Revista Científica Brazilian Journal of HEALTH AND PHARMACY

CRFMG

Efeitos da combinação de nutracêuticos sobre a viabilidade celular, migração e apoptose em células humanas de câncer colorretal

Effects of combined nutraceuticals on cell viability, migration, and apoptosis in human colorectal cancer cells

Eduarda Pires; Isabelle Cristine Genari; Estéfani Maria Treviso; Caroline Andolfato Sanchez; Lusânia Maria Greggi Antunes*

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

***Autor correspondente:** Lusânia Maria Greggi Antunes (ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3079-4388).
E-mail: lusania@fcfrp.usp.br
Data de Submissão: 11/05/2026; Data do Aceite: 04/11/2026.

Citar:
PIRES, E.; GENARI, I.C.; TREVISO, E.M.; SANCHEZ, C.A.; ANTUNES, L.M.G. Efeitos da combinação de nutracêuticos sobre a viabilidade celular, migração e apoptose em células humanas de câncer colorretal. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy,** v. 8, e339, 2026. DOI: https://doi.org/10.68548/bjhp.v8i2026.339

RESUMO

O câncer colorretal (CCR), que compreende os cânceres de cólon e/ou reto, é o terceiro tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado. Devido à ocorrência de efeitos adversos e resistência a medicamentos na abordagem terapêutica, tratamentos mais efetivos para o CCR precisam ser desenvolvidos. Nutracêuticos regulam várias vias metabólicas e podem modular múltiplos biomarcadores em células tumorais. O presente estudo avaliou se o dissulfeto de dialila e o sulforafano, tanto isolados como combinados, foram citotóxicos para células humanas de câncer de cólon. Foram analisados os efeitos de dissulfeto de dialila (25-800 µM) e sulforafano (2-32 µM) sobre a viabilidade celular (ensaio de resazurina), migração celular (ensaio *wound healing*) e apoptose (citometria de fluxo) em células humanas de adenocarcinoma de cólon (Caco-2 e HT-29). Efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos foram determinados pelo método do *combination index* (CI). O tratamento com sulforafano isolado em altas concentrações reduziu a viabilidade celular e a migração celular em ambas as linhagens. A combinação de dissulfeto de dialila e sulforafano exerceu efeitos sinérgicos na redução da viabilidade celular nas células HT-29. Apenas os tratamentos com o sulforafano e a combinação dos nutracêuticos induziram a apoptose em células HT-29. A combinação de dissulfeto de dialila e sulforafano é uma estratégia pré-clínica promissora para a avaliação de novas terapias direcionadas ao CCR.

Palavras-chave: Citotoxicidade; proliferação; alho; brócolis; Caco-2; HT-29.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC), which comprises cancer of the colon and/or rectum, is the third most frequently diagnosed type of cancer. Due to the occurrence of adverse effects and drug resistance associated with current therapeutic approaches, more effective treatments for CRC need to be developed. Nutraceuticals regulate various metabolic pathways and can modulate multiple biomarkers in tumor cells. This study evaluated whether diallyl disulfide and sulforaphane, either alone or in combination, were cytotoxic to human colon cancer cells. The effects of diallyl disulfide (25–800 µM) and sulforaphane (2–32 µM) on cell viability (resazurin assay), cell migration (wound healing assay), and apoptosis (flow cytometry) were analyzed in human colon adenocarcinoma cell lines (Caco-2 and HT-29). Synergistic, additive, and antagonistic effects were determined

using the combination index (CI) method. Treatment with sulforaphane alone at high concentrations reduced cell viability and migration in both cell lines. The diallyl disulfide and sulforaphane combination exerted synergistic effects in reducing cell viability in HT-29 cells. Only treatments with sulforaphane and the nutraceuticals combination induced apoptosis in HT-29 cells. The diallyl disulfide and sulforaphane combination represents a promising preclinical strategy for evaluating new targeted therapies for CRC.

Keywords: Cytotoxicity; proliferation; garlic; broccoli; Caco-2; HT-29.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR), que abrange o câncer de cólon e/ou reto, constitui um problema de saúde global, sendo o terceiro tipo de câncer com maior incidência no mundo e classificado como o segundo mais letal (WHO, 2026). Considerando o aumento substancial de casos entre indivíduos idosos, projeta-se que a incidência global de CCR mais do que dobrará até 2035, com os maiores aumentos ocorrendo em países em desenvolvimento (Hossain et al., 2022). Além disso, o aumento nos registros de pessoas com menos de 50 anos portadoras de CCR tornou-se uma preocupação emergente (Kyrochristou et al., 2025).

Inovações recentes na biologia molecular e na genética do câncer aprimoraram nossa compreensão da patogênese do CCR, tanto em suas formas esporádicas quanto hereditárias. O uso de métodos mais avançados de biologia molecular para análise do genoma possibilita a identificação de diversas alterações genéticas e epigenéticas envolvidas no desenvolvimento do CCR (Mancuso et al., 2025).

Atualmente, o desenvolvimento do CCR está associado a fatores de risco classificados como não modificáveis ou modificáveis. A categoria de fatores não modificáveis inclui o histórico médico do paciente, sexo, idade, etnia e doenças intestinais preexistentes, como pólipos adenomatosos e doença inflamatória intestinal (Roshandel et al., 2024). Os fatores modificáveis estão relacionados aos hábitos ou estilos de vida dos indivíduos, como obesidade, sedentarismo, alcoolismo, tabagismo e consumo excessivo de alimentos processados (Hossain et al., 2022). Avanços na compreensão da fisiopatologia do CCR contribuíram para a diversificação das opções terapêuticas, que incluem cirurgia, radioterapia, imunoterapia, quimioterapia paliativa e terapias ablativas locais para metástases. No entanto, o CCR permanece como a segunda principal causa de morte por câncer no mundo, devido à escassez de programas de rastreamento e estratégias terapêuticas, bem como às taxas de incidência crescentes (Siegel et al, 2026). Recentemente, ocorreu um aumento no número de pesquisas relatando os efeitos de produtos naturais que podem atuar como agentes quimioterápicos alternativos no tratamento do CCR, devido à sua baixa toxicidade e aos seus múltiplos mecanismos de ação (Elham et al., 2022; Sitholumusa et al., 2026).

Nutracêuticos são compostos bioativos naturalmente presentes em alimentos, possuindo potencial preventivo e terapêutico contra diversas doenças. Compostos dessa classe responsáveis por prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal (CCR), bem como seus possíveis mecanismos de ação, têm sido extensivamente investigados - inclusive em ensaios clínicos registrados na plataforma ClinicalTrials.gov -, sendo que vários compostos encontrados em frutas, vegetais e condimentos demonstraram potencial quimiopreventivo contra o CCR, a exemplo da curcumina, do resveratrol, da quercetina e do licopeno (ClinicalTrials.gov, 2024; Hossain et al., 2022; Kelemoglu et al., 2026). Os resultados mais promissores quanto à bioatividade desses nutracêuticos em ensaios *in*

vitro requerem análises mais aprofundadas antes da realização dos testes clínicos (McAlpine et al., 2024). Estratégias que combinam nutracêuticos administrados simultaneamente permitem atingir múltiplos alvos na célula tumoral, atuando em diferentes mecanismos moleculares para reduzir o desenvolvimento e a resistência dos tumores (Redondo-Blanco et al., 2017).

