



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Avaliação de fitopreparados de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene em modelos tumorais

Max Vidal Gutiérrez

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Orientador: Prof. Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Araraquara – SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Avaliação de fitopreparados de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene em modelos tumorais

Max Vidal Gutiérrez

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Orientador: Prof. Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Araraquara – SP

2020

G984a

Gutiérrez, Max Vidal.

Avaliação de fitopreparados de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene em modelos tumorais / Max Vidal Gutiérrez. – Araraquara: [S.n.], 2020.
82 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Wagner Vilegas.

Coorientador: Ramón Enrique Robles Zepeda.

1. Fitopreparado. 2. Cucurbitacinas. 3 Antitumoral. 4. *Ibervillea sonora*. I. Vilegas, Wagner, orient. II. Zepeda, Ramón Enrique Robles, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação de fitopreparados de *Ibervillea sonorae* (S.Watson) em modelos tumorais

AUTOR: MAX VIDAL GUTIÉRREZ

ORIENTADOR: WAGNER VILEGAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. WAGNER VILEGAS (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências - UNESP - São Vicente

Prof. Dr. RAMON ENRIQUE ROBLES ZEPEDA (Participação Virtual)

Ciencias Químico Biológicas y de la Salud / Universidade de Sonora - México

Prof. Dr. CARLOS ARTURO VELÁZQUEZ CONTRERAS (Participação Virtual)

Departamento de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud / Universidad de Sonora

Profa. Dra. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO (Participação Virtual)

Departamento de Química Analítica / Faculdade de Medicina da Universidad Autonoma de Nuevo Leon

Prof. Dr. HERIBERTO TORRES MORENO (Participação Virtual)

Departamento de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud / Universidade de Sonora-

México Araraquara, 19 de novembro de 2020

DEDICATÓRIA

“A mis padres, María Lourdes del Carmen Gutiérrez Cohen y Fernando Vidal Cañez que con su educación, consejos y cariño, me han guiado por el buen camino”

“A mi compañera de vida, Maëla Perón, por su comprensión y apoyo incondicional en todo momento”

“A mi pequeño Maxito, que desde que llegó a este mundo, ha sido mi fuerza e inspiración para seguir adelante”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, pela orientação e todos os ensinamentos no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais.

Ao Prof. Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, pela orientação e todos os ensinamentos no Laboratorio de Investigación en Productos Naturales.

Aos professores, Dr. Salomón Hernández, Dr. Heriberto Torres, MVZ. Eduardo Arrequin, Dr. Nivaldo Boralle e a Especialista do IEAMar, Thais Santos, pelas contribuições ao trabalho de pesquisa.

Aos meus companheiros do LBPN e do Instituto de Biociências do Litoral Paulista da UNESP: Renan, Virginia, Aninha, Marcelo, Cris, Carol, Emanuelle e Andressa.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la UNISON: Alejandro Urrea, Ivonne Niño, David Ortega, Humberto y Salvador.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Panamericana: Víctor, Eli, Farid y Esmeralda.

A la Universidad de Sonora – campus Hermosillo Sonora, México.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus Araraquara.

RESUMO

Apesar dos avanços na medicina, o câncer continua sendo um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Portanto, a busca por novos esquemas terapêuticos é necessária. *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae) é uma planta medicinal endêmica do noroeste do México. O pó da raiz é usado para o tratamento de diabetes e câncer. Trabalhos anteriores evidenciaram que a Cucurbitacina IIb (CIIb) é uma das substâncias contidas em *I. sonora* que induz a morte celular pela via da apoptose na linha celular de câncer de colo de útero, HeLa, assim como pela atividade antitumoral em xenoinxertos de HeLa em camundongos imunossuprimidos. Tendo em vista que o isolamento de uma substância natural é geralmente difícil e custoso e muitas vezes a atividade biológica é dada por uma complexa mistura de componentes, esta investigação teve dois objetivos: 1) desenhar dois fitopreparados de *I. sonora* padronizados com base no conteúdo de CIIb, e 2) avaliar o potencial anticanceroso desses dois fitopreparados em modelo murinho de xenoinxertos. Os fitopreparados foram elaborados por percolação e maceração, gerando o Fito-Ison-EtOH e o Fito-Ison-EtOAc, respectivamente. A quantificação de CIIb nos fitopreparados foi feita por espectrometria de massas por ressonância ciclôtrica de íons e transformada de Fourier (FT-ICR-MS/MS). A porcentagem de massa de CIIb para Fito-Ison-EtOH e Fito-Ison-EtOAc foi de 0,67% e 1,84%, respectivamente. A atividade antitumoral *in vivo* foi feita em modelo de xenoinxertos de células cancerosas em camundongos imunossuprimidos. Os dois fitopreparados e CIIb induzem a morte celular por apoptose em HeLa, provocando pelo desequilíbrio redox induzido pela inibição de Nrf2. O Fito-Ison-EtOAc e CIIb inibem o desenvolvimento tumoral em 68% e 70%, respectivamente, enquanto que o Fito-Ison-EtOH inibe em 86%. O conjunto desses resultados demonstra que fitopreparados de *I. sonora* têm potencial para o desenvolvimento de produtos para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Fitopreparado; Cucurbitacinas; Antitumoral; *Ibervillea sonora*.

