqueleto, em particular nos microtúbulos e nos microfilamentos de actina, de células de cancro renal, uma vez que esta estrutura celular está intimamente relacionada com o processo de invasão celular que é essencial para a formação de metástases.

Foram utilizados dois tipos de células, as VERO-E6 e as 786-O. As células VERO pertencem a uma linhagem de células de rim de macaco verde e as células 786-O são células de carcinoma renal humano. A análise de imagens de imunofluorescência células tratadas com erucina e sujeitas a imunofluorescência, permitiu concluir que a esta é capaz de induzir uma perda das estruturas de tubulina (microtúbulos e centro organizador dos microtúbulos) mas que não afeta as estruturas compostas por actina. A realização do ensaio *in vitro* de polimerização de tubulina permitiu observar que com o aumento da concentração de erucina existiu diminuição da polimerização de tubulina. Assim é possível concluir que a erucina atua diretamente para inibir a polimerização da actina. Por este motivo esta molécula apresenta um potencial terapêutico que deverá ser mais explorado.

Palavras-chaves: Erucina, Células renais, Cancro renal, Nefrotoxicidade

Abstract

On a global scale, cancer is the second leading cause of death, with an average of 7 million deaths annually. By 2030, it is estimated that the number of deaths will double, highlighting the need to innovate in the development of chemopreventive and chemotherapeutic strategies. One of these strategies may involve adapting dietary habits, and consequently, choosing to include certain foods in the diet.

It is increasingly clear that many dietary agents, such as isothiocyanates from cruciferous vegetables, can slow down or prevent the process of carcinogenesis. Erucin is a dietary isothiocyanate that has recently been considered a promising phytochemical for cancer chemoprevention. Several studies conducted in vitro support the ability of certain dietary compounds to affect cellular processes involved in oncogenesis, and in tumor promotion and progression.

Renal carcinoma accounts for over 80% of kidney cancer cases, with approximately 30% of patients developing metastases after surgery. Therefore, due to the relevance of this topic, the main objective of this study was to evaluate the impact of the isothiocyanate erucin on the cytoskeleton, particularly on microtubules and actin microfilaments in renal cancer cells, as this cellular structure is closely related to the cell invasion process that is essential for metastasis formation.

Two types of cells were used, VERO-E6 and 786-O. VERO cells belong to a lineage of green monkey kidney cells, and 786-O cells are human renal carcinoma cells. Immunofluorescence image analysis of cells treated with erucin revealed that it can induce a loss of tubulin structures (microtubules and microtubule organizing center) but does not affect actin-based structures. The in vitro tubulin polymerization assay showed that with increasing concentrations of erucin, there was a decrease in tubulin polymerization. Therefore, it can be concluded that erucin directly acts to inhibit actin polymerization. For this reason, this molecule presents a therapeutic potential that should be further explored.

Keywords: Erucin, Renas cells, Kidney cancer, Nephrotoxicity

Abreviaturas

AIC	Isotiocianato de atilo
BITC	Isotiocianato de Benilo
CCR	Carcinoma de células renais
COX-2	Cicloxygenase 2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	Food and Drug Administration
FIJI	Fiji is just image J
FL118	0,11-metilenodioxi-20(S)-camptotecina
FN1	Fibronectina 1
FN2	Fibronectina 2
GTB	General tubulina buffer
GTP	Trisfosfato de Guanosina
GLS	Glucosinolatos
HTS	High-throughput screening
IARC	Agency for Research on Cancer
IC50	Concentração Inibitória Semi-máxima
IL-6	Interleucina-6

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

ITCs	Isotiocianatos
I3C	Indol-3-carbinol
INOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
Kg	Quilograma
μM	Micromolar
MMP2	Metaloproteinase da matriz 2
MMP9	Metaloproteinase da matriz 9
MRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos
MTOC	Centro organizador dos microtúbulos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAK1	Protein-activated kinase 1
PBS	Phosphate Buffer Saline
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD-L2	Programmed death-ligand 1
PEITC	Isotiocianato de feniletilo
RSV	Resveratrol
SFN	Sulforafano
TKI	Inibidores de tirosina quinase
TNBC	Cancro de Mama Triplo Negativo
TNF-a	Interferão alfa
VC	Vegetais crucíferos

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VERO-E6	Células derivadas de rim de macaco
786-O	Células derivadas de adenocarcinoma renal
°C	Graus Celsius

Índice Geral

Agradecimentos	1
Resumo	2
Abstract	3
Abreviaturas	4
Índice de Figuras	1
Capítulo I – Introdução	2
1. Cancro	3
2. Cancro renal	5
a) Epidemiologia	6
b) Terapêutica	9
3. Citoesqueleto	11
a) Importância das alterações que ocorrem no citoesqueleto na progressão cancro	12
4. Papel de bioativos alimentares na progressão do cancro	13
a) Tipos de bioativos no cancro	14
b) Isotiocianato erucina e sua atividade na terapêutica do cancro	17
5. Objetivos	19
Capítulo II – Materiais e Métodos	20
a) Cultura de células VERO e 786-O	20
b) Imunofluorescência	20
c) Análise de imagens de imunofluorescência	20
d) Polimerização	21
Capítulo III – Resultados e Discussão	23
a) A Erucina altera a morfologia e organização dos microtúbulos em células renais	23
b) A Erucina inibe diretamente a polimerização da actina	30
Capítulo IV - Conclusão e Considerações Finais	34
Bibliografia	36

Índice de Figuras

Figura 1: Incidência de cancro renal nos diferentes continentes, em ambos os sexos, em 2022.....	6
Figura 2: Taxa padronizada por idade (mundo) por 100.000 habitantes, incidência de cancro renal, ambos os sexos, em 2022.....	7
Figura 3: Taxa padronizada por idade (mundo) por 100.000 habitantes, taxa de mortalidade de cancro renal, ambos os sexos, em 2022.....	7
Figura 4: Representação da incidência de cancro renal, em homens e mulheres, em 2022	8
Figura 5: Imagens de células VERO e 786-O - tratadas a concentrações de 0 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 80 μ M, a tempos diferentes de 4 h, 8 h e 24 h, obtidas por imunofluorescência.....	24
Figura 6: Seleção de gráficos resultantes da análise das imagens obtidas por imunofluorescência.....	28
Figura 7: Resultados da reação de polimerização de tubulina a concentrações de 0 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 80 μ M de erucina.....	31

Capítulo I – Introdução

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, representando um desafio significativo para a saúde pública. Compreender os processos de mortalidade associados ao cancro é fundamental para melhorar a prevenção, o diagnóstico e o tratamento desta doença (Hall, 2009).

O carcinoma de células renais (CCR) é o tipo de cancro mais comum de cancro renal. Sendo que o carcinoma de células claras representa mais de 80% dos casos de cancro renal, com cerca de 30% dos pacientes desenvolvendo metástase após a cirurgia (Muglia & Prando, 2015). Embora a obesidade, a hipertensão, o tabagismo, entre outros, sejam fatores de risco para o CCR, a sua origem ainda não é clara (Linehan et al., 2019).

Atualmente, a maioria dos CCRs é descoberta incidentalmente em exames de imagem realizados por razões urológicas ou não. Há um nítido predomínio do género masculino e pacientes idosos, que representam cerca de dois terços dos casos (Muglia & Prando, 2015).

Numa meta-análise, 13 estudos prospetivos descobriram que o consumo de vegetais e frutas está relacionado a um menor risco de CCR, e ainda que os carotenoides encontrados em frutas e vegetais podem contribuir parcialmente para esse resultado (Soundararajan & Kim, 2018).

São classificados como vegetais crucíferos (VC) os vegetais com flores em forma de cruz, como por exemplo o repolho, o brócolo, a couve-flor, entre outros. Os VC são ricos em substâncias contendo enxofre chamadas glucosinolatos (GLS), precursores de produtos, como isotiocianatos (ITCs), e indol-3-carbinol (I3C), que cientificamente mostraram que podem ajudar a minimizar o risco de CCR (Azarenko et al., 2014a).

A erucina é um isotiocianato encontrado em VC, semelhante ao sulforafano, que é mais conhecido. Esses produtos têm interesse devido aos seus potenciais benefícios à saúde, incluindo propriedades anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Azarenko et al., 2014).

O citoesqueleto das células renais é uma rede complexa de filamentos proteicos que existe dentro das células, que oferece suporte estrutural, auxilia na divisão celular, no transporte celular e no transporte intracelular. É composto principalmente por três tipos de filamentos proteicos, nomeadamente os microfilamentos (actina), os microtúbulos (tubulina) e os filamentos intermediários (Pollard & Goldman, 2018).

O impacto da erucina no citoesqueleto das células renais pode fazer parte do seu mecanismo de ação antitumoral (Hall, 2009). Estudos sobre compostos semelhantes, como o sulforafano, mostraram que estes podem afetar o citoesqueleto das células cancerígenas, o que inclui a despolimerização de microtúbulos, o que pode levar à paragem do ciclo celular e à apoptose (morte celular programada) Azarenko et al., 2014).

Portanto, dada a importância desta temática, é necessário compreender os mecanismos pelos quais a dieta pode prevenir ou retardar o processo de carcinogénese. Assim sendo, este estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto do isotiocianato erucina no citoesqueleto de células de cancro renal, em particular nos microtúbulos e nos microfilamentos de actina. Parte dos resultados apresentados nesta dissertação, incluindo as figuras, foram obtidos no artigo da Guerreiro et al. (2023).

1. Cancro

O cancro, também conhecido como neoplasia, é uma doença complexa e multifacetada que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Caracterizado pelo crescimento descontrolado e anormal de células no organismo, pode desenvolver-se em praticamente qualquer parte do corpo, podendo resultar em tumores malignos, que têm o potencial de se espalhar para tecidos adjacentes ou para outras regiões do organismo, formando metástases (Simões, 2014).

Este fenómeno ocorre devido a alterações genéticas que levam as células a ignorar os mecanismos de controlo normais do crescimento, divisão e morte. Fatores como exposição a agentes carcinogénicos, predisposição genética, inflamação crónica, estilo de vida e idade avançada, podem aumentar o risco de desenvolver cancro (Simões, 2014).

Os avanços na investigação em oncologia têm revolucionado a abordagem ao tratamento do cancro, com diagnósticos e terapias cada vez mais personalizadas e direcionadas para as características genéticas e biológicas, específicas de cada tumor. Os tratamentos incluem uma variedade de opções como cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapia dirigida, que visam eliminar as células tumorais e impedir a sua propagação (Simões, 2014).

As células desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do cancro, sendo de extrema importância compreender o seu papel neste contexto. No cancro, as células sofrem mutações genéticas que as tornam anormais e desreguladas, levando-as a proliferar de forma descontrolada e a escapar dos mecanismos de controlo do organismo. Esta

capacidade de crescimento ilimitado e invasão de tecidos circundantes é uma característica distintiva das células tumorais (Ohshima & Morii, 2021).

As células cancerígenas precisam adquirir um estado metabólico diferente daquele das células não tumorais para que possam invadir, proliferar e metastizar. Durante a progressão do cancro, os mesmos enfrentam diversos tipos de stress metabólico, nomeadamente, os microambientes tumorais que normalmente são ácidos e possuem baixa concentração de oxigénio. Além de terem uma composição nutricional distinta comparando com os tecidos não tumorais, o que força as células cancerígenas a se adaptarem para crescer e invadir esses ambientes (Schild et al., 2018). Em segundo lugar, para entrar e sobreviver nos vasos, as células cancerígenas devem reprogramar o seu estado metabólico, permitindo o crescimento independente da ancoragem, que induz um extenso stress oxidativo nas células cancerígenas. Por fim, uma vez que as células cancerígenas colonizam outros órgãos, elas devem adaptar-se a ambientes metabólicos bastante distintos daqueles presentes nos locais primários (Schild et al., 2018).

As células cancerígenas têm a capacidade de estimular a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos existentes, num processo conhecido como angiogénese, onde se dá o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, que fornecem aos tumores os nutrientes e oxigénio necessários para o seu crescimento e metastização, o que contribui para a progressão da doença (Carmeliet & Jain, 2000).

A progressão tumoral é um dos principais processos que contribui para a mortalidade associada ao cancro. À medida que as células cancerígenas se multiplicam e se espalham no organismo, podem invadir órgãos vitais, comprometendo as suas funções e levando à falência de sistemas de órgãos (Ohshima & Morii, 2021). As metástases têm peso relevante na mortalidade por cancro, visto que, quando as células cancerígenas se deslocam para outras partes do corpo através do sistema linfático e circulatório, formam novos tumores que podem comprometer a função de órgãos distantes, tornando o tratamento mais desafiador e reduzindo as chances de sobrevivência (Klein, 2020).