O consumo de alho tem sido associado a inúmeros benefícios à saúde, atribuídos a diversos compostos, como a alicina, o ajoeno e o dissulfeto de dialila (DADS) (Verma et al., 2023). O DADS é capaz de modular o ciclo celular e induzir a apoptose em células tumorais humanas de cólon, fígado, pulmão e próstata, apresentando atividade antitumoral em diferentes estudos *in vitro* e pré-clínicos (Liu et al., 2026). Além disso, uma revisão da literatura sobre as atividades biológicas do DADS aponta efeitos antimicrobianos, neuroprotetores, anti-inflamatórios e antitumorais (He et al., 2021). Estudos recentes sugerem a modulação de vias de sinalização em células tumorais pelo DADS; contudo, os autores concluíram que são necessárias mais investigações para identificar os alvos moleculares de nutracêuticos derivados do alho (Mondal et al., 2022). O sulforafano (SFN) é uma substância presente em vegetais crucíferos, como brócolis, couve-flor, couve e repolho, sendo amplamente conhecido em pesquisas sobre câncer por seus efeitos anticarcinogênicos, antiproliferativos, pró-apoptóticos e antimetastáticos (Jang et al., 2026; Wang et al., 2024). Santana-Gálvez et al. (2020) analisaram os efeitos dos nutracêuticos curcumina, SFN e ácido di-hidrocafeico, em diferentes combinações, em células de câncer de cólon humano, e observaram efeitos sinérgicos na indução de citotoxicidade com a combinação dos nutracêuticos. Os resultados da exposição à combinação de nutracêuticos (SFN e licopeno, quercetina e curcumina) em células de câncer de cólon humano revelaram efeitos aditivos na ação antiproliferativa dos compostos, quando comparados aos resultados individuais (Langner; Lemieszek; Rzeski, 2019). Os efeitos da combinação de SFN e vitamina D também foram investigados no contexto da remodelação da cromatina e efeitos epigenéticos (Hossain; Liu; Wood, 2021).

Atualmente, não há dados na literatura sobre os possíveis efeitos da exposição combinada a DADS e SFN em células de câncer de cólon humano (Caco-2 ou HT-29). Nesse contexto, o presente estudo investigou se o DADS, isoladamente ou em combinação com o SFN, produz efeitos sinérgicos na indução de citotoxicidade, na inibição da migração celular e no aumento da apoptose em células Caco-2 e HT-29.

MÉTODOS

Condições de tratamento

As linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal humano Caco-2 (Código BCRJ: 0059) e HT-29 (Código BCRJ: 0111) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). As células foram manipuladas em uma cabine de fluxo laminar Classe II tipo A1 (Veco, Campinas, Brasil) e mantidas em uma incubadora de CO_2 Forma Series II Water Jacket (Thermo Fisher Scientific — Waltham, MA, EUA) a 37 °C, sob 5% de CO_2 e 95% de umidade. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com baixo teor de glicose, suplementado com 20% (Caco-2) ou 10% (HT-29) de soro fetal bovino (SFB) e 1% de mistura de antibióticos (penicilina/estreptomicina/neomicina). O DMEM, a mistura de antibióticos e o SFB foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Todos os procedimentos de cultura seguiram as recomendações propostas por Bal-Price e Coecke (2011). Todos os experimentos foram realizados com células entre a 3ª e a 8ª passagem celular.

Células confluentes foram tratadas com DADS (CAS 2179-57-9) em concentrações de 25 a 800 µM ou com SFN (CAS 4478-93-7) em concentrações de 2 a

32 µM, isoladamente ou em combinação, por 24 ou 48 horas. Ambos os nutracêuticos foram adicionados simultaneamente no tratamento combinado. O meio completo foi utilizado como controle negativo, 0,25% de dimetilsulfóxido (DMSO; CAS 67-68-5) foi usado como controle do solvente e 600 µM de metanossulfonato de metila (MMS; CAS 66-27-3) como controle positivo. DADS, SFN, DMSO e MMS foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

Ensaio de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de redução da resazurina foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Page, Page e Noel (1993). A resazurina (CAS 62758-13-8) foi obtida da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Resumidamente, células Caco-2 e HT-29 (1 x 10^4 células/poço) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (Greiner BioOne; Kremsmünster, Áustria) e incubadas por 24 h antes do tratamento com diferentes concentrações de DADS e SFN por mais 48 h após os tratamentos. Após esse período, 15 µL de solução de trabalho de resazurina (0,15 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C, e a fluorescência foi analisada em um leitor de placas Synergy™ HTX (BioTek; Agilent Technologies, CA, EUA) com excitação em 530 nm e emissão em 590 nm. A intensidade de fluorescência foi utilizada para determinar a viabilidade celular, comparando-se os grupos de tratamento com o controle negativo, ao qual foi atribuído o valor de 100% de viabilidade celular.

Ensaio de migração celular

As células Caco-2 e HT-29 (1 x 10^4 células/poço) foram cultivadas até atingirem 90% de confluência em uma placa de 24 poços. Posteriormente, realizou-se uma cicatriz (ou "scratch") na monocamada de células aderentes utilizando uma ponteira estéril (Liang; Park; Guan, 2007). Imagens da lesão foram obtidas com uma câmera acoplada a um microscópio invertido (Zeiss-Primovert, Zeiss, Oberkochen, Alemanha), nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas de incubação. O método consistiu em calcular a variação da área da cicatriz ao longo do tempo como porcentagem de fechamento da lesão — o que reflete a migração celular — utilizando o software ImageJ versão 1.53i (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e a seguinte equação: migração celular (%) = [(AT 0 h - AT 24 h) / (AT 0 h)] × 100, em que AT representa a área total.

Ensaio de detecção de apoptose

A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando o kit Dead Cell Apoptosis Kit (número de catálogo V13242) com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (IP), seguindo as instruções do fabricante. Células Caco-2 ou HT-29 (1 x 10^5 células/poço) foram semeadas em placas de seis poços e incubadas a 37 °C sob 5% de CO_2 por 24 h. As células foram tratadas com DADS (400 µM), SFN (32 µM) ou a combinação de ambos por 24 h. A doxorrubicina (CAS 25316-40-9, Sigma-Aldrich, Brasil) na concentração de 2 µM foi utilizada como controle positivo. As células foram incubadas com Anexina V-FITC por 15 minutos, misturadas com IP (2 µg/mL) e analisadas imediatamente, contabilizando-se 10.000 eventos por amostra. A excitação em 488 nm e a emissão em 530/575 nm (ou equivalente) foram medidas em um citômetro de fluxo BD LSR Fortessa® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A quantificação de células apoptóticas e necróticas foi realizada em triplicata biológica.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de amostras em triplicata provenientes de três experimentos biológicos independentes. Os dados de experimentos individuais foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e comparados por meio de análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de comparações múltiplas de Tukey. Os dados de tratamentos combinados foram

analisados utilizando ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo que letras diferentes indicam diferença significativa dentro do mesmo grupo. Para validar o controle positivo, os dados dos controles positivo e negativo foram comparados utilizando o teste t de Student ($p < 0,05$). Todos os dados foram analisados com o software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, EUA). Os valores do *combination index* (CI) — indicativos de sinergia (CI < 1), aditividade (CI = 1) ou antagonismo (CI > 1) — foram calculados utilizando o software Compusyn (versão 1.0).

RESULTADOS

A citotoxicidade do DADS (25 – 800 µM) e do SFN (2 – 32 µM) foram avaliadas após 48 horas de incubação nas linhagens celulares Caco-2 e HT-29, utilizando o ensaio de resazurina. Conforme ilustrado na Figura 1A, o DADS nas concentrações de 400 e 800 µM reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$). O ensaio de resazurina revelou uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular com SFN nas concentrações de 16 e 32 µM em células Caco-2 (Figura 1B). A exposição ao DADS não reduziu a viabilidade das células HT-29 em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 1C). O ensaio de resazurina demonstrou que o SFN reduziu a viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas na linhagem HT-29 (Figura 1D).

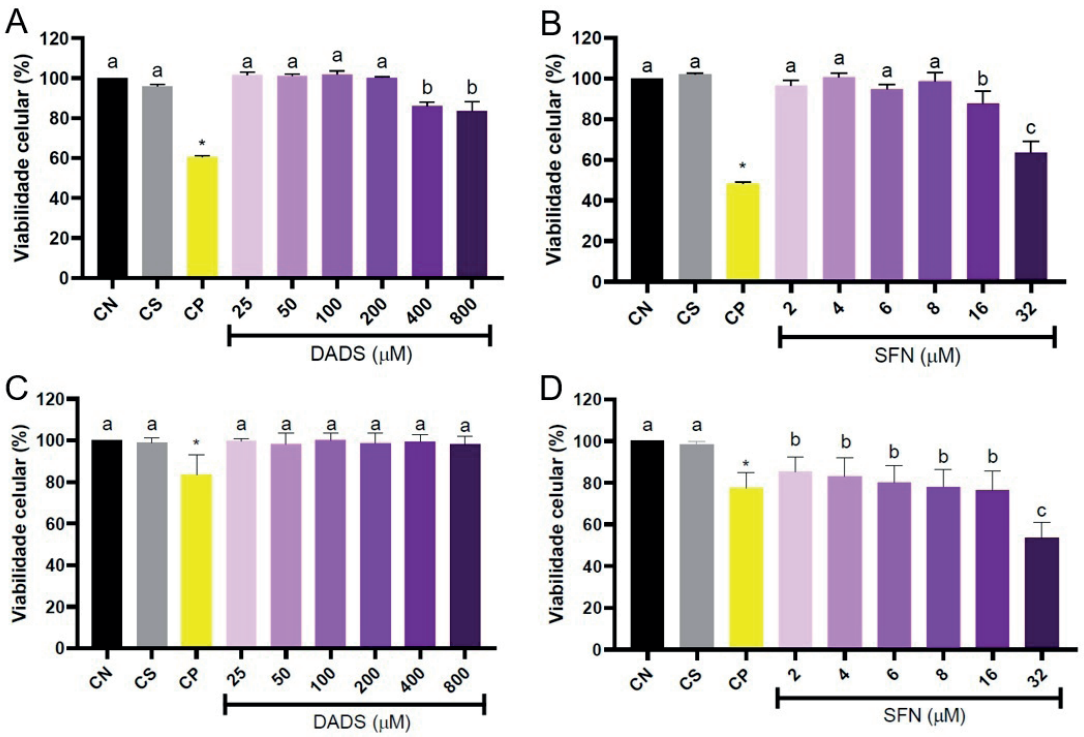


Figura 1. Porcentagens de viabilidade de células Caco-2 (A-B) e HT-29 (C-D) tratadas com dissulfeto de dialila (DADS 25 – 800 µM) ou sulforafano (SFN 2 – 32 µM) por 48 h, avaliadas pelo ensaio da resazurina.

CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle do solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS 600 µM). Média ± desvio padrão (n = 3). Médias que não diferem entre si compartilham a mesma letra (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). * Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

Haja vista que apenas o SFN demonstrou redução na viabilidade das células HT-29 na avaliação dos tratamentos simultâneos combinando os nutracêuticos, foram selecionadas duas concentrações de SFN — uma com baixa citotoxicidade (16 µM) e outra com alta citotoxicidade (32 µM) — para serem combinadas com três concentrações de DADS (100, 200 ou 400 µM). A combinação de SFN 16 µM + DADS 100 µM exerceu efeitos sinérgicos sobre a viabilidade celular nas células Caco-2 (Figura 2A), com valores de CI < 1 (Tabela I). Os efeitos do SFN a 16 µM combinado com concentrações de DADS de 200 ou 400 µM foram equivalentes aos do tratamento com SFN isolado, apresentando valores de CI próximos a 1 (Tabela I). Na combinação de SFN 32 µM com DADS (200 ou 400 µM), foram encontrados resultados antagônicos quanto à redução da viabilidade celular (Figura 2B).

Resultados antagônicos foram obtidos com as combinações de SFN 16 µM + DADS (200 ou 400 µM) em relação à viabilidade celular nas células HT-29 (Figura 2C). Em contrapartida, nas células HT-29 foram obtidos resultados sinérgicos na redução da viabilidade celular com a combinação de SFN 32 µM + DADS 200 ou 400 µM (Figura 2D). A Tabela 1 apresenta os resultados do CI para os tratamentos combinados de SFN e DADS nas células Caco-2 e HT-29.