À medida que o cancro avança, a capacidade dos órgãos afetados de desempenhar suas funções de forma adequada pode ser comprometida, levando à falência dos mesmos. A falência de órgãos é uma causa comum de morte em pacientes com cancro avançado. Ainda, os tratamentos para o cancro, como quimioterapia, radioterapia e cirurgia, podem causar efeitos colaterais graves que, em alguns casos, podem contribuir para a mortalidade do paciente. Complicações como infeções, toxicidade dos medicamentos e danos aos órgãos são exemplos

de consequências adversas do tratamento (Ohshima & Morii, 2021). Além disso, o cancro pode comprometer o sistema imunológico do paciente, tornando-o mais suscetível a infeções e complicações graves. A imunossupressão associada ao cancro pode agravar o prognóstico e aumentar o risco de mortalidade. A perda de peso, fraqueza e atrofia muscular, que são comuns em pacientes com cancro avançado, também estão associados ao aumento da mortalidade (Ohshima & Morii, 2021).

O tipo de cancro e seu estágio no momento do diagnóstico desempenham um papel fundamental na determinação do prognóstico do paciente. Além disso, a idade do paciente, a presença de comorbilidades e a resposta ao tratamento, também afetam as taxas de sobrevivência (Simões, 2014).

A prevenção e o diagnóstico precoces são elementos-chave na redução da mortalidade associada ao cancro. Programas de rastreio eficazes, educação da população sobre fatores de risco e adoção de estilos de vida saudáveis, são essenciais para identificar a doença numa fase inicial, assim como as opções de tratamento mais eficazes (Simões, 2014).

A medicina personalizada tem revolucionado o tratamento do cancro, permitindo a adaptação das terapias com base nas características genéticas e moleculares de cada paciente. Esta abordagem individualizada tem o potencial de melhorar significativamente os resultados clínicos e reduzir a mortalidade associada ao cancro (Kaur et al., 2023).

2. Cancro renal

Apesar de existirem vários tipos de cancro renal, o CCR é o mais comum, sendo dividido em subtipos, como o carcinoma de células claras, carcinoma papilar ou cromófilos e carcinoma cromóforo. Cada subtipo apresenta características específicas a nível celular e pode influenciar o prognóstico e o tratamento do doente (Karumanchi et al., 2002). O carcinoma de células renais (CCR) desenvolve-se nos rins, órgãos responsáveis pela filtração do sangue e pela regulação do equilíbrio de fluidos no organismo (Karumanchi et al., 2002).

O CCR surge quando as células renais sofrem alterações genéticas, tornando-se anormais e descontroladas, originam uma massa tumoral no rebordo do rim. Estas mutações podem ocorrer devido a diversos fatores, como exposição a substâncias carcinogénicas, predisposição genética, tabagismo e obesidade (Corgna et al., 2007). À medida que o CCR progride, as células tumorais podem invadir os tecidos circundantes, como a gordura perirrenal e os vasos sanguíneos. Este processo, conhecido como invasão local, facilita a propagação de

células cancerígenas para outras partes do corpo, através do sistema linfático ou sanguíneo. A formação de metástases em órgãos distantes, como os pulmões, ossos ou cérebro, representa um estágio avançado da doença o que dificulta o tratamento e prognóstico do doente (Capitanio & Montorsi, 2016).

a) Epidemiologia

Na Europa, o CCR representa uma proporção significativa dos casos de cancro comunicados anualmente, ocupando a Europa o segundo lugar a nível mundial (**Figura 1**) (IARC & OMS, 2024). Estudos epidemiológicos demonstraram um aumento na incidência de cancro renal ao longo das últimas décadas, principalmente em países industrializados, que se pode dever também ao aumento no diagnóstico de massas renais durante exames de imagem abdominais (Siegel et al., 2019).

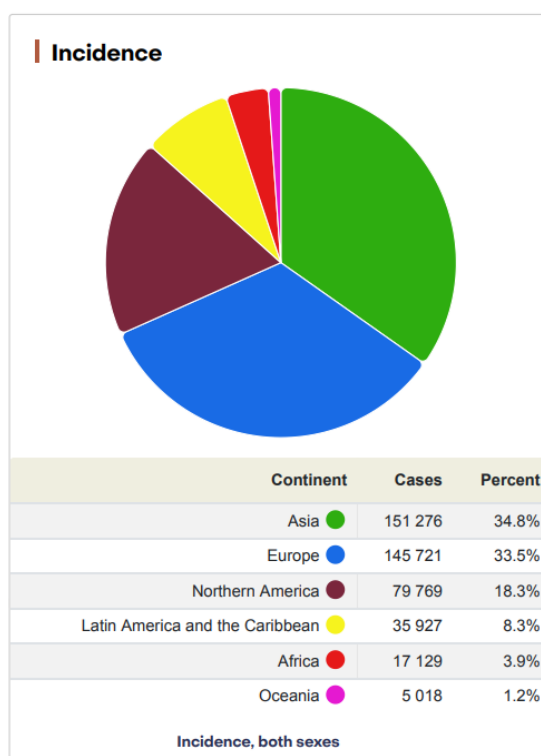


Figura 1: Incidência de cancro renal nos diferentes continentes, em ambos os sexos, em 2022
(Retirado de IARC & OMS, 2024)

O CCR é classificado como o 14º cancro mais frequente (**Figura 2**) e o 16º com maior taxa de mortalidade (**Figura 3**), no mundo. Ainda é possível observar na **Figura 4**, que o CCR é mais frequentemente diagnosticado em homens do que em mulheres (IARC & OMS, 2024).

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIS

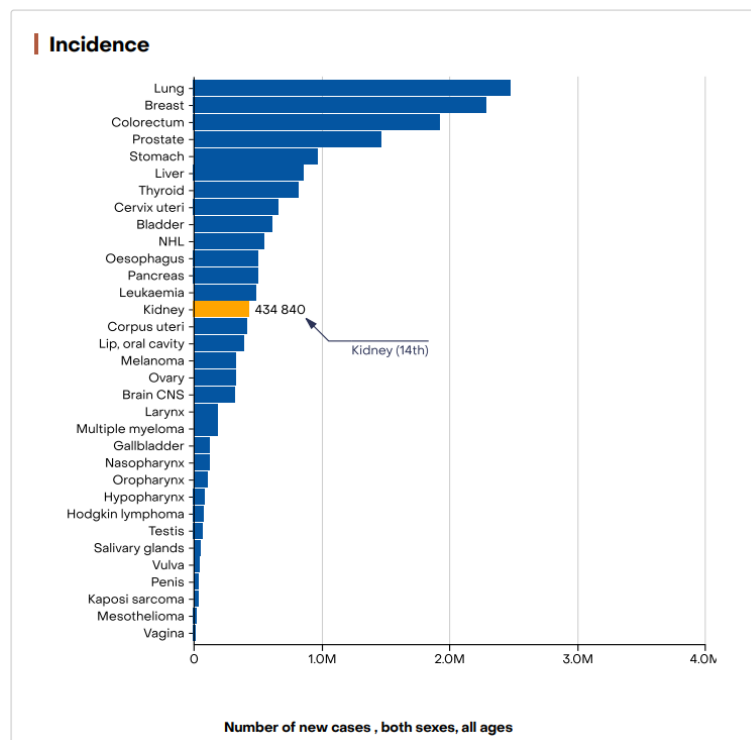


Figura 2: Taxa padronizada por idade (mundo) por 100.000 habitantes, incidência de cancro renal, ambos os sexos, em 2022 (Retirado de IARC & OMS, 2024)

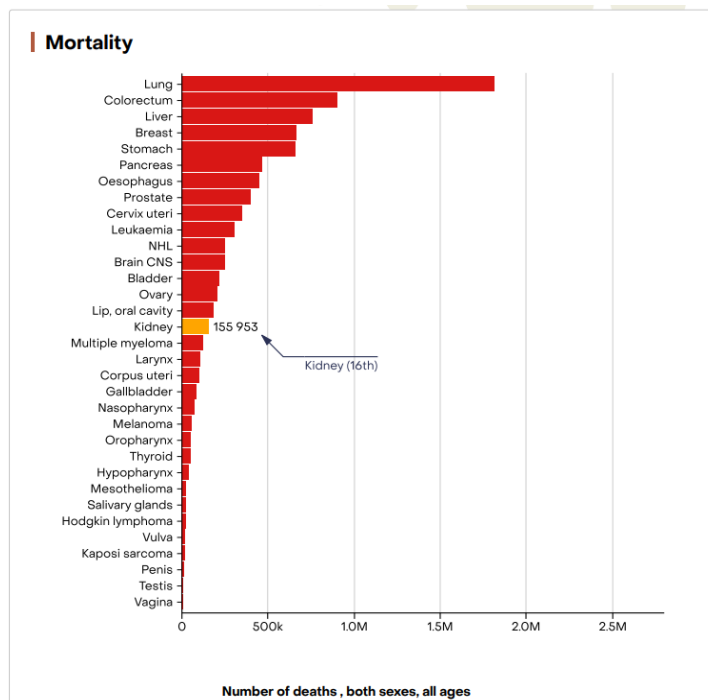


Figura 3: Taxa padronizada por idade (mundo) por 100.000 habitantes, taxa de mortalidade de cancro renal, ambos os sexos, em 2022 (Retirado de IARC & OMS, 2024)

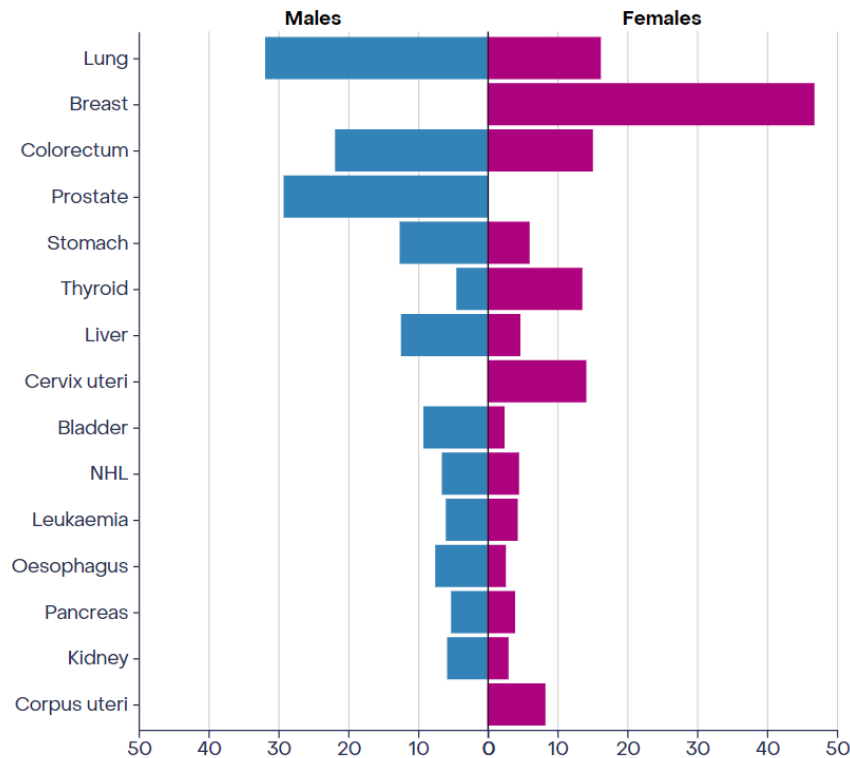


Figura 4: Representação da incidência de cancro renal, em homens e mulheres, em 2022
(Retirado de IARC & OMS, 2024)

Na **Figura 3** podemos observar que a taxa de mortalidade por CCR no mundo corresponde a 1/3 da taxa de incidência da doença (**Figura 2**), o que explica o facto de apesar do CCR representar mais de 80% dos casos de cancro renal, apenas cerca de 30% dos pacientes desenvolvem metástases após cirurgia, resultando em complicações que podem levar a óbito (Kanwal, 2023).

Vários fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do CCR, incluindo tabagismo, obesidade, hipertensão arterial, história familiar da doença e exposição a produtos químicos tóxicos. A compreensão destes fatores de risco é fundamental para a implementação de estratégias de prevenção e deteção precoce da doença. No entanto, a etiologia do CCR é em grande parte desconhecida (Capitanio et al., 2019).

O diagnóstico precoce do CCR é essencial para melhorar as taxas de sobrevivência e os resultados clínicos dos pacientes. Atualmente, o tratamento do CCR envolve uma abordagem multidisciplinar que pode incluir cirurgia, terapias sistémicas, radioterapia e imunoterapia, dependendo do estágio da doença e das características individuais do paciente (Capitanio & Montorsi, 2016).

Em resumo, a epidemiologia do CCR desempenha um papel fundamental na compreensão da distribuição e dos determinantes da doença, mundialmente. Através da investigação contínua, da vigilância epidemiológica e da implementação de políticas de saúde pública, é possível melhorar a prevenção, o diagnóstico e o tratamento do cancro renal, contribuindo para uma melhor gestão da doença (Capitanio et al., 2019).

b) Terapêutica

O tratamento do CCR é uma área crucial da oncologia que visa controlar a progressão da doença, promover a sobrevivência do paciente e melhorar a qualidade de vida. O CCR pode exigir abordagens terapêuticas variadas, dependendo do estágio da doença e das características individuais do paciente (Corgna et al., 2007).

A cirurgia, é geralmente, o tratamento inicial para o CCR localizado. A nefrectomia parcial ou radical pode ser realizada para remoção de tumor renal e parte do tecido circundante, dependendo da extensão da doença. A cirurgia pode ser curativa em casos de CCR localizado, possibilitando uma eventual cura para o paciente (Corgna et al., 2007).

A imunoterapia tem emergido como uma opção terapêutica promissora para o CCR avançado. Os inibidores de checkpoint imunológicos, como os anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4, demonstraram eficácia no tratamento de alguns subtipos de CCR metastático, ativando o sistema imunitário para reconhecer e atacar as células cancerígenas (Capitanio & Montorsi, 2016).

O objetivo da imunoterapia é aumentar a resposta imune do paciente. Uma vez removido o tumor, acredita-se que a imunoterapia adjuvante pode tratar melhor a doença subclínica que pode levar ao aparecimento da doença. Várias metodologias têm sido utilizadas, incluindo administração de citocinas, vacinas, terapia com células dendríticas e transplante alogénico de células-tronco hematopoéticas (Kenney & Wood, 2012).

As terapias dirigidas visam inibir especificamente vias de sinalização que promovem o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas. Os inibidores de tirosina quinase (TKI), como os que visam o recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), têm sido amplamente utilizados no tratamento do CCR metastático, demonstrando melhorias significativas na sobrevivência e na progressão da doença (Motzer et al., 2022).

Diversos agentes direcionados foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), autoridade reguladora do medicamento dos Estados Unidos, para o tratamento do CCR avançado na primeira e/ou linhas subsequentes de terapia. Os inibidores de checkpoint imunológico revolucionaram as opções de tratamento, visto que, os anticorpos de checkpoint alteram a interação entre as células do sistema imunológico e as células apresentadoras de antígenos, incluindo as células tumorais. Esses agentes podem aumentar uma resposta imune antitumoral e têm se mostrado promissores em diversas indicações tumorais (Motzer et al., 2022).

O axitinibe é um TKI seletivo de 2ª geração de VEGFR, enquanto o pembrolizumabe é um anticorpo monoclonal que se liga de forma seletiva à PD-1 e bloqueia a interação entre PD-1 e seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, ambos expressos em células apresentadoras de antígeno. Em abril de 2019, o FDA aprovou a combinação de axitinibe com pembrolizumabe para tratamento de primeira linha de pacientes com CCR avançado, e em um estudo randomizado de fase III KEYNOTE-426, com pacientes de CCR de risco favorável, intermédio ou baixo, alguns pacientes receberam axitinibe/pembrolizumabe e outros sunitinibe (Porta et al., 2019).

Os resultados mostraram que aqueles que receberam a medicação combinada tiveram uma maior taxa de resposta global e uma sobrevida livre de progressão da doença mais longa. Portanto, com base nestes resultados, a terapia combinada foi considerada a opção preferida para pacientes com CCR em todos os grupos de risco (Porta et al., 2019).

Ainda, existem opções de tratamento minimamente invasivas como a crioterapia e as ablações por radiofrequência, que inicialmente eram recomendadas apenas para pacientes com um rim ou para aqueles que não podiam ser submetidos a procedimentos mais comuns, como a cirurgia. No entanto, as indicações clínicas para esses tratamentos foram aumentando, desde que estudos clínicos mostraram controle aceitável da doença. Portanto, estes tratamentos podem ocorrer em tumores T1 (com menos de 7 cm) onde a cirurgia não pode ser realizada. Os resultados de sobrevivência são praticamente semelhantes aos da cirurgia, mas a recorrência local é maior (Bahadoram et al., 2022).

A radioterapia pode ser utilizada no tratamento paliativo do CCR metastático para aliviar sintomas, como dor óssea ou adaptação de órgãos adjacentes. A radioterapia pode ajudar a controlar o crescimento tumoral e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com CCR avançado (Capitanio & Montorsi, 2016).

Apesar dos avanços na terapêutica do CCR, ainda existem desafios a superar, como resistência ao tratamento, toxicidade e recorrência da doença. A investigação contínua em novas

terapias, biomarcadores preditivos e estratégias de combinação terapêutica é essencial para melhorar os resultados dos pacientes com CCR (Capitanio & Montorsi, 2016).

A decisão sobre a abordagem terapêutica mais adequada é tomada por equipes multidisciplinares de oncologistas, cirurgiões, radiologistas e enfermeiros especializados, trabalhando em conjunto para fornecer o melhor cuidado possível aos pacientes. A implementação de diretrizes clínicas baseadas em evidências e a participação em ensaios clínicos são fundamentais para garantir o acesso a tratamentos inovadores e melhorar os resultados a longo prazo (Simões, 2014).

3. Citoesqueleto

O citoesqueleto é uma estrutura presente no interior das células eucariotas. Esta estrutura é composta por uma rede complexa de várias proteínas filamentosas que conferem suporte, forma e organização às células. O citoesqueleto desempenha várias funções essenciais para o funcionamento celular, incluindo a divisão celular, o transporte intracelular, a manutenção da forma celular, a motilidade e a adesão celular (Hall, 2009).

Existem três principais componentes do citoesqueleto nas células eucarióticas: os microtúbulos, os filamentos de actina e os filamentos intermédios. Os microtúbulos são estruturas tubulares compostas por tubulina, que desempenham um papel fundamental na organização celular, divisão celular, transporte intracelular e movimento de organelos. Os filamentos de actina são filamentos finos compostos por monômeros de actina, que são essenciais para a contração celular, a formação de protrusões celulares e a motilidade celular. Estes podem organizar-se em grupos de filamentos, formando fibras de stress. Os filamentos intermédios são filamentos mais espessos e resistentes, que conferem resistência mecânica e estabilidade estrutural às células (Fife et al., 2014).

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica e altamente regulada, que é capaz de se reorganizar rapidamente em resposta a estímulos intracelulares e extracelulares. Esta capacidade de reorganização permite que as células respondam a mudanças no ambiente e realizem funções complexas, como a divisão celular, a migração celular e a formação de tecidos (Fife et al., 2014).

a) Importância das alterações que ocorrem no citoesqueleto na progressão cancro

O citoesqueleto desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão do cancro, uma vez que está envolvido em vários processos celulares que são essenciais para a formação e disseminação de tumores malignos. As alterações no citoesqueleto podem afetar a capacidade das células cancerígenas de se dividirem, migrarem ou invadirem tecidos circundantes, contribuindo assim para a progressão da doença (Hall, 2009).

As mutações somáticas e alterações de expressão de genes do citoesqueleto e de proteínas associadas ou reguladoras, são bastante comuns em muitos tipos de cancro. Este facto apoia o ponto de vista de que a sinalização mediada por força mecânica (também conhecida como mecanotransdução), governada pela rede do citoesqueleto, deve ser considerada um dos elementos-chave na homeostase dos tecidos, através da regulação das propriedades mecânicas e físicas das células (Wang et al., 2022).

Durante o desenvolvimento do cancro, as células dos tecidos são expostas a um alto grau de heterogeneidade com diferentes propriedades mecânicas. Para se adaptarem e sobreviverem no microambiente tecidual, as células cancerígenas respondem ativamente às perturbações mecânicas das matrizes extracelulares, vasos sanguíneos, células do estroma e outras células infiltrantes do tumor (Wang et al., 2022).

Abaixo estão listados processos essenciais para a iniciação e progressão do cancro nos quais o citoesqueleto desempenha um papel importante:

1. *Migração e Invasão*: O citoesqueleto desempenha um papel fundamental na migração e invasão das células cancerígenas através dos tecidos circundantes. Alterações no citoesqueleto podem promover ou inibir a formação de lamelopódia e filopódia, que facilitam o movimento das células cancerígenas. A actina é uma proteína do citoesqueleto altamente envolvida na formação de filopódios e lamelipódios, e desempenha um papel crucial na contração celular durante a migração. Esta capacidade de migração e invasão é essencial para a disseminação das células tumorais através do corpo, levando à formação de metástases em órgãos distantes (Rodat-Despoix et al., 2021). As células tumorais que adquirem a capacidade de migrar, invadir tecidos distantes e proliferar têm maior probabilidade de formar metástases. Sendo esta uma das principais causas de mortalidade associadas ao cancro. O papel do citoesqueleto na migração e invasão celular é, portanto, crucial para a formação de metástases e para a progressão da doença (Wang et al., 2022).

2. *Divisão Celular*: O citoesqueleto desempenha um papel crítico na divisão celular, garantindo a correta segregação dos cromossomas e a distribuição equitativa do material

genético para as células filhas. A tubulina é uma proteína estrutural do citoesqueleto envolvida na formação dos microtúbulos, que desempenha um papel fundamental na divisão celular. Alterações no citoesqueleto podem resultar em erros na divisão celular, levando a instabilidade genética e à formação de células cancerígenas com características anómalas (Rodat-Despoix et al., 2021);

3. *Adesão Celular*: O citoesqueleto também está envolvido na regulação da adesão celular, que é crucial para manter a integridade dos tecidos e a comunicação entre as células. As integrinas são proteínas transmembranas que atuam como recetores de adesão celular, ligando a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina dentro da célula. Alterações no citoesqueleto podem afetar a capacidade das células cancerígenas de aderirem umas às outras e ao substrato extracelular, favorecendo a separação das células do tumor primário e a invasão de tecidos circundantes (Wang et al., 2022).

O citoesqueleto também desempenha um papel fundamental na regulação da forma celular e na interação com o microambiente tumoral. Alterações na organização do citoesqueleto podem afetar a forma das células cancerígenas, influenciando a sua capacidade de se adaptar ao ambiente tumoral e interagir com outras células e componentes do microambiente (Wang et al., 2022).

Em suma, o citoesqueleto desempenha um papel essencial no desenvolvimento e progressão do cancro, influenciando processos-chave como a migração, invasão, divisão celular e adesão. A compreensão dos mecanismos pelos quais o citoesqueleto contribui para a progressão do cancro renal é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas a esta doença devastadora. A investigação contínua neste campo é necessária para melhorar o diagnóstico, tratamento e prognóstico dos pacientes com cancro renal (Rodat-Despoix et al., 2021; Wang et al., 2022).

4. Papel de bioativos alimentares na progressão do cancro

A ideia de que a alimentação e o estado nutricional podem influenciar a carcinogénese, ou seja, o desenvolvimento das células cancerígenas ou de neoplasias, não é algo novo (Srivastava et al., 2007). Os bioativos alimentares desempenham um papel fundamental na promoção da saúde e na prevenção de doenças, incluindo o cancro. No contexto do cancro, vários compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal têm sido objetos de estudo devido às suas potenciais propriedades anticancerígenas. Estes compostos atuam de

diversas formas no organismo, contribuindo para a inibição do crescimento tumoral, indução da morte celular programada e redução do risco de desenvolvimento de certos tipos de cancro (Azarenko et al., 2014).

a) Tipos de bioativos no cancro

Existem diversos tipos de bioativos alimentares que têm demonstrado atividades anticancerígenas e que poderão desempenhar um papel importante no combate ao cancro. Os mecanismos de ação dos bioativos alimentares no combate ao cancro são variados e complexos. Um dos principais modos de ação é a capacidade de atuarem como antioxidantes. Estas substâncias, como por exemplo os flavonoides, são capazes de neutralizar os radicais livres, que são moléculas instáveis, que podem danificar as células saudáveis, e desencadear processos cancerígenos. Ao neutralizar os radicais livres, muitos bioativos alimentares ajudam a proteger as células do organismo e a prevenir a formação de tumores (Esmeeta et al., 2022).

Além disso, alguns bioativos alimentares, como por exemplo curcumina (Chen et al., 2013), têm a capacidade de inibir a proliferação celular descontrolada, que é uma característica fundamental do cancro. Estas substâncias podem interferir em vias de sinalização celular específicas, incluindo miricetina (Iyer et al., 2015), impedindo o crescimento e a divisão descontrolada das células cancerígenas (Ganesan et al., 2022).

Outro mecanismo de ação importante é a capacidade de induzir a apoptose, ou morte celular programada, nas células cancerígenas. Ao desencadear este processo, os bioativos alimentares, como por exemplo luteolina, ajudam a eliminar as células anómalas do organismo, impedindo a sua propagação e crescimento. Ainda, podem ter propriedades anti-inflamatórias, ajudando a reduzir a inflamação crónica, que pode promover o desenvolvimento do cancro (Ganesan et al., 2022).

Os Fitonutrientes, como os carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos encontrados em frutas, legumes, vegetais e chás, são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Estes compostos auxiliam na proteção celular contra danos oxidativos e inflamação, ajudando a prevenir o desenvolvimento de cancros (Esmeeta et al., 2022).

Encontrada em alimentos como pimentas, salsa e aipo, a luteolina é um flavonoide que tem demonstrado atividade anticancerígena, inibindo a proliferação celular e induzindo a morte celular em células cancerígenas (Esmeeta et al., 2022). Ainda, a apigenina que é uma flavona

vegetal bastante encontrada em frutas, vegetais, salsa, entre outros, também é considerada um potente agente anticancerígeno. Diversos estudos demonstraram que a apigenina previne a expressão de metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9), ciclina D1, enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e cicli-oxigenase-2 (COX-2). A apigenina previne o cancro, induzindo a apoptose em várias células cancerígenas, incluindo mama, hepatoma, pele, tireoide, próstata e leucemia, inibindo a replicação do DNA e da proteína quinase, ativação de caspases e dano mitocondrial (Nasir et al., 2020).