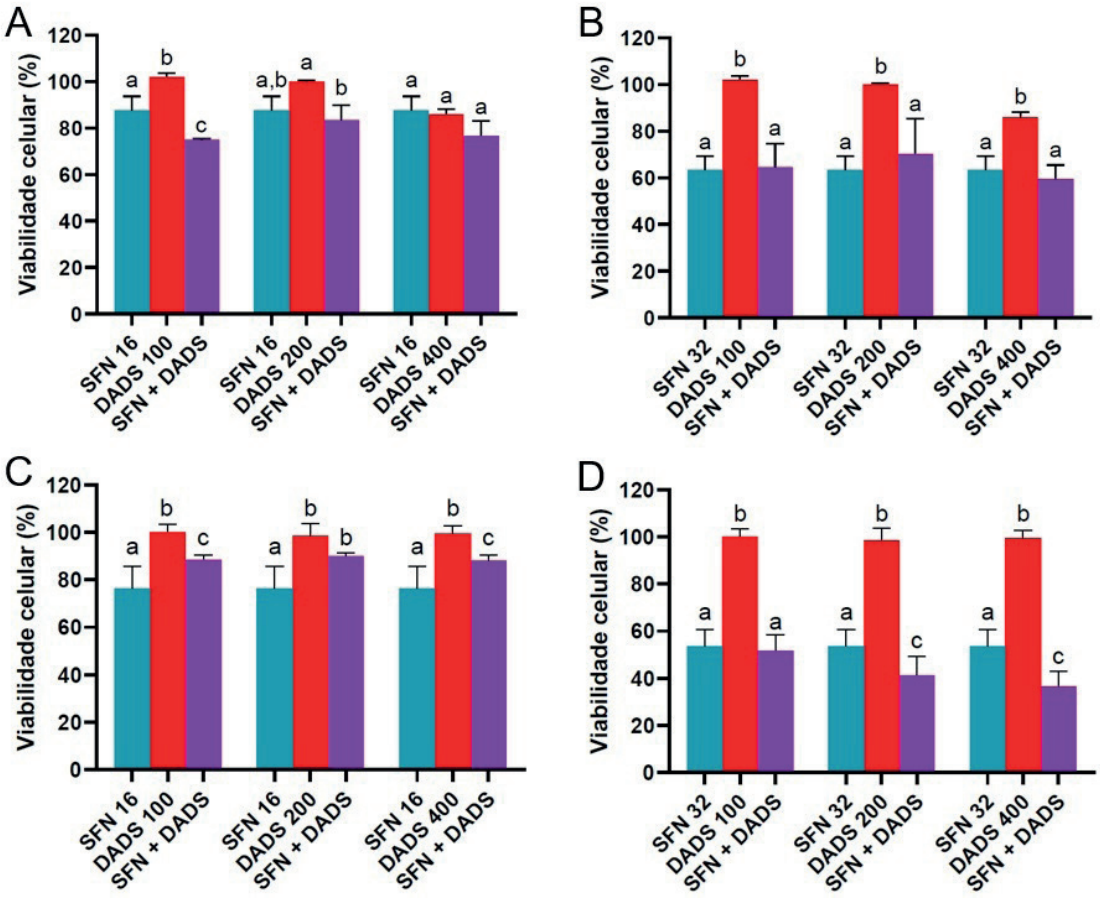


Figura 2. Porcentagens de viabilidade celular de células Caco-2 (A-B) e HT-29 (C-D) tratadas com dissulfeto de dialila (DADS 100 – 400 µM) em combinação com sulforafano (16 µM ou 32 µM) por 48 h, avaliadas pelo ensaio da resazurina.

Média ± desvio padrão (n = 3). Médias que não diferem entre si compartilham a mesma letra (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 1: Valores de CI calculados para as células Caco-2 e HT-29

Caco-2			
	DADS 100 µM	**DADS 200 µM**	**DADS 400 µM**
SFN 16 µM	0,8946	1,2691	1,5084
SFN 32 µM	1,2001	1,5447	1,6366
HT-29			
	DADS 100 µM	**DADS 200 µM**	**DADS 400 µM**
SFN 16 µM	1,7069	1,8679	1,6605
SFN 32 µM	0,9462	0,7556	0,6318

Valores de *combination index* (CI) em células Caco-2 e HT-29, calculados a partir dos resultados de viabilidade celular obtidos nos ensaios com tratamento combinado de dissulfeto de dialila (DADS 100, 200 ou 400 µM) e sulforafano (SFN 16 ou 32 µM) por 48 horas.
CI < 1 indica sinergismo (valores destacados em tons de vermelho); CI = 1 indica efeito aditivo; CI > 1 indica antagonismo (valores destacados em tons de azul). O *software* CompuSyn (versão 1.0) foi utilizado para o cálculo.

Além dos efeitos citotóxicos do DADS e do SFN, isolados ou combinados, nas células Caco-2 e HT-29, é desejável que os nutracêuticos também reduzam a capacidade de migração das células tumorais. Portanto, examinamos o potencial da combinação de DADS e SFN em bloquear a migração de linhagens celulares de câncer colorretal (CCR) humano. O impacto do DADS (400 µM) ou do SFN (32 µM), isolados ou em combinação, na migração celular foi avaliado pela porcentagem do fechamento da cicatriz nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas, em comparação com o controle negativo.

Os resultados da Figura 3 mostraram que o fechamento da cicatriz das células Caco-2 foi suprimido pela combinação de SFN 32 µM + DADS 400 µM após 24 h de exposição, em comparação com o controle negativo (Figura 3B). Após 24 h, a porcentagem de fechamento da cicatriz na monocamada de células HT-29 expostas apenas ao SFN foi de aproximadamente 4%, em comparação com 15% no controle negativo (Figura 3C-D). O tratamento combinado suprimiu a migração das células HT-29 em um grau semelhante ao do SFN isolado.

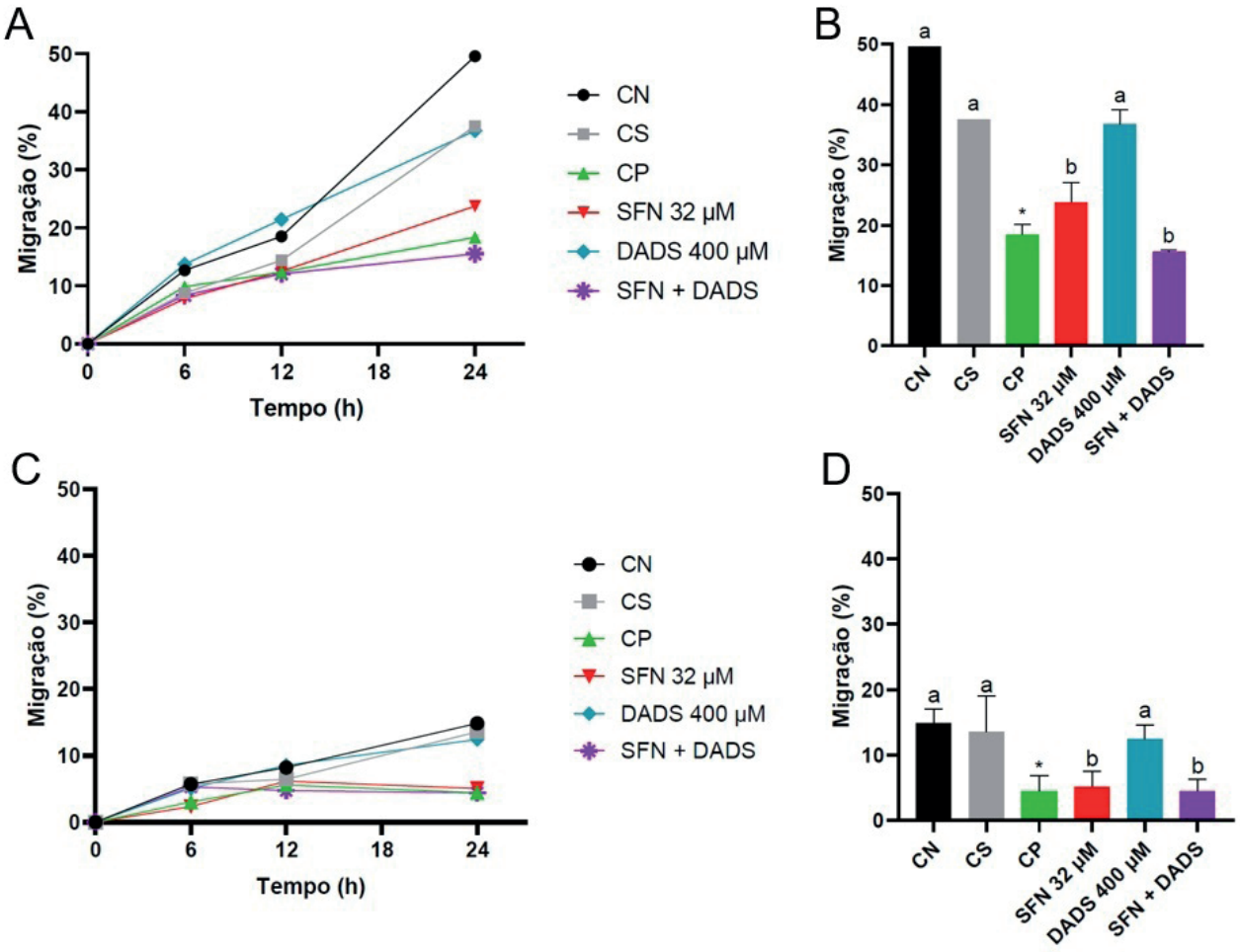


Figura 3. Inibição da migração de células Caco-2 (A-B) e HT-29 (C-D) após tratamento com dissulfeto de dialila (DADS 400 µM) e sulforafano (SFN 32 µM), isoladamente e em combinação, por 6, 12 e 24 h.

CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle do solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (MMS 600 µM). Média ± desvio padrão (n = 3). Médias que não diferem entre si compartilham a mesma letra (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). * Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

Também foram avaliados os efeitos de SFN (32 µM) e DADS (400 µM), isolados ou em combinação, sobre a indução de apoptose após 24 h de tratamento. Os nutracêuticos não foram capazes de induzir apoptose ou necrose em células Caco-2 (Figura 4A-C). Após 24 h, o SFN induziu apoptose em células HT-29, enquanto o DADS não induziu apoptose ou necrose (Figura 5A-C). Os resultados da combinação não diferiram estatisticamente daqueles obtidos com SFN isolado.

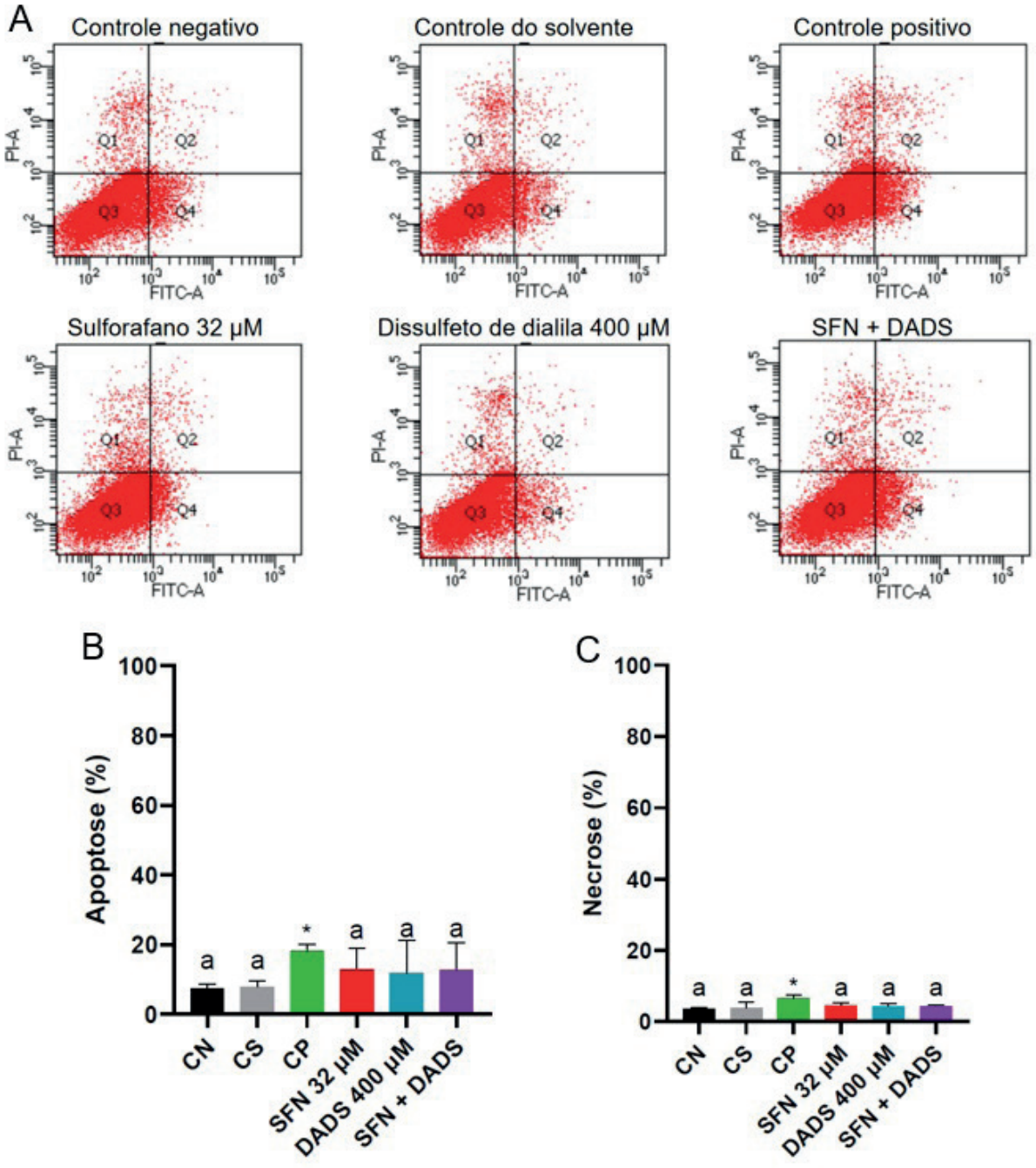


Figura 4. Imagens representativas dos resultados de citometria de fluxo (A) com marcação das células Caco-2 por anexina (FITC) e iodeto de propídio (PI).

Células viáveis (Q3): duplo-negativas para anexina e PI. Células apoptóticas (Q2 + Q4): positivas para anexina e negativas/positivas para PI. Porcentagem de apoptose (B) ou necrose (C) em células Caco-2 após tratamento com dissulfeto de dialila (DADS 400 µM) e sulforafano (SFN 32 µM), isoladamente e em combinação, por 24 h. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle do solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (doxorrubicina 2 µM). Média ± desvio padrão (n = 3). Médias que não diferem entre si compartilham a mesma letra (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). * Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