A miricetina também é um bioflavonoide encontrado em abundância em vegetais, chás, frutos vermelhos, vinho tinto, entre outros, que foi estudada pelos seus potenciais efeitos terapêuticos em doenças cardiovasculares, cancro (Lu et al., 2006) e diabetes mellitus (Subramaniam et al., 2019). Um estudo recente mostrou que a formulação de microemulsão pode melhorar a solubilidade da miricetina e também aumentar a sua atividade antiproliferativa contra células do cancro de fígado humano (HepG2) (Guo et al., 2016). A miricetina é um promissor agente anticancerígeno e quimiopreventivo com potencial terapêutico relatado em cancro de ovário, cólon, pele, fígado e mama. Estudos baseados em células mostraram que a miricetina inibiu a proliferação de células T24 de cancro de bexiga, induzindo a paragem do ciclo celular na fase G2/M, regulando negativamente a ciclina B1 e a quinase dependente de ciclina cdc2 (Sun et al., 2012).

Além disso, num modelo *in vivo*, a progressão tumoral foi significativamente inibida quando os animais receberam uma dieta contendo 100 mg/kg de miricetina, efeito atribuído à inibição da quinase-1 ativada por p21 (PAK1) (Iyer et al., 2015). Um estudo mais recente demonstrou que a miricetina pode exercer potenciais efeitos anti-metastização por meio de regulação negativa da expressão das metaloproteinases de matriz MMP2 e/ou MMP9 em células de cancro de mama (Ci et al., 2018).

Os vegetais crucíferos, como o brócolos, a couve-flor e a rúcula, são ricos em glucosinolatos, que podem ser convertidos em isotiocianatos, como a erucina. Estes compostos têm demonstrado atividades anticancerígenas significativas, inibindo o crescimento de células cancerígenas, induzindo apoptose e reduzindo a angiogénese, o que contribui para a inibição do desenvolvimento tumoral (Azarenko et al., 2014; Barba et al., 2016).

Os ácidos gordos ómega-3, presentes em peixes gordos, sementes de linhaça e nozes, são conhecidos pelos seus efeitos anti-inflamatórios e pela capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas. Estes ácidos gordos são especialmente relevantes na prevenção de cancros como o colorretal e o de mama (Azarenko et al., 2014).

A curcumina, encontrada na curcuma, é um potente antioxidante e anti-inflamatório que tem sido associado à inibição do crescimento tumoral e à indução da morte celular em vários tipos de cancro (Esmeeta et al., 2022). Os investigadores usaram várias abordagens para aumentar a biodisponibilidade da curcumina, incluindo nanopartículas, piperina, complexos de fosfolípidios e lipossomas (Subramaniam et al., 2019). Foi demonstrado que análogos sintéticos da curcumina e análogos polifenólicos da curcumina têm efeitos inibitórios contra a tirosinase do cogumelo. Entre os 61 compostos de curcumina relatados, quatro compostos (E10, F10, FN1 e FN2) foram relatados como inibindo células do cancro de próstata, pâncreas e cólon, com IC₅₀ inferior a 1 µM (Wei et al., 2012). A curcumina demonstrou potentes propriedades anticancerígenas em cancros humanos, incluindo cancro de pulmão, pâncreas, melanoma, próstata, cabeça e pescoço, mama, colorretal e ovário. A curcumina exerce efeitos anticancerígenos através de vários mecanismos, que afetam a regulação do crescimento celular e a apoptose. Por exemplo, a curcumina pode inibir a angiogénese, bem como inibir sua proliferação e metastização, diminuir a inflamação crónica e combater células cancerígenas mutantes (Subramaniam et al., 2019).

Num modelo de xenoenxerto de murganho, foi demonstrado que uma dose baixa de curcumina (20 µg/kg) reduziu a progressão do cancro de mama (Choi & Park, 2015). Em outro estudo, a suplementação de curcumina (1 g/kg) inibiu significativamente o crescimento e a metástase de células cancerígenas colorretais no fígado (Chen et al., 2013).

Presente em uvas, vinho tinto e algumas frutas, o resveratrol é um polifenol com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que podem ajudar na prevenção de cancros como o de mama e do cólon (Amiri et al., 2013). Num estudo com o objetivo de investigar se o resveratrol (RSV) poderia sensibilizar células humanas de cancro de mama triplo negativo (TNBC) à morte celular induzida por FL118, transição epitelial para mesenquimal (EMT), invasão e migração, os efeitos da administração sequencial de RSV e FL118 em células MDA-MB-436 e MDA-MB-468 foram avaliados em termos de viabilidade celular, citotoxicidade, apoptose, distribuição do ciclo celular, níveis de caspase-3/7 ativa, migração e invasão. Além disso, também foram avaliados os níveis de mRNA e proteínas de genes e proteínas associados à EMT. A administração sequencial de RSV e FL118 inibiu a viabilidade celular em ambas as linhas celulares TNBC. Enquanto isso, a administração sequencial de RSV e FL118 também reduziu drasticamente as capacidades migratórias e invasivas, e também reverteu o processo EMT em ambas as células TNBC. Ainda, a administração sequencial de RSV e FL118 levou a um aumento significativo de células apoptóticas, bem como aos níveis ativos de Caspase-3/7,

acumulação de células TNBC na fase G1 e suprimiu acentuadamente os níveis de mRNA e proteínas de N-caderina, γ -catenina, Vimentina, Caracol e Slug, e também reduziu significativamente os níveis de mRNA de Fibronectina, Twist1, Genes Twist2, Zeb1 e Zeb2, enquanto aumentaram os níveis de mRNA e proteína dos genes da E-caderina. O RSV sensibilizou células TNBC para FL118 facilitando a apoptose, migração e invasão, melhorando o aprisionamento intracelular de FL118. Assim, os resultados sugerem que, uma vez que o RSV aumentou a atividade anticancerígena *in vitro* do FL118 no cancro de mama, este pode ser um potencial agente terapêutico no estágio avançado da doença (Saglam et al., 2021).

b) Isotiocianato erucina e sua atividade na terapêutica do cancro

A erucina, como já mencionado, é uma substância bioativa encontrada em VC, como a rúcula, brócolos, couve-flor, entre outros. Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de VC crus reduz significativamente a incidência de cancro de bexiga. Foi demonstrado que a erucina inibe a proliferação do cancro de bexiga, e induz a apoptose através da paragem da fase G2/M *In vivo*, e inibição de histonas desacetilase pró-crescimento *In vitro* (Chestnut et al., 2020). Os efeitos do erucina na inibição do crescimento de células cancerígenas, regulação do ciclo celular e indução de apoptose nos cancros de próstata, bexiga, colos e pulmão, também foram relatados (Melchini & Traka, 2010). Ainda, foram demonstradas em células de leucemia humana e multirresistentes, a capacidade da erucina de provocar a paragem do ciclo celular, apoptose e despolarização do potencial mitocondrial (Melchini & Traka, 2010).

Um estudo realizado por Kaur et al., (2022) que teve como objetivo investigar o efeito do paclitaxel em combinação com a erucina, usaram como base o óleo de olíbano, que tem um grande potencial terapêutico contra o cancro de mama, para formular uma nanoemulsão contra o cancro de mama. A nanoemulsão combinada de paclitaxel e erucina, demonstrou ter toxicidade aumentada para as células epiteliais do cancro de mama humano (T-47D) e proporcionou uma libertação sustentada do fármaco, em comparação as mesmas substâncias de forma individual (Kaur et al., 2022). Além disso, a nanoemulsão diminuiu significativamente os níveis de parâmetros hepáticos e renais, juntamente com o stresse oxidativo em murganhos com cancro de mama. Ainda, apresentou níveis diminuídos das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, e os exames histopatológicos revelaram a restauração da mama tumoral aos tecidos normais em murganhos com cancro de mama, tratados com a nanoemulsão combinada de

paclitaxel e ER. Portanto, a nanoemulsão combinada pode atuar como uma potencial alternativa viável e terapêutica para o cancro de mama resistente aos medicamentos (Kaur et al., 2022).

Num outro estudo, Bello et al. (2023) exploraram os potenciais efeitos anticancerígenos da erucina, isotiocianato mais abundante presente na rúcula (*Eruca sativa*), libertador de sulfeto de hidrogénio (H_2S), em células MDA-MB-231, que é um modelo *in vitro* validado de cancro de mama triplo negativo. Os resultados mostraram que dependendo da concentração, a erucina inibiu significativamente a proliferação de células MDA-MB-231, induzindo apoptose e autofagia. Além disso, a erucina preveniu a geração intracelular espécies reativas de oxigénio, promovendo a expressão de genes antioxidantes importantes e interrompeu a migração, invasão e formação de colónias de células MDA-MB-231. Em conclusão, mostraram que o consumo de erucina pode representar uma estratégia nova e promissora para intervenção contra o cancro de mama triplo negativo (Bello et al., 2023).

Mais recentemente, os efeitos quimiopreventivos da erucina foram associados à sua propriedade de ser um doador de H_2S no adenocarcinoma pancreático humano. Assim sendo, foi realizado um estudo com o objetivo de determinar os efeitos da erucina na modulação da proliferação e na indução da morte de células, de melanoma humano, usando múltiplas abordagens *in vitro*. Os resultados mostraram que a erucina reduziu significativamente a proliferação de diferentes linhas celulares de melanoma humano, assim como, uma análise de citometria de fluxo com anexina V/PI, demonstrou que a erucina foi capaz de induzir apoptose e paragem do ciclo celular em células de melanoma A375, impedindo a migração, a invasão e a capacidade de clonagem das mesmas (Maresca et al., 2022). Portanto, demonstraram que a erucina desempenha um papel importante na inibição da progressão do melanoma e poderia representar uma nova terapia complementar para o tratamento do melanoma humano (Maresca et al., 2022). Ainda, estudos demonstram que a erucina possui propriedades anticancerígenas e pode desempenhar um papel importante na terapêutica do CCR (Azarenko et al., 2014).

Além disso, estudos pré-clínicos em modelos animais têm demonstrado resultados encorajadores, com a erucina mostrando eficácia na redução do tamanho do tumor renal, na diminuição da vascularização do tumor e na inibição da metástase, o que abre caminho para potenciais aplicações clínicas futuras (Melchini & Traka, 2010).

Em suma, a erucina emerge como uma promissora opção terapêutica no cenário do cancro renal, oferecendo uma abordagem inovadora e multifacetada no combate desta doença complexa. O seu potencial para inibir o crescimento tumoral, induzir a morte celular programada e modular vias de sinalização celular torna-a um alvo de grande interesse na

pesquisa oncológica, com perspectivas de impacto positivo na prática clínica e no prognóstico dos pacientes afetados por esta condição (Azarenko et al., 2014).

5. Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto do isotiocianato erucina no citoesqueleto de células de cancro renal, em particular nos microtúbulos e nos microfilamentos de actina. Adicionalmente, pretende-se estudar o mecanismo associado à indução das alterações observadas.

Capítulo II – Materiais e Métodos

a) Cultura de células VERO e 786-O

Foram utilizados dois tipos de culturas de células, células VERO-E6 e células 786-O. As células VERO pertencem a uma linhagem de células de rim de macaco verde muito utilizada em culturas de células. As células 786-O são células de carcinoma renal humano. As duas linhas celulares foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% soro fetal bovino (FBS) suplementado com penicilina e estreptomicina. As células foram cultivadas em frascos T25 ou T75 até atingirem 70-80% de confluência. Nessa altura as células foram subcultivadas, sendo destacadas com recurso a uma solução de Tripsina. As células foram mantidas a 37° C numa atmosfera com 5% CO₂ e humidificada.

b) Imunofluorescência

As células foram semeadas em lamelas circulares de vidro em placas de 12 poços de forma a estarem a cerca de 30-40% de confluência no dia seguinte e de seguida tratadas com diferentes concentrações de erucina durante 24 h. As concentrações de erucina usadas foram 0 µM, 10 µM, 50 µM e 80 µM (em dissolvida em PBS com 2% etanol). Após o tratamento com erucina as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS durante 10 min, e marcadas com CytoPainter Phalloidin-iFluor 594 (abcam, 1:750) e com anticorpo anti-tubulina (Molecular probes; 1:200) e com um anticorpo secundário conjugado para Alexa Fluor 488 (Molecular probes, 1:300) em PBS com 10% FBS como agente bloqueante. As lamelas com as células foram montadas em Mowiol 4-88 contendo DAPI para visualização do núcleo. A aquisição de imagens foi efetuada através de um microscópio de fluorescência de Zeiss Axiobserver com uma objetiva x40 e software ZEN blue (Zeiss).

c) Análise de imagens de imunofluorescência

Para a análise de imagens obtidas, foi utilizado o programa FIJI (FIJI Is Just Image J). Foi feita a classificação das células relativamente aos parâmetros de análise definidos.

Os microtúbulos foram classificados como: i) normais, quando organizados com o MTOC e apresentando tamanho (espessura) e formato característicos da rede de microtúbulos;

ii) aberrante, quando o tamanho e a forma dos microtúbulos estavam alterados, tipicamente com espessura aumentada e formato mais tortuoso; iii) duvidoso, quando apenas a forma ou o tamanho estavam alterado e/ou a alteração observada era menos evidente; e iv) ausente quando os microtúbulos não eram visíveis.

O MTOC foi considerado: i) presente quando era visível uma aglomeração de microtúbulos a partir dos quais a rede de microtúbulos se ramificava; ii) ausente, quando esta estrutura não era detetável; iii) e duvidoso quando esta estrutura estava presente, mas não claramente definido ou era consideravelmente menor e/ou desorganizado.

O citoesqueleto de actina foi classificado como presente, ausente e dúbio, sendo divididos nos seguintes grupos: As fibras i) presente, quando a sua presença é evidente e normal, ii) ausente, quando não há presença de fibras de stress de actina e iii) dúbio quando a presença de fibras de stress de actina não é evidente. As células em apoptose ou em divisão não foram consideradas na análise uma vez que o seu citoesqueleto sofre modificações profundas durante estes dois processos.

d) Polimerização *in vitro* de tubulina

Para avaliar o impacto direto da erucina no processo de polimerização de tubulina utilizou-se o “HTS tubulin polymerization assay biochem kit”. O protocolo foi executado de acordo com as indicações do fabricante. O ensaio de polimerização de tubulina é controlado por temperatura: à temperatura de 37°C a tubulina polimeriza, formando microtúbulos, por oposição, a uma temperatura de 4°C a tubulina mantém-se despolimerizada. A medição da absorvância foi realizado com recurso a um leitor de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek Instruments, VT, EUA) e serve como forma de avaliação do grau de polimerização da tubulina, dado que a absorvância da solução aumenta quando se forma estruturas poliméricas. O comprimento de onda utilizado durante as leituras foi de 340 nm, sendo que a leitura se realizou durante 90 minutos a cada 1 minuto.

Os reagentes utilizados foram: erucina (em PBS com 2% etanol) a concentrações de 0 mM, 10 mM, 50 mM e 80 mM; GTB (general tubulin buffer com concentração final de 80 mM); GTP stock com concentração final de 100 mM; tubulina com concentração final de 8 mM e paclitaxel a concentração final de 2 mM reconstituído em DMSO. O paclitaxel foi utilizado como estabilizador dos microtúbulos, permitindo validar o ensaio por funcionar como um

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

controlo. Para a preparação das misturas de reação, utilizou-se uma placa de 96 poços, que deve foi previamente aquecida.

Capítulo III – Resultados e Discussão

a) A Erucina altera a morfologia e organização dos microtúbulos em células renais

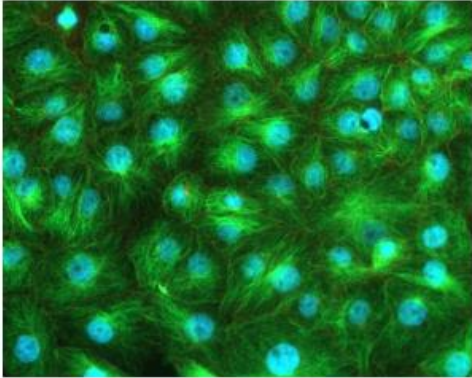
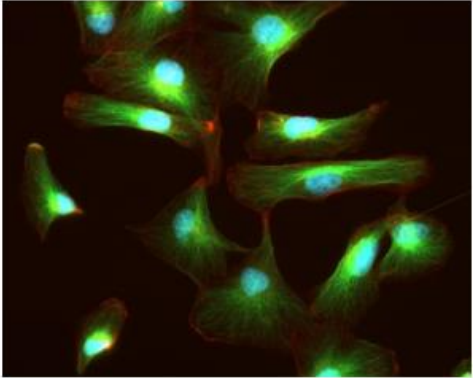
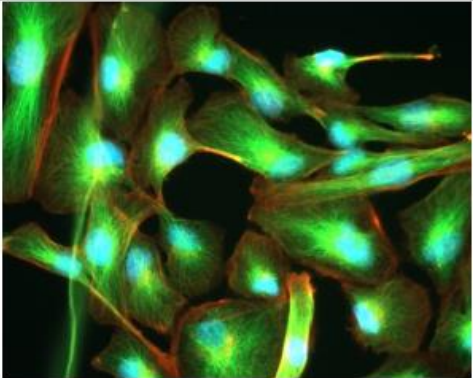
As imagens apresentadas (**Figura 5**) foram obtidas através de imunofluorescência. As células utilizadas foram células VERO e 786-O, que foram expostas a concentrações de erucina de 0 μ M, 10, μ M, 50 μ M e 80 μ M. Foram selecionadas imagens aos tempos 4 h, 8 h e 24 h. As imagens correspondentes às imagens controlo referem-se a células expostas a 0 μ M de erucina. Estão evidenciadas as estruturas: microtúbulos e MTOC marcados a cor verde, microfilamentos de actina a cor vermelha e o núcleo das células a cor azul.

Para a realização da análise das imagens obtidas por imunofluorescência, foram consideradas classificações de presente, ausente ou dúvida para a estrutura MTOC, para os microtúbulos a classificação adotada foi normal, anormal, ausente dúvida e para as fibras de stress de actina presente, ausente ou dúvida (**Figura 5 e 6**). Para a estrutura MTOC, tem tendência estar ausente com o aumento da concentração em erucina e com o aumento de tempo de exposição. As células VERO apresentam maior evidencia deste aumento da ausência de MTOC, relativamente às células 786-O (**Figura 5 e 6**). Os microtúbulos perdem a sua estrutura, original tornando-se maioritariamente anormais com o aumento das concentrações em erucina e com o passar do tempo. As fibras de stress de actina, permitem visualizar o perímetro da célula (**Figura 5 e 6**). Verifica-se maior ausência desta estrutura às 24 h às concentrações de 10 μ M, 50 μ M e 80 μ M (**Figura 5 e 6**).

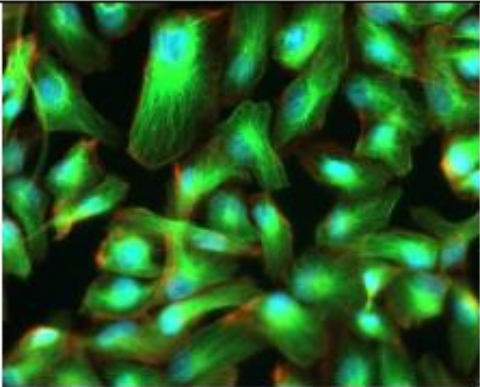
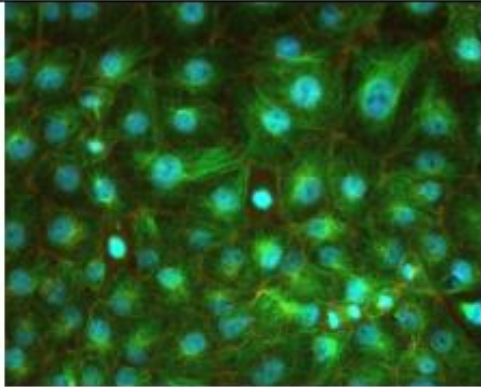
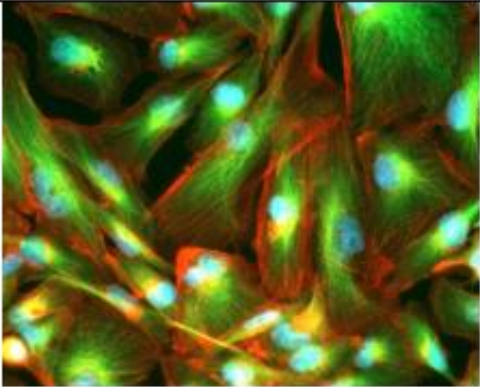
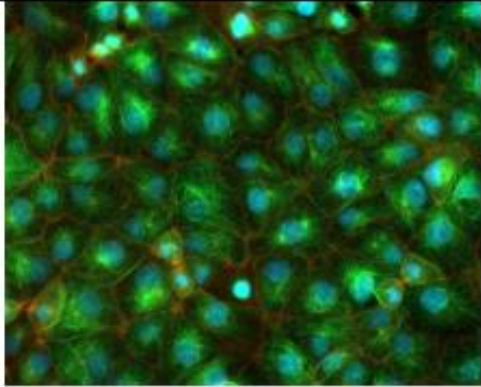
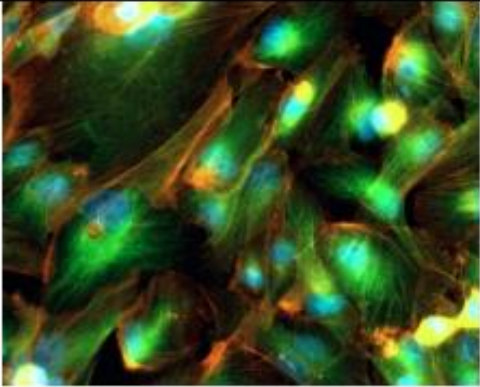
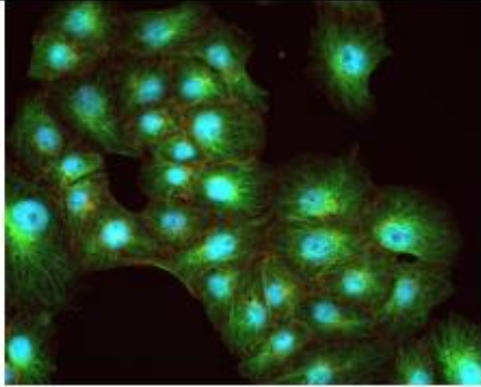
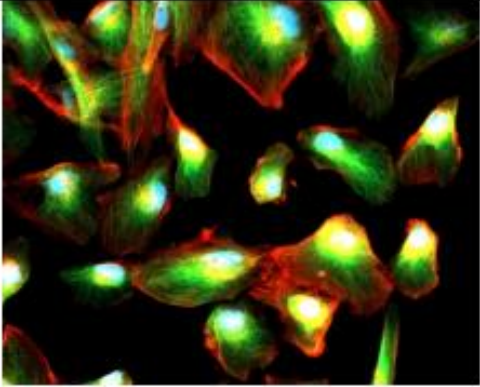
Com o aumento da concentração de erucina é possível verificar a alteração do aspeto dos microtúbulos ou mesmo a sua ausência assim como do MTOC. As fibras de stress de actina, no entanto, parecem não sofrer grandes alterações com o aumento da concentração de erucina. A concentrações de 10 μ M com o aumento do tempo de exposição a erucina, verificam-se ligeiras alterações dos microtúbulos tanto em células VERO como em células 786- O. Com o aumento de concentração para 50 μ M a alteração do aspeto dos microtúbulos ainda é mais evidente, principalmente a tempo 24 h. Com concentração de 80 μ M, a alteração da estrutura dos microtúbulos e a ausência de MTOC é bastante evidente. Com o aumento da concentração de erucina os microtúbulos são em menor número e apresentam uma forma mais tortuosa. Com concentrações mais elevadas de erucina (80 μ M), os microtúbulos deixam mesmo de ser