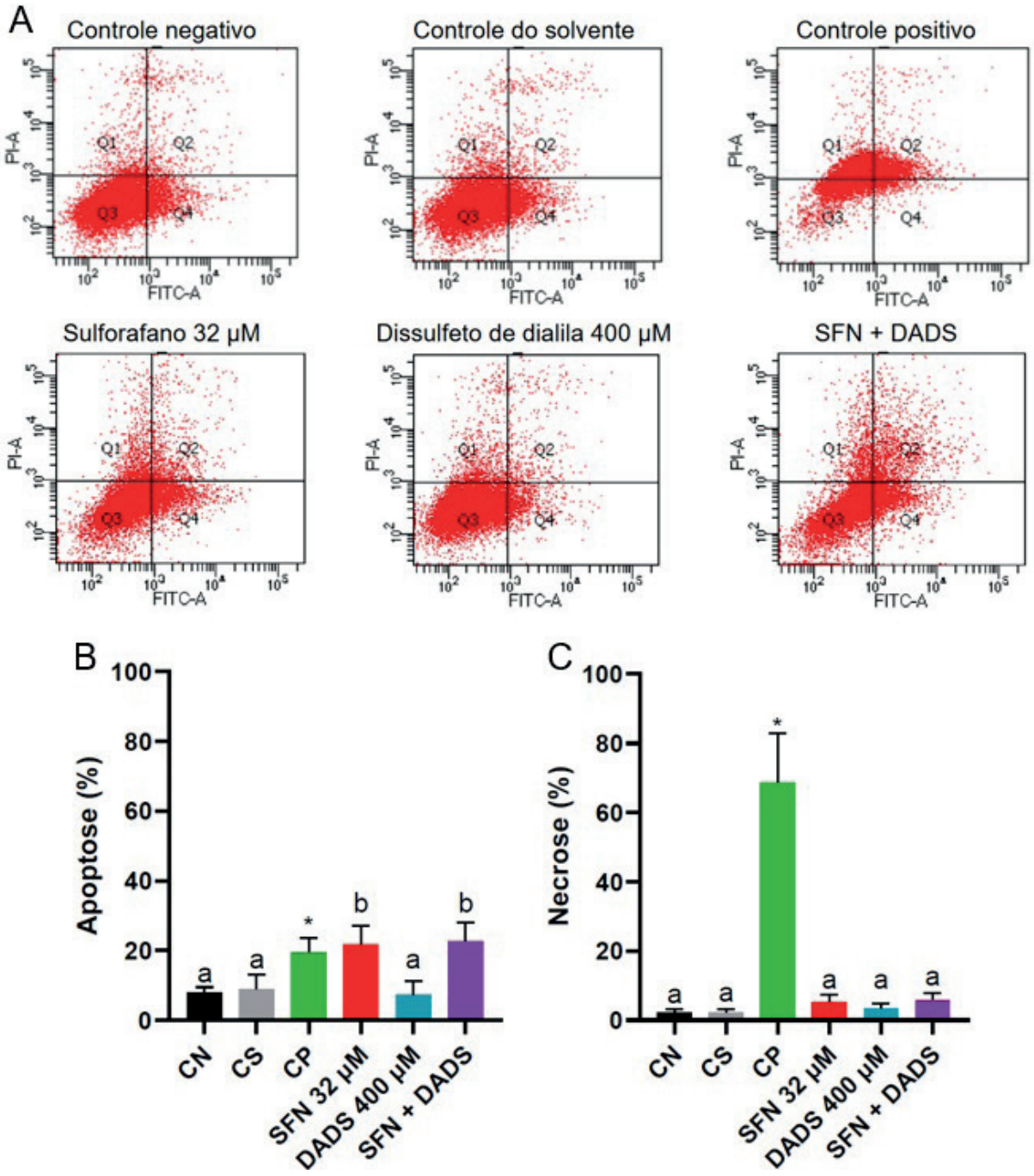


Figura 5. Imagens representativas dos resultados de citometria de fluxo (A) com marcação das células HT-29 por anexina (FITC) e iodeto de propídio (PI).

Células viáveis (Q3): duplo-negativas para anexina e PI. Células apoptóticas (Q2 + Q4): positivas para anexina e negativas/positivas para PI. Porcentagem de apoptose (B) ou necrose (C) em células HT-29 após tratamento com dissulfeto de dialila (DADS 400 µM) e sulforafano (SFN 32 µM), isoladamente e em combinação, por 24 h. CN: controle negativo (meio de cultura); CS: controle do solvente (DMSO 0,25%); CP: controle positivo (doxorrubicina 2 µM). Média ± desvio padrão (n = 3). Médias que não diferem entre si compartilham a mesma letra (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). * Diferente do controle negativo (teste t de Student, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Para a pesquisa em câncer, um sistema *in vitro* adequado deve reproduzir, da forma mais fiel possível, o ambiente presente em um organismo vivo. Existe uma variedade de opções de modelos *in vitro* para o epitélio intestinal. São conhecidas mais de 70 linhagens celulares de câncer colorretal (CCR), sendo as mais utilizadas em pesquisas: Caco-2, HCT116, SW480, SW620, HT115, COLO205, COLO320 e HT-29 (Mouradov et al., 2014). As linhagens celulares Caco-2 e HT-29, derivadas de tumores colorretais, são ferramentas valiosas para o estudo da diferenciação e função celular, bem como para diversas áreas como nutrição, farmacologia, toxicologia e pesquisa em câncer (Cizkova et al., 2020).

A viabilidade celular, a migração celular e a indução de apoptose são parâmetros importantes em estudos que investigam efeitos biológicos em modelos *in vitro*. Por exemplo, ensaios como testes colorimétricos, marcação com Anexina V e ensaios de viabilidade celular (Live/Dead) são comumente utilizados para avaliar a citotoxicidade. O ensaio de fechamento da cicatriz (*wound healing*) é empregado em diversos estudos que examinaram a polarização e a migração celular, além de outras atividades relacionadas a diferentes tipos de linhagens celulares aderentes (Yang et al., 2024). Neste estudo, optou-se pela utilização combinada e simultânea dos nutracêuticos DADS e SFN em células Caco-2 e HT-29, durante um período de 24 ou 48 horas. O tempo de tratamento baseou-se em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que verificaram resultados positivos quanto à promoção de citotoxicidade — desencadeando a produção de espécies reativas de oxigênio, a indução de autofagia e danos ao DNA — após o tratamento simultâneo de linhagens humanas de câncer de adenocarcinoma prostático metastático (PC-3 e DU145) com SFN e vitamina D (Tuttis et al., 2023). Além disso, uma revisão da literatura sobre o DADS em sistemas *in vitro* indicou que, em linhagens celulares de câncer de cólon (SW480, HCT-116 e Caco-2), a exposição por 48 horas à diferentes concentrações de DADS resultou em apoptose, redução da migração celular e diminuição da proliferação (Mitra et al., 2022). Assim, um período de tratamento de 48 horas foi selecionado para os tratamentos com DADS e SFN isolados, a fim de avaliar a viabilidade celular.

A seleção das concentrações de nutracêuticos deve levar em conta a sua biodisponibilidade, visto que a administração oral em humanos constitui um fator limitante que define as concentrações plasmáticas fisiológicas máximas encontradas para cada composto. Assim, foram selecionadas as concentrações de 25 a 800 µM para o DADS e de 2 a 32 µM para o SFN, com base em dados da literatura que determinaram as concentrações plasmáticas máximas desses compostos e em dados anteriores que revelaram citotoxicidade nas concentrações testadas (Dos Santos et al., 2020; Machado et al., 2022; Tuttis et al., 2023).

Neste estudo, em células Caco-2, o DADS isolado nas concentrações de 400 e 800 µM reduziu significativamente a viabilidade celular, enquanto o SFN isolado diminuiu significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 16 e 32 µM. A exposição das células Caco-2 ao SFN (16 ou 32 µM) na presença de DADS não induziu uma redução maior da viabilidade celular em comparação com o SFN isolado. O DADS não induziu citotoxicidade nas células HT-29. Todas as concentrações de SFN testadas foram citotóxicas para as células HT-29. O SFN na concentração de 32 µM foi o mais eficaz na redução da viabilidade celular tanto nas células Caco-2 quanto nas HT-29.

Os cálculos do *combination index* (CI) revelaram a ocorrência de efeitos sinérgicos nos tratamentos combinados de SFN 16 µM + DADS 100 µM em células Caco-2 e de SFN 32 µM + DADS 200 ou 400 µM em células HT-29. Com base nos resultados e na revisão da literatura, fica evidente que a resposta aos tratamentos com DADS ou SFN varia de acordo com a

linhagem celular, a duração do tratamento e o teste de viabilidade celular utilizado.

Altonsy et al. (2013) investigaram os mecanismos de indução de apoptose pelo DADS em células Caco-2. Os tratamentos foram realizados durante 24 horas com 200 µM do nutracêutico. Na análise de citotoxicidade pelo método do azul de tripan, os autores encontraram morte celular em aproximadamente 25% das células, em comparação com o controle negativo. Além disso, o tratamento com DADS por 48 horas, na mesma concentração, provocou alterações morfológicas características da apoptose, como retração e fragmentação nuclear. Adicionalmente, por meio de *western blot*, citometria de fluxo e RT-PCR, os autores demonstraram que o DADS induziu a expressão do receptor de membrana FAS, o qual está relacionado à ativação da cascata de apoptose. Os resultados sugeriram que o DADS modulou a proliferação celular e induziu a morte celular não apenas por mecanismos intrínsecos, mas também extrínsecos.