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

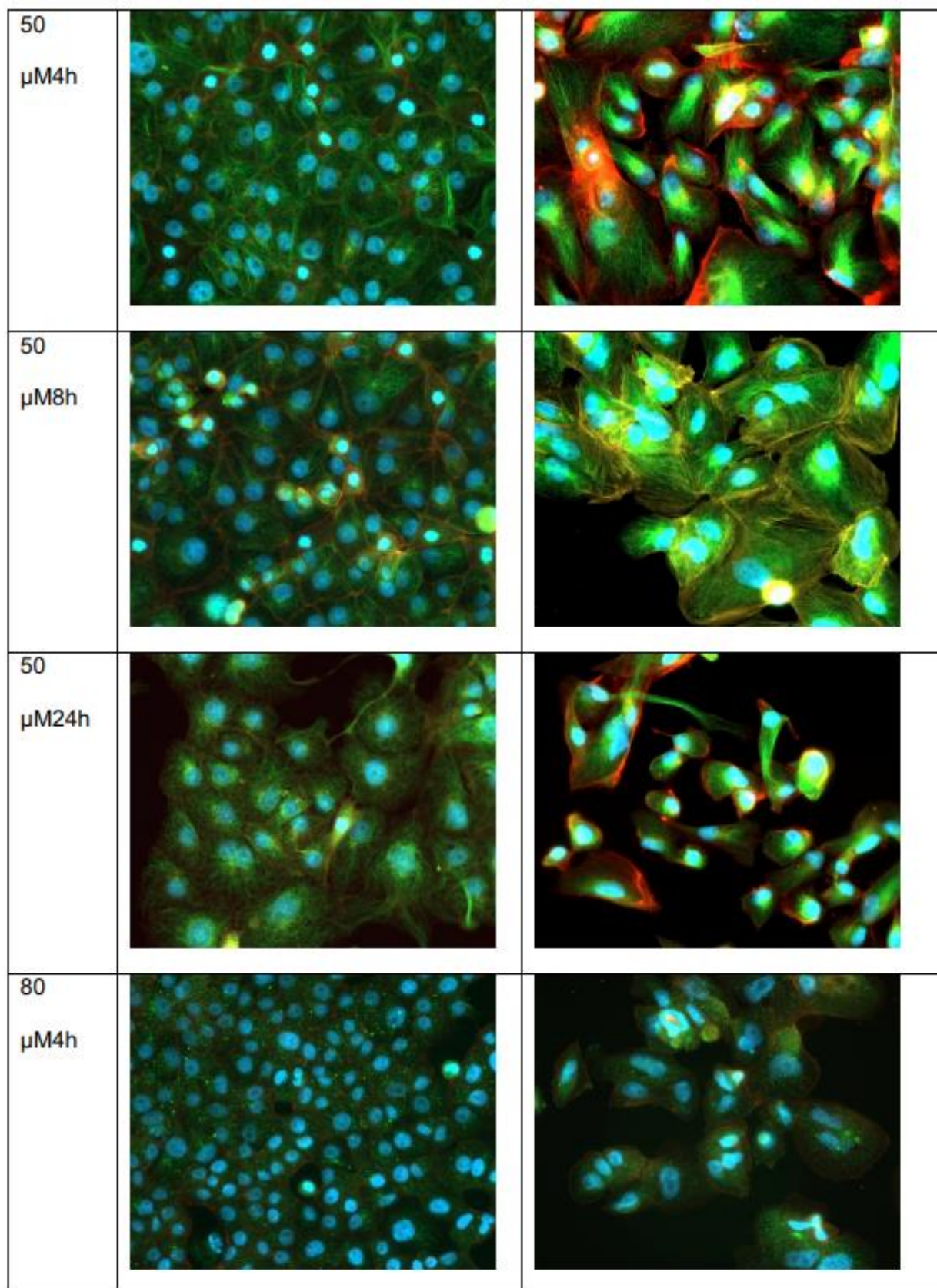
visíveis. Estas observações sugerem um impacto da erucina na dinâmica de polimerização ou de despolimerização da tubulina.

	VERO	786-O
Controlo 4h		
Controlo 8h		

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS

Controlo 24h		
10 μ M4h		
10 μ M8h		
10 μ M24h		

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS



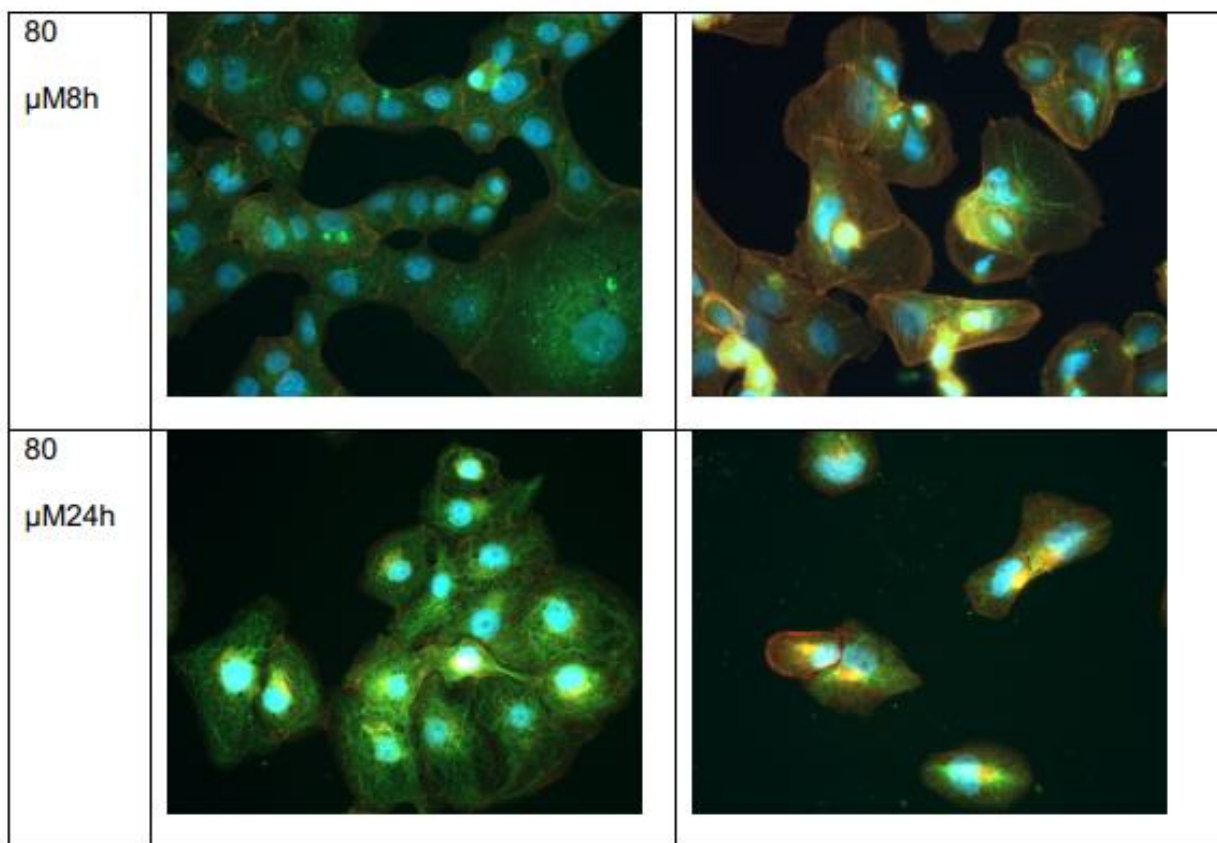
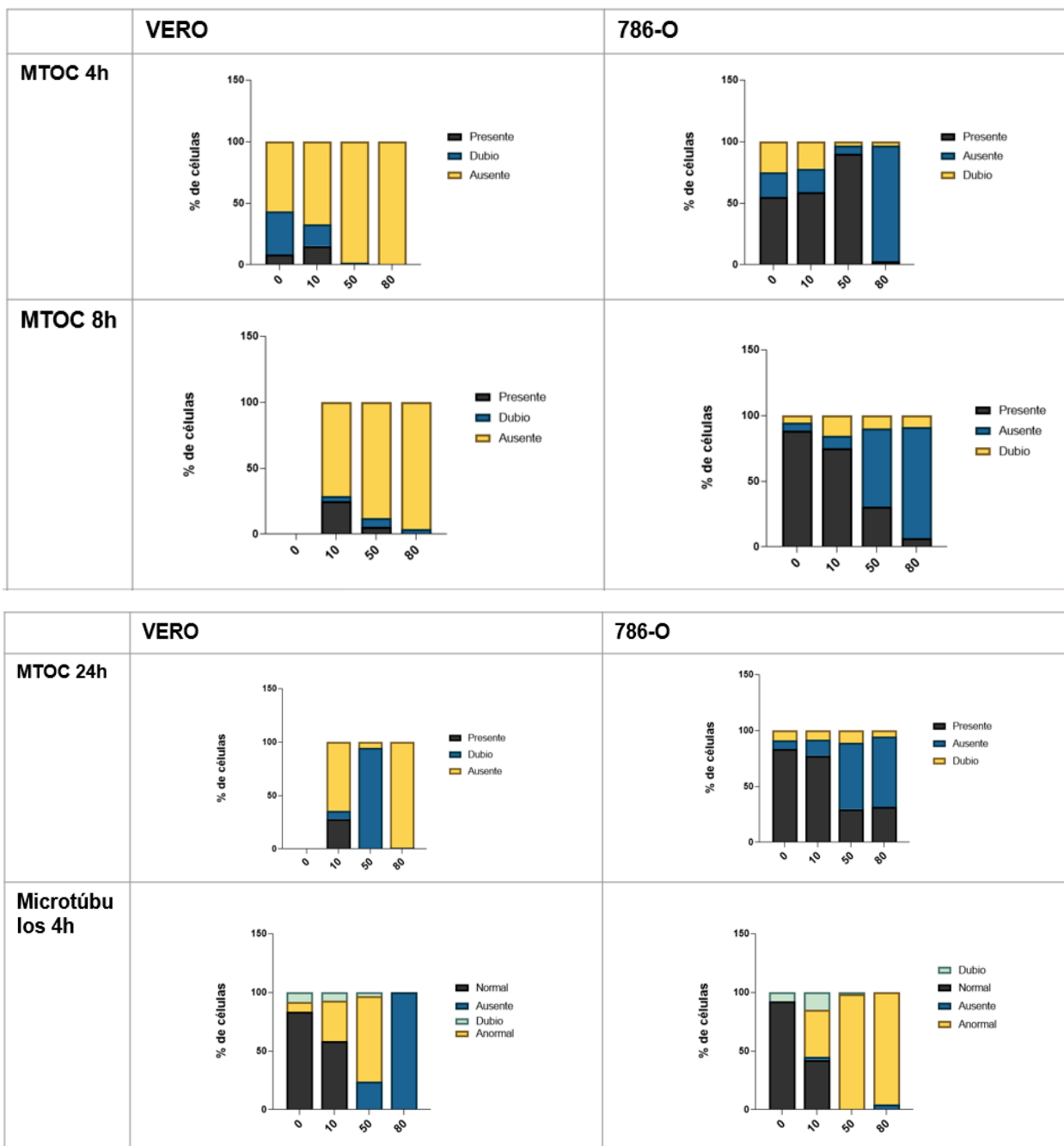


Figura 5: Imagens de células VERO e 786-O - tratadas a concentrações de 0 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 80 μ M, a tempos diferentes de 4 h, 8 h e 24 h, obtidas por imunofluorescência. As células depois de incubadas com erucina foram fixadas e marcadas com DAPI para a visualização do núcleo (azul), anticorpo anti tubulina para visualização dos microtúbulos (verde) e com phaloidina para visualização dos microfilamentos de actina (vermelho). As imagens apresentadas são representativas das condições testadas.

VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIIS



VANESSA ALEXANDRA PEREIRA MENDES
IMPACTO DA ERUCINA NO CITOESQUELETO DE CÉLULAS RENAIS

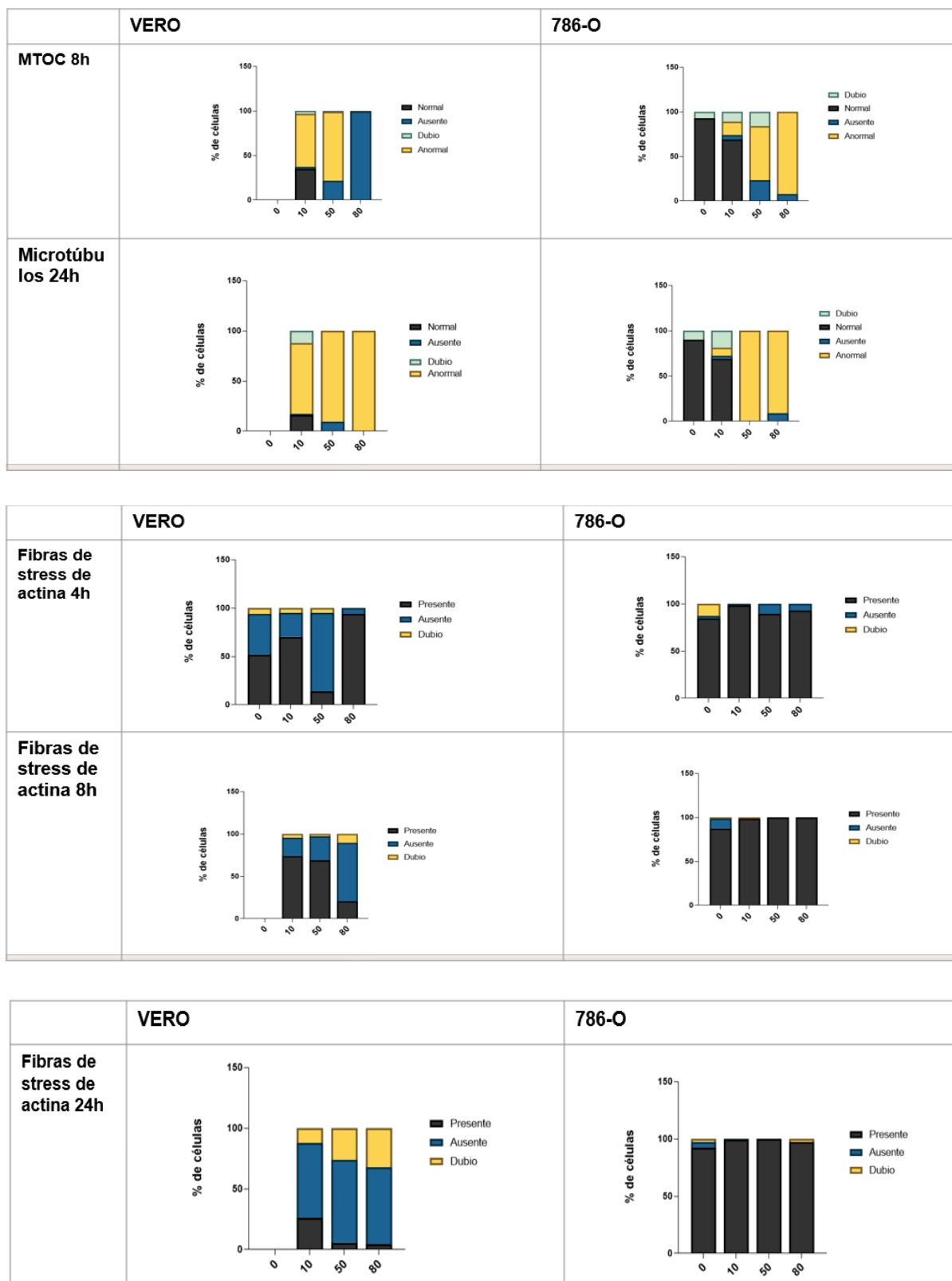


Figura 6: Seleção de gráficos resultantes da análise das imagens obtidas por imunofluorescência. As células foram analisadas para a presença do MTOC, para a morfologia dos microtúbulos e para a presença de fibras de stress de actina. Nos gráficos estão representadas as médias das percentagens de células de cada foto com o total de células analisadas, de pelo menos 200 por condição.

Segundo a pesquisa elaborada por Azarenko et al., (2008) em células de cancro de mama o sulforafano inibe a proliferação celular. Apresentando resultados positivos de inibição de proliferação e de mitose a concentrações de 26 e 13 μM . As células VERO a concentrações de 10 μM de erucina apresentam diminuição da presença de MTOC com o aumento do tempo de exposição a erucina. A concentrações de 80 μM o MTOC está totalmente ausente em todas as células, em todos os tempos (4 h, 8 h e 24 h).

Os microtúbulos das células VERO estão ausentes a concentrações de 80 μM aos ao fim de 4h e 8h. Após 24 h de exposição a erucina a estrutura dos microtúbulos é anormal. Sugerindo que pode ter voltado a existir uma tentativa de repolimerização da tubulina ao fim de 24h. As fibras de stress de actina nas células VERO apresentam-se ausentes maioritariamente ao fim de 24 h de exposição ao isotiocianato às concentrações de 10 μM , 50 μM e 80 μM .

Nas células 786-O o MTOC está ausente principalmente a concentrações de 80 μM ao fim de 4h. Ao fim de 8 h e 24 h existe evidencia de ausência de MTOC a concentrações de 50 μM e de 80 μM . A estrutura dos microtúbulos encontra-se anormal a concentrações de 50 μM e de 80 μM ao fim de 4h assim como em concentração de 50 μM e de 80 μM ao fim de 8 h.

A concentração de 50 μM ao fim de 24 h a percentagem de microtúbulos anormais de 100%. Com concentração de 80 μM ao fim de 24 h a percentagem de microtúbulos anormais aproxima-se da totalidade. Relativamente as fibras de stress de actina não se notam grandes alterações na presença desta estrutura celular, às concentrações e tempos estudados para células 786-O.

b) A Erucina inibe diretamente a polimerização da actina

Através da **Figura 7** é possível verificar que com o aumento das concentrações de erucina existe diminuição da polimerização de tubulina in vitro. Este resultado sugere que a erucina atua diretamente na polimerização da actina e não através da regulação de outras proteínas ou processos associados a este processo. O paclitaxel funciona como controlo pois indica que na presença do mesmo existe estabilização dos microtúbulos. A inibição de polimerização de tubulina mais acentuada verifica-se a concentração de 80 μM , mas existe uma inibição cada vez maior com o aumento da concentração de erucina.

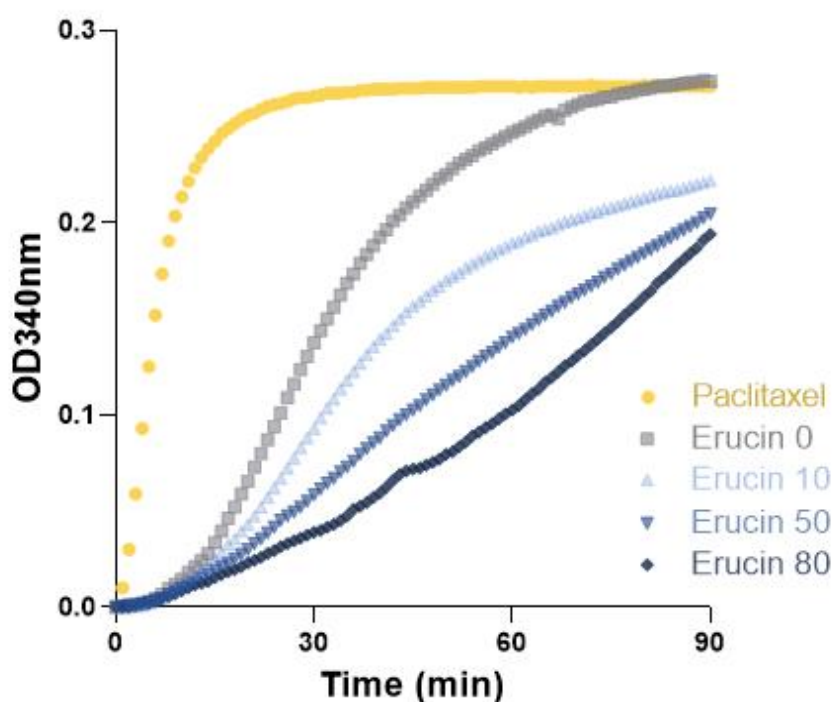


Figura 7: Resultados da reação de polimerização de tubulina a concentrações de 0 μM , 10 μM , 50 μM e 80 μM de erucina. A tubulina não polimerizada foi incubada com diferentes concentrações de erucina e a sua polimerização foi monitorizada durante 90 min através do aumento da turbidez da solução medido pela absorvância a 340 nm.

A erucina como já referido anteriormente é um isotiocianato com propriedades anticancerígenas. Ensaios *in vitro* realizados em linhas celulares de melanoma, demonstraram que a erucina apresenta atividade antineoplásica. Atuando por diminuição da proliferação celular deste tipo de cancro, diminuindo assim a invasão celular (Maresca et al., 2022).

A erucina através da sua capacidade de alteração da conformação dos microtúbulos, parece ter potencial para ser usada como molécula ativa no tratamento de cancro renal. Tem sido relatada atividade de inibição de polimerização da tubulina, por vários isotiocianatos. Os isotiocianatos: sulforafano (SFN), isotiocianato de benilo (BITC), isotiocianato de feniletileto (PEITC) e o isotiocianato de atilo (AITC), são os IST's mais comuns naturalmente (Grzywa et al., 2023).

Segundo Grzywa et al., (2023), o BITC demonstrou ser o composto ativo com maior atividade inibitória da polimerização da tubulina a concentrações de 50 μM .

Sabe-se que a utilização de fármacos que atuam ao nível dos microtúbulos têm a capacidade de inibição da proliferação tumoral. Os mecanismos através dos quais estes atuam promovem a apoptose das células cancerígenas. Os agentes farmacológicos que atuam ao nível

dos microtúbulos podem ser classificados em agentes estabilizadores ou desestabilizadores dos microtúbulos (Grzywa et al., 2023).

O fármaco paclitaxel é um taxano. Foi usado como controle nos ensaios descritos anteriormente. É um fármaco que tem a capacidade de estabilizar os microtúbulos prevenindo assim a despolimerização. Influenciando a normal reorganização do citoesqueleto das células cancerígenas.

Os fármacos alcaloides da vinca atuam por despolimerização dos microtúbulos e por evitarem que os heterodímeros de tubulina formem polímeros. São exemplos destes: a vincristina, vinblastina e halicondrina.

Os fármacos paclitaxel e os alcaloides da vinca, anteriormente mencionados, são ainda atualmente dos mais utilizados na terapêutica farmacológica em patologias cancerígenas. Usados como terapêutica em cancro de mama e do ovário (Zhang & Kanakkanthara, 2020).

Contudo ao longo dos anos as resistências aos tratamentos têm sido cada vez mais notórias. Assim novas técnicas têm sido estudadas para ultrapassar este problema no tratamento clínico destas doenças oncológicas. Novos fármacos de origem natural, encontrados em plantas têm sido estudados como novas opções terapêuticas.

Estudos realizados por Zhang & Kanakkanthara (2020) indicam resultados promissores de atividade anticancerígena em comparação com os fármacos paclitaxel e alcaloides da vinca. A curcumina é um composto bioativos encontrado na *Curcuma longa*, e demonstrou ter atividade antiproliferativa, através da ligação direta à tubulina pela GTPases, inibindo assim a proliferação da tubulina.

Ensaio realizado por Iqbal et al., (2021) em murganhos, revelaram resultados promissores de diminuição da incidência de tumores renais, através da supressão da lesão renal. Assim tal como estes compostos bioativos tem atividade inibitória da polimerização da tubulina, também a erucina segundo os estudos que fizemos aparenta ter potencial para ser utilizado como fármaco promissor no tratamento do cancro nomeadamente o cancro renal (Zhang & Kanakkanthara, 2020).

As terapêuticas farmacológicas instituídas para tratamento do cancro, têm sido cada vez mais ineficazes, visto que os dados de multirresistência são cada vez mais elevados. Assim é importante pensar em alternativas a essas terapêuticas, mas também em alternativas que tornar as terapêuticas que já existem mais eficazes. Tentando minimizar as resistências cada vez mais comuns aos tratamentos.

Uma hipótese estudada é a utilização de nanopartículas. Os autores Barinda et al., (2020) estudaram a atividade da curcumina como potencial agente antitumoral. Contudo quando a curcumina é manipulada em nanopartículas os resultados de ação antitumoral demonstram ser ainda mais promissores. Observou-se aumento da concentração de curcumina no plasma e também o aumento da penetração da molécula no plasma (Liu et al., 2023).

Existe também evidência clínica de eficácia da curcumina no tratamento de cancro do ovário. Os autores Liu et al., (2023) estudaram a curcumina como potencial fármaco no tratamento do cancro no ovário. A utilização de nanotecnologia demonstrou aumento da biodisponibilidade de curcumina.

Outros bioativos estudados foram a quercetina, noscapina e as combrestatinas que evidenciaram ser portadores de propriedades anticancerígenas. Apresentando propriedades mais promissoras e eficazes que os taxanos e os alcaloides da vinca mais comumente usados no tratamento farmacológico de tumores (Zhang & Kanakkanthara, 2020).

Capítulo IV - Conclusão e Considerações Finais

Perante os resultados obtidos parece existir evidência de que a erucina apresenta potenciais propriedades anticancerígenas uma vez que esta parece atuar diretamente na polimerização dos microtúbulos, e consequentemente afetar todos os processos dependentes desse, como a migração/invasão e a proliferação celular.

O MTOC tem a função de organizar a polimerização da tubulina, função esta que parece estar comprometida a concentrações de 80 μM de erucina. Os microtúbulos sofrem alterações na presença de erucina, apresentando estrutura anormal o que altera a capacidade de migração de células tumorais. A sua polimerização parece ser diretamente afetada pela erucina.

O recurso à tecnologia de nanopartículas tem sido cada vez mais observado. Existe evidência de que é uma mais-valia no combate as multirresistências no tratamento do cancro.

Os autores Kaur et al., (2022) demonstraram nos seus ensaios que a utilização de paclitaxel em associação com erucina potencia o efeito terapêutico contra o cancro da mama. Esta associação foi formulada em nanoemulsão. Os resultados apresentados foram de que este tipo de formulação pode ser uma alternativa promissora para tratamento de cancro resistente ou como opção de formulação para outras combinações de fármacos.

Em estudos futuros seria de valor aprofundar a combinação da erucina com fármacos antitumorais. Assim como a sua formulação em nanopartículas.

A formulação de erucina em nanopartículas foi analisado em ensaios in vitro. Nomeadamente em nanopartículas cubossomais demonstrou-se eficaz segundo (Singh et al., 2023).

Assim uma potencial estratégia para melhorar a terapêutica com erucina, pode ser manipulação desta em nanopartículas como potencial tratamento do cancro renal. Estudos futuros sobre a utilização de erucina em nanopartículas é de grande importância para um futuro desenvolvimento de erucina como fármacos antitumoral renal ou desenvolvimento de derivados de erucina manipulados em nanopartículas.

A derivatização baseia-se na otimização de compostos bioativos naturais que não são clinicamente viáveis. Exemplo disso é a utilização do fármaco docetaxel, usado como antineoplásico no tratamento do cancro do ovário e da mama.

A alteração da estrutura da erucina, pode ser também uma estratégia para tornar esta molécula mais ativa e clinicamente viável para tratamento de cancro renal (M. Guo et al., 2022).

Assim, é possível concluir que, estudos futuros devem explorar outro mecanismo de ação antitumoral da erucina além da sua capacidade de inibição da proliferação celular ao nível do citoesqueleto.