Em células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), tratadas por 48 h com concentrações de DADS entre 100 e 800 µM, foi observado redução significativa na viabilidade celular a partir de 100 µM no ensaio Live/Dead, com a IC50 calculada em 340 µM. Para células HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana), que são células não tumorais, o DADS reduziu significativamente a viabilidade celular na concentração de 400 µM (Machado et al., 2022). Isso demonstra que os efeitos antitumorais do DADS podem ser influenciados pelo tipo de linhagem celular.

Nas células Caco-2 e HT-29, foram testadas mesmas concentrações de SFN avaliadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa utilizando HepG2 (Dos Santos et al., 2020) e uma linhagem celular humana não tumoral de mucosa gástrica, a MNP01 (Santos et al., 2020). Em ambas as linhagens, concentrações de SFN acima de 8 µM reduziram a viabilidade celular em tratamentos de 24 h. Em outro trabalho, o ensaio de viabilidade celular utilizado foi o MST, e o valor de IC50 para as células Caco-2 expostas ao SFN por 24 h foi de 41,3 µM (Santana-Gálvez et al., 2020), uma concentração de SFN não fisiológica em humanos. Neste estudo, foi possível calcular a IC50 para o SFN apenas nas células Caco-2 e HT-29, sendo os valores de 31,91 e 34,1 µM, respectivamente. Desta forma, as duas concentrações mais altas de SFN foram selecionadas para testes de viabilidade celular em combinação com três concentrações de DADS, levando-se em conta também valores fisiológicos para essa escolha.

Os pesquisadores ressaltaram a necessidade de identificar os efeitos de nutracêuticos, isolados ou combinados, em estudos *in vitro*. Essas respostas parecem depender das características genéticas e epigenéticas de cada linhagem celular, tumoral ou não tumoral (Gano et al., 2023). Isso pode esclarecer por que as respostas individuais a intervenções dietéticas variam significativamente entre pacientes com câncer, sendo aconselhável considerar sempre concentrações fisiologicamente relevantes, como no presente estudo. Santana-Galvez et al. (2020) avaliaram os potenciais efeitos sinérgicos de combinações envolvendo os nutracêuticos SFN, curcumina e ácido di-hidrocafeico em células Caco-2 e HT-29. Foram observadas citotoxicidade e efeitos sinérgicos em algumas combinações, como a de SFN com ácido di-hidrocafeico. Nos tratamentos combinados, no presente estudo encontramos resultados estatisticamente significativos tanto nas células Caco-2 quanto nas HT-29 com a combinação de duas concentrações de SFN e três concentrações de DADS, com redução na viabilidade celular nas concentrações mais altas dos nutracêuticos.

Os resultados do presente estudo destacam a importância das características moleculares e fenotípicas distintas de cada linhagem tumoral na investigação de novas estratégias terapêuticas. A redução da viabilidade celular para DADS e SFN diferiram entre as células Caco-2 e HT-29; as

células HT-29 apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos combinados e uma redução mais acentuada na viabilidade em comparação com o controle negativo. Um estudo realizado com 34 linhagens celulares de CCR, com análises multiômicas conduzido por Berg et al. (2017), foram identificados subgrupos moleculares consistentes com base na instabilidade genômica, em dados de sequenciamento e na expressão diferencial de mRNA, miRNA e níveis proteicos. Dois grupos distintos foram observados: linhagens celulares com fenótipo semelhante ao do cólon, caracterizadas pela expressão de marcadores de diferenciação gastrintestinal, e linhagens celulares indiferenciadas, caracterizadas pela regulação positiva de fatores associados à transição epitélio-mesenquimal. As células HT-29 foram classificadas como semelhantes ao cólon, enquanto as células Caco-2 foram categorizadas como indiferenciadas. Essas características moleculares e fenotípicas entre as linhagens Caco-2 e HT-29 podem justificar os efeitos biológicos encontrados nos ensaios de viabilidade, migração celular e apoptose.

Considerando as diferenças entre as linhagens Caco-2 e HT-29, Medico et al. (2015) descreveram que as células Caco-2 originam-se da porção inferior da cripta do cólon, enquanto as células HT-29 provêm da região do cálice da cripta do cólon. Além da localização, as células também diferem quanto à classificação de subtipo. Os mesmos autores classificaram as linhagens em seis subtipos, com base em características clínicas e na expressão gênica, sendo as células Caco-2 classificadas no subtipo B e as células HT-29 no subtipo A.

Nossos resultados mostraram que o SFN, isolado na concentração de 32 µM, promoveu a apoptose em células HT-29 após 24 horas de exposição. No tratamento combinado, não houve aumento da apoptose em comparação com o SFN isolado. O SFN, em concentrações a partir de 8 µM em células humanas não tumorais MNP01, causou a regulação positiva de genes reguladores da apoptose e modulou a expressão gênica associada ao fenótipo pró-apoptótico em MNP01 (Santos et al., 2020).

Exposições toxicológicas e farmacológicas podem acelerar ou retardar a cicatrização de feridas e o reparo tecidual. Tais exposições afetam o processo de migração celular e suas etapas, incluindo a hemostasia, a fase inflamatória, a proliferação e a maturação (Hunter et al., 2020). Verificamos que, no ensaio de migração celular com células Caco-2 após 24 horas de tratamento, apenas o SFN isolado ou a combinação de nutracêuticos foram capazes de inibir a migração celular. Esses achados corroboram dados da literatura que, segundo Hao et al. (2020), demonstraram que o SFN inibiu a migração de células de câncer colorretal HT-29 e SW480 nas concentrações de 10 e 20 µM após 48 horas de tratamento. As limitações do nosso estudo devem ser consideradas, haja vista que o estudo foi realizado em linhagens celulares de CCR. Ainda assim, nossos resultados são promissores e apontam para a relevância de pesquisas com os nutracêuticos em outros modelos experimentais.

CONCLUSÃO

Este estudo investigou os efeitos dos tratamentos isolados e em combinação com os nutracêuticos DADS e SFN em duas linhagens humanas de CCR. Os resultados mostraram que os nutracêuticos isolados exerceram efeitos citotóxicos em altas concentrações nas linhagens Caco2 e HT-29. Os tratamentos combinados exerceram efeitos sinérgicos na redução da viabilidade celular em ambas as linhagens. Na avaliação da inibição da migração celular, apenas o SFN apresentou resultados estatisticamente significativos. Os tratamentos com o SFN, tanto isolado quanto em combinação, induziram a morte celular por apoptose na linhagem HT-29. É possível concluir que as células HT-29 apresentaram alterações significativas em todos os ensaios biológicos do estudo, em comparação com as células Caco-2. As

características moleculares e fenotípicas das linhagens podem justificar os achados nas linhagens de CCR. Os resultados demonstram que o SFN e o DADS, isolados ou em combinação, constituem estratégias pré-clínicas promissoras para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas ao CCR.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO INSTITUCIONAL

Os autores agradecem a Joana D'Arc Castania Darin e Regislaine Valéria Burim pela assistência técnica. EP e ICG receberam bolsa de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil; processo n° 123569/2023-0). LMGA recebe bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq (processo nº 304333/2023-9). Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brasil, processo nº 2021/09381-3) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil – Código de Financiamento 001).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não existe conflito de interesse.