Bibliografia

- Amiri, F., Zarnani, A.-H., Zand, H., Koohdani, F., Jeddi-Tehrani, M., & Vafa, M. (2013). Synergistic anti-proliferative effect of resveratrol and etoposide on human hepatocellular and colon cancer cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 718(1–3), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.020>
- Azarenko, O., Jordan, M. A., & Wilson, L. (2014a). Erucin, the Major Isothiocyanate in Arugula (*Eruca sativa*), Inhibits Proliferation of MCF7 Tumor Cells by Suppressing Microtubule Dynamics. *PLoS ONE*, 9(6), e100599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100599>
- Azarenko, O., Okouneva, T., Singletary, K. W., Jordan, M. A., & Wilson, L. (2008). Suppression of microtubule dynamic instability and turnover in MCF7 breast cancer cells by sulforaphane. *Carcinogenesis*, 29(12), 2360–2368. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn241>
- Bahadoram, S., Davoodi, M., Hassanzadeh, S., Bahadoram, M., Barahman, M., & Mafakher, L. (2022). Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. *Società Italiana Di Nefrologia*, 3(3), 1–16.
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelfa, A., Zhu, Z., & Koubaa, M. (2016). Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition*, 3, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00024>
- Barinda, A. J., Arozal, W., Sandhiutami, N. M. D., Louisa, M., Arfian, N., Sandora, N., & Yusuf, M. (2020). Curcumin Prevents Epithelial-to Mesenchymal Transition-Mediated Ovarian Cancer Progression through NRF2/ETBR/ET-1 Axis and Preserves Mitochondria Biogenesis in Kidney after Cisplatin Administration. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1–14. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.014>
- Bello, I., Smimmo, M., d’Emmanuele di Villa Bianca, R., Bucci, M., Cirino, G., Panza, E., & Brancaleone, V. (2023). Erucin, an H₂S-Releasing Isothiocyanate, Exerts Anticancer Effects in Human Triple-Negative Breast Cancer Cells Triggering Autophagy-Dependent Apoptotic Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6764), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms24076764>
- Capitanio, U., Bensalah, K., Bex, A., Boorjian, S. A., Bray, F., Coleman, J., Gore, J. L., Sun, M., Wood, C., & Russo, P. (2019). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology*, 75(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.036>

- Capitanio, U., & Montorsi, F. (2016). Renal cancer. *The Lancet*, 387(10021), 894–906. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00046-X)
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
- Chen, C.-C., Sureshbabul, M., Chen, H.-W., Lin, Y.-S., Lee, J.-Y., Hong, Q.-S., Yang, Y.-C., & Yu, S.-L. (2013). Curcumin Suppresses Metastasis via Sp-1, FAK Inhibition, and E-Cadherin Upregulation in Colorectal Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2013/541695>
- Chestnut, C., Subramaniam, D., Dandawate, P., Padhye, S., Taylor, J., Weir, S., & Anant, S. (2020). Targeting Major Signaling Pathways of Bladder Cancer with Phytochemicals: A Review. *Nutrition and Cancer*, 73, 1–24. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1856895>
- Choi, Y. E., & Park, E. (2015). Curcumin enhances poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor sensitivity to chemotherapy in breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1442–1447. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.07.015>
- Ci, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Lu, S., Cao, J., Li, H., Zhang, J., Huang, Z., Zhu, X., Gao, J., & Han, M. (2018). Myricetin suppresses breast cancer metastasis through down-regulating the activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2/9. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1373–1381. <https://doi.org/10.1002/ptr.6071>
- Ciszewski, W. M., Wawro, M. E., Sacewicz-Hofman, I., & Sobierajska, K. (2021). Cytoskeleton Reorganization in EndMT—The Role in Cancer and Fibrotic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms222111607>
- Corgna, E., Betti, M., Gatta, G., Roila, F., & De Mulder, P. H. M. (2007). Renal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 64(3), 247–262. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.04.007>
- Esmeeta, A., Adhikary, S., Dharshnaa, V., Swarnamughi, P., Ummul Maqsummiya, Z., Banerjee, A., Pathak, S., & Duttaroy, A. K. (2022). Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113384>
- Fife, C. M., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2014). Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5507–5523. <https://doi.org/10.1111/bph.12704>
- Ganesan, K., Du, B., & Chen, J. (2022). Effects and mechanisms of dietary bioactive

- compounds on breast cancer prevention. *Pharmacological Research*, 178, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105974>
- Grzywa, R., Psurski, M., Gajda, A., Gajda, T., & Janczewski, Ł. (2023). Isothiocyanates as Tubulin Polymerization Inhibitors—Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13674. <https://doi.org/10.3390/ijms241813674>
- Guerreiro, Í., Vidovic, B., Costa, J. G., Martins, M., Ferreira, S., Oliveira, N. G., Saraiva, N., & Fernandes, A. S. (2023). The Dietary Isothiocyanate Erucin Reduces Kidney Cell Motility by Disturbing Tubulin Polymerization. *Molecular Nutrition & Food Research*, 67(3), 1–10. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200581>
- Guo, M., Jin, J., Zhao, D., Rong, Z., Cao, L.-Q., Li, A.-H., Sun, X.-Y., Jia, L.-Y., Wang, Y.-D., Huang, L., Li, Y.-H., He, Z.-J., Li, L., Ma, R.-K., Lv, Y.-F., Shao, K.-K., & Cao, H.-L. (2022). Research Advances on Anti-Cancer Natural Products. *Frontiers in Oncology*, 12, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.866154>
- Guo, R. X., Fu, X., Chen, J., Zhou, L., & Chen, G. (2016). Preparation and Characterization of Microemulsions of Myricetin for Improving Its Antiproliferative and Antioxidative Activities and Oral Bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(32), 6286–6294. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02184>
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), 5–14. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9166-3>
- IARC, & OMS. (2024). *Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/en>
- Iqbal, M., Shah, M. D., Vun-Sang, S., Okazaki, Y., & Okada, S. (2021). The therapeutic potential of curcumin in alleviating N-diethylnitrosamine and iron nitrilotriacetate induced renal cell tumours in mice via inhibition of oxidative stress: Implications for cancer chemoprevention. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111636>
- Iyer, S. C., Gopal, A., & Halagowder, D. (2015). Myricetin induces apoptosis by inhibiting P21 activated kinase 1 (PAK1) signaling cascade in hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 407, 223–237. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2471-6>
- Kanwal, R. (2023). Metastasis in renal cell carcinoma: Biology and treatment. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 7(August 2022), 100094. <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2023.100094>
- Karumanchi, S. A., Merchan, J., & Sukhatme, V. P. (2002). Renal cancer: molecular

- mechanisms and newer therapeutic options. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 11(1), 37–42. <https://doi.org/10.1097/00041552-200201000-00006>
- Kaur, H., Kaur, K., Singh, A., Bedi, N., Singh, B., Alturki, M. S., Aldawsari, M. F., Almalki, A. H., Haque, S., Lee, H.-J., Yadav, D. K., & Arora, S. (2022). Frankincense oil-loaded nanoemulsion formulation of paclitaxel and erucin: A synergistic combination for ameliorating drug resistance in breast cancer: In vitro and in vivo study. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1020602>
- Kaur, R., Bhardwaj, A., & Gupta, S. (2023). Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. *Molecular Biology Reports*, 50(11), 9663–9676. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08809-3>
- Kenney, P. A., & Wood, C. G. (2012). Integration of Surgery and Systemic Therapy for Renal Cell Carcinoma. *Urologic Clinics of North America*, 39(2), 211–231. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2012.01.005>
- Klein, C. A. (2020). Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nature Reviews Cancer*, 20(11), 681–694. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00300-6>
- Linehan, W. M., Schmidt, L. S., Crooks, D. R., Wei, D., Srinivasan, R., Lang, M., & Ricketts, C. J. (2019). The Metabolic Basis of Kidney Cancer. *Cancer Discovery*, 9(8), 1006–1021. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1354>
- Liu, X., Qi, M., Li, X., Wang, J., & Wang, M. (2023). Curcumin: a natural organic component that plays a multi-faceted role in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 16(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01120-6>
- Lu, J., Papp, L. V., Fang, J., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., & Holmgren, A. (2006). Inhibition of Mammalian Thioredoxin Reductase by Some Flavonoids: Implications for Myricetin and Quercetin Anticancer Activity. *Cancer Research*, 66(8), 4410–4418. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3310>
- Maresca, D. C., Conte, L., Romano, B., Ianaro, A., & Ercolano, G. (2022). Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Erucin, a Diet-Derived H₂S Donor, on Human Melanoma Cells. *Antioxidants*, 12(1), 41. <https://doi.org/10.3390/antiox12010041>
- Melchini, A., & Traka, M. (2010). Biological Profile of Erucin: A New Promising Anticancer Agent from Cruciferous Vegetables. *Toxins*, 2(4), 593–612. <https://doi.org/10.3390/toxins2040593>
- Motzer, R. J., Jonasch, E., Agarwal, N., Alva, A., Baine, M., Beckermann, K., Carlo, M. I., Choueiri, T. K., Costello, B. A., Derweesh, I. H., Desai, A., Ged, Y., George, S., Gore, J.

- L., Haas, N., Hancock, S. L., Kapur, P., Kyriakopoulos, C., Lam, E. T., ... Motter, A. (2022). Kidney Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 20(1), 71–90. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.0001>
- Muglia, V. F., & Prando, A. (2015). Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia Brasileira*, 48(3), 166–174. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2013.1927>
- Nasir, A., Bullo, M. M. H., Ahmed, Z., Imtiaz, A., Yaqoob, E., Safdar, M., Ahmed, H., Afreen, A., & Yaqoob, S. (2020). Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(8), 1375–1387. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1571480>
- Ohshima, K., & Morii, E. (2021). Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Tumor Progression and Metastasis. *Metabolites*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.3390/metabo11010028>
- Pollard, T. D., & Goldman, R. D. (2018). Overview of the cytoskeleton from an evolutionary perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7), 1–7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030288>
- Porta, C., Cosmai, L., Leibovich, B. C., Powles, T., Gallieni, M., & Bex, A. (2019). The adjuvant treatment of kidney cancer: a multidisciplinary outlook. *Nature Reviews Nephrology*, 15(7), 423–433. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0131-x>
- Rodat-Despoix, L., Chamlali, M., & Ouadid-Ahidouch, H. (2021). Ion channels as key partners of cytoskeleton in cancer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1876(2), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188627>
- Schild, T., Low, V., Blenis, J., & Gomes, A. P. (2018). Unique Metabolic Adaptations Dictate Distal Organ-Specific Metastatic Colonization. *Cancer Cell*, 33(3), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.001>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Simões, M. S. (2014). *O Cancro* (Fundação Francisco Manuel dos Santos (ed.)).
- Singh, S., Singh, G., Attri, S., Kaur, P., Rashid, F., Bedi, N., Haque, S., Janahi, E. M., & Arora, S. (2023). Development and optimization of nanoparticles loaded with erucin, a dietary isothiocyanate isolated from *Eruca sativa*: Antioxidant and antiproliferative activities in ehrlich-ascites carcinoma cell line. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1–15.

- <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1080977>
- Soundararajan, P., & Kim, J. (2018). Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. *Molecules*, 23(11), 2983. <https://doi.org/10.3390/molecules23112983>
- Srivastava, R. K., Chen, Q., Siddiqui, I., Sarva, K., & Shankar, S. (2007). Linkage of Curcumin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21/WAF1/CIP1. *Cell Cycle*, 6(23), 2953–2961. <https://doi.org/10.4161/cc.6.23.4951>
- Subramaniam, S., Selvaduray, K. R., & Radhakrishnan, A. K. (2019). Bioactive Compounds: Natural Defense Against Cancer? *Biomolecules*, 9(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biom9120758>
- Sun, F., Zheng, X. Y., Ye, J., Wu, T. T., Wang, J. li, & Chen, W. (2012). Potential Anticancer Activity of Myricetin in Human T24 Bladder Cancer Cells Both In Vitro and In Vivo. *Nutrition and Cancer*, 64(4), 599–606. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.665564>
- Wang, E. J.-Y., Chen, I.-H., Kuo, B. Y.-T., Yu, C.-C., Lai, M.-T., Lin, J.-T., Lin, L. Y.-T., Chen, C.-M., Hwang, T., & Sheu, J. J.-C. (2022). Alterations of Cytoskeleton Networks in Cell Fate Determination and Cancer Development. *Biomolecules*, 12(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom12121862>
- Wei, X., Du, Z.-Y., Zheng, X., Cui, X.-X., Conney, A. H., & Zhang, K. (2012). Synthesis and evaluation of curcumin-related compounds for anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.005>
- Yar Saglam, A. S., Kayhan, H., Alp, E., & Onen, H. I. (2021). Resveratrol enhances the sensitivity of FL118 in triple-negative breast cancer cell lines via suppressing epithelial to mesenchymal transition. *Molecular Biology Reports*, 48(1), 475–489. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06078-y>
- Zhang, D., & Kanakkanthara, A. (2020). Beyond the Paclitaxel and Vinca Alkaloids: Next Generation of Plant-Derived Microtubule-Targeting Agents with Potential Anticancer Activity. *Cancers*, 12(7), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers12071721>