DECLARAÇÃO DE USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Os autores declaram que não utilizaram ferramentas de inteligência artificial generativa na elaboração deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALTONSY, M.O. et al. Diallyl disulfide, from garlic oil, synthesizes human colonic adenocarcinoma cell line (Caco-2) to TNF-alpha- mediated apoptosis through up-regulation of membrane FAS levels. **American Journal of Science**, v. 9, n. 3, p. 173–180, 2013.

BAL-PRICE, A.; COECKE, S. Guidance on good cell culture practice (GCCP). *In*: ASCHNER, M.; SUÑOL, C.; BAL-PRICE, A. (Orgs.). **Cell Culture Techniques**. Totowa, NJ: Humana Press, p. 1–25, 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-077-5_1.

BERG, K.C.G. et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. **Molecular Cancer**, v. 16, p. 116, 2017. DOI: https://doi.org/10.1186/s12943-017-0691-y.

CIZKOVA, K. et al. HT-29 and Caco2 cell lines are suitable models for studying the role of arachidonic acid-metabolizing enzymes in intestinal cell differentiation. **Cells Tissues Organs**, v. 208, n. 1–2, p. 37–47, 2020. DOI: https://doi.org/10.1159/000506735.

DOS SANTOS, P.W.S. et al. Transcriptome and DNA methylation changes modulated by sulforaphane induce cell cycle arrest, apoptosis, DNA damage, and suppression of proliferation in human liver cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111047, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111047.

ELHAM, N. et al. Selective cytotoxic effect of probiotic, paraprobiotic and postbiotics of *L.casei* strains against colorectal cancer cells: *Invitro* studies. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. e19400, 2022. DOI: https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e19400.

GANO, C.A. et al. Anti-cancer potential of synergistic phytochemical combinations is influenced by the genetic profile of prostate cancer cell lines. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1119274, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1119274.

HAO, Q. et al. Sulforaphane suppresses carcinogenesis of colorectal cancer through the ERK/Nrf2-UDP glucuronosyltransferase 1A metabolic axis activation. **Oncology Reports**, v. 43, n. 4, p. 1067–1080, 2020. DOI: https://doi.org/10.3892/or.2020.7495.

HE, H. et al. A comprehensive understanding about the pharmacological effect of diallyl disulfide other than its anti-carcinogenic activities. **European Journal of**

Pharmacology, v. 893, p. 173803, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173803.

HOSSAIN, M.S. et al. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. **Cancers**, v. 14, n. 7, p. 1732, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers14071732.

HOSSAIN, S.; LIU, Z.; WOOD, R.J. Association between histone deacetylase activity and vitamin D-dependent gene expressions in relation to sulforaphane in human colorectal cancer cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 5, p. 1833–1843, 2021. DOI: https://doi.org/10.1002/jsfa.10797.

HUNTER, R. et al. Angiogenesis in wound healing following pharmacological and toxicological exposures. **Current Pathobiology Reports**, v. 8, n. 4, p. 99–109, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/s40139-020-00212-y.

JANG, J.Y. et al. Sulforaphane in cancer prevention and therapy: a state-of-the-art review of epidemiological evidence, molecular mechanisms, and translational challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 27, n. 4, p. 2028, 2026. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms27042028.

KALEMOGLU, E. et al. Lycopene, carotenoids, and retinoids in cancer chemoprevention: molecular mechanisms and clinical implications. **Nutrients**, v. 18, n. 14, p. 2318, 2026. DOI: https://doi.org/10.3390/nu18142318.

KYROCHRISTOU, I.D. et al. Early-onset colorectal cancer in patients younger than 50 years: a systematic review of the literature. **Annals of Gastroenterology**, v. 38, n. 4, p. 364–379, 2025. DOI: https://doi.org/10.20524/aog.2025.0977.

LANGNER, E.; LEMIESZEK, M.K.; RZESKI, W. Lycopene, sulforaphane, quercetin, and curcumin applied together show improved antiproliferative potential in colon cancer cells *in vitro*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. e12802, 2019. DOI: https://doi.org/10.1111/jfbc.12802.

LIANG, C.C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007. DOI: https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30.

LIU, M-Y. et al. Role of diallyl disulfide in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 320, p. 119348, 2026. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2026.119348.

MACHADO, A.R.T. et al. Diallyl disulfide induces chemosensitization to sorafenib, autophagy, and cell cycle arrest and inhibits invasion in hepatocellular carcinoma. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2582, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122582.

MANCUSO, F.M. et al. Colorectal adenoma subtypes exhibit signature molecular profiles: unique insights into the microenvironment of advanced precancerous lesions for early detection applications. **Cancers**, v. 17, n. 4, p. 654, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers17040654.

MCALPINE, P.L. et al. Organosulfur compounds in colorectal cancer prevention and progression. **Nutrients**, v. 16, n. 6, p. 802, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/nu16060802.

MEDICO, E. et al. The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 7002, 2015. DOI: https://doi.org/10.1038/ncomms8002.

MITRA, S. et al. Diallyl disulfide: a bioactive garlic compound with anticancer potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 943967, 2022. DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2022.943967.

MONDAL, A. et al. Garlic constituents for cancer

prevention and therapy: From phytochemistry to novel formulations. **Pharmacological Research**, v. 175, p. 105837, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105837.

MOURADOV, D. et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 12, p. 3238–3247, 2014. DOI: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0013.

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International Journal of Oncology**, v. 3, n. 3, p. 473–476, 1993. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo.3.3.473.

REDONDO-BLANCO, S. et al. New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 109, 2017. DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00109.

ROSHANDEL, G.; GHASEMI-KEBRIA, F.; MALEKZADEH, R. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and prevention. **Cancers**, v. 16, n. 8, p. 1530, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/cancers16081530.

SANTANA-GÁLVEZ, J. et al. Synergistic combinations of curcumin, sulforaphane, and dihydrocaffeic acid against human colon cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3108, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms21093108.

SANTOS, P.W. et al. Effects of sulforaphane on the oxidative response, apoptosis, and the transcriptional profile of human stomach mucosa cells *in vitro*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 854, p. 503201, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503201.

SIEGEL, R.L. et al. Colorectal cancer statistics, 2026. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 76, n. 2, p. e70067, 2026. DOI: https://doi.org/10.3322/caac.70067.

SITHOLUMUSA, M.U.I. et al. Targeting colorectal cancer with natural compounds: from molecular mechanisms to clinical therapeutic potential. **Clinical Traditional Medicine and Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 200295, 2026. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ctmp.2026.200295.

TUTTIS, K. et al. Sulforaphane combined with vitamin D induces cytotoxicity mediated by oxidative stress, DNA damage, autophagy, and JNK/MAPK pathway modulation in human prostate tumor cells. **Nutrients**, v. 15, n. 12, p. 2742, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/nu15122742.

VERMA, T. et al. Medicinal and therapeutic properties of garlic, garlic essential oil, and garlic-based snack food: An updated review. **Frontiers in nutrition**, v. 10, p. 1120377, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1120377.

WANG, M. et al. ZNF217-activated Notch signaling mediates sulforaphane-suppressed stem cell properties in colorectal cancer. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 125, p. 109551, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109551.

WHO. World Health Organization. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 17 ago. 2026.

YANG, C. et al. Cell migration assays and their application to wound healing assays - a critical review. **Micromachines**, v. 15, n. 6, p. 720, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/mi15060720.