RESUMEN

A pesar de los avances en la medicina, el cáncer continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Por tanto, la búsqueda de nuevos esquemas terapéuticos es necesaria. *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae) es una planta medicinal endémica del noroeste de México. El pulverizado de su raíz es utilizado para el tratamiento de diabetes y cáncer. Trabajos anteriores evidenciaron que cucurbitacina IIb (CIIb) es una sustancia presente en *I. sonora* que induce la muerte celular por apoptosis en la línea celular de cáncer cervicouterino, HeLa, así como actividad antitumoral en xenoinjertos de HeLa en ratones inmunosuprimidos. Teniendo en consideración que el aislamiento de una sustancia natural es generalmente difícil y costoso, y que muchas veces la actividad biológica es dada por una mezcla compleja de compuestos, esta investigación tuvo dos objetivos: 1) Diseñar dos fitopreparados de *I. sonora* estandarizados con base en su contenido de CIIb, y 2) evaluar el potencial anticanceroso de los fitopreparados en modelo murino de xenoinjertos. Los fitopreparados fueron elaborados por maceración y percolación, obteniendo a Fito-Ison-EtOH y Fito-Ison-EtOAc, respectivamente. La cuantificación de CIIb en los fitopreparados fue realizada por espectrometría de masas de resonancia ciclotrónica de iones y transformada de Fourier (FT-ICR-MS/MS). El porcentaje de masa de CIIb para Fito-Ison-EtOH y Fito-Ison-EtOAc fue del 0.67% y 1.84%, respectivamente. La actividad antitumoral *In vivo* fue realizada en modelo de xenoinjertos de líneas celulares cancerosas en ratones inmunosuprimidos. Ambos fitopreparados y CIIb inducen la muerte celular por apoptosis en HeLa, provocado por el desequilibrio redox inducido por la inhibición de Nrf2. Fito-Ison-EtOAc y CIIb inhiben el desarrollo tumoral en un 68% y 70%, respectivamente, en cuanto Fito-Ison-EtOH inhibe en un 86%. El conjunto de estos resultados demuestra que fitopreparados de *I. sonora* tienen el potencial para el desarrollo de productos anticancerosos.

Palabras clave: Fitopreparado; Cucurbitacinas; Antitumoral; *Ibervillea sonora*.

ABSTRACT

Despite advances in medicine, cancer remains a major public health problem worldwide. Therefore, research into new therapeutics schemes is necessary. *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae) is a medicinal plant endemic to northwestern Mexico. The root powder is used to treat diabetes and cancer. Previous work has shown that Cucurbitacin IIb (CIIb) is one of the substances contained in *I. sonora* that induces cell death via apoptosis in the cervical cancer cell line, HeLa, as well as antitumor activity in HeLa xenografts in immunosuppressed mice. Bearing in mind that the isolation of a natural substance is generally difficult and expensive, and often the biological activity is given by a complex mixture of components, this investigation had two objectives: 1) to design two phytopreparations of *I. sonora* standardized based on the content of CIIb, and 2) to evaluate the anticancer potential of these two phytopreparations in an *in vivo* xenograft model. Phytopreparations were prepared by percolation and maceration, generating Fito-Ison-EtOH and Fito-Ison-EtOAc, respectively. The quantification of CIIb in phytopreparations was performed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique (FT-ICR-MS/MS). The mass percentage of CIIb for Fito-Ison-EtOH and Fito-Ison-EtOAc was 0.67% and 1.84%, respectively. The antitumor activity *in vivo* was performed in a cancer cell xenograft model in immunosuppressed mice. The two phytopreparations and CIIb induced cell death by apoptosis in HeLa, caused by the redox imbalance induced by the inhibition of Nrf2. Fito-Ison-EtOAc and CIIb inhibit tumor development by 68% and 70%, respectively, while Fito-Ison-EtOH inhibits by 86%. These results demonstrate that phytopreparations of *I. sonora* have the potential to develop products for the treatment of cancer.

Keywords: Phytopreparation, Cucurbitacins, Antitumoral, *Ibervillea sonora*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

APCI	Fonte de ionização química à pressão atmosférica
APCI-IT-MS	Espectrometria de massa de armadilha de íons com fonte de ionização química à pressão atmosférica
ARN	Ácido ribonucleico
CID	Dissociação induzida por colisão
CIIb	Cucurbitacina IIb
Cisplatina	Cis-diaminodicloroplatinum
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Diclorometano
DEPTQ	Melhoria sem distorção por transferência de polarização com núcleos quaternários
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI	ionização por electropulverização
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
Fito-Ison-EtOAc	Fitopreparado de <i>Ibervillea sonora</i> obtido por métodos utilizando acetato de etila
Fito-Ison-EtOH	Fitopreparado de <i>Ibervillea sonora</i> obtido por métodos utilizando etanol a 70%
FT-ICR-MS	Espectrometria de massa de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier
HEPA	Filtro de ar de alta eficiência
HMBC	Correlação de ligação múltipla heteronuclear
HPLC-PDA	Cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao detector de fotodiodos
HPV	Vírus do papiloma humano
HSQC	Correlação heteronuclear quântica simples
IT	Armadilha de íons (<i>Ion trap</i>)
m/z	Massa sobre carga
MeOH	Metanol

MS	Espectrometria de massas
MTT	3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TLC	Cromatografia em camada fina
TOCSY	Espectroscopia de correlação total

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Dados espectrométricos de RMN da cucurbitacina **3**

Tabela 2. Estrutura das cucurbitacinas identificadas nos fitopreparados de *I. sonorae*.

Tabela 3. Atividade antiproliferativa dos fitopreparados e substâncias isoladas de *I. sonorae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Raiz de *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene.

Figura 2. Cucurbitacinas de *I. sonorae*.

Figura 3. Cromatogramas comparativos dos fitopreparados de *Ibervillea sonorae*.

Figura 4. Correlações HMBC para a cucurbitacina **3**.

Figura 5. Espectro FT-ICR-MS da cucurbitacina **3**.

Figura 6. Padrão de fragmentação da substância **1**, kinoína B diglicosídeo (**1**).

Figura 7. Padrão de fragmentação da substância **2**, CIIb (**2**).

Figura 8. Padrão de fragmentação da substância **3**.

Figura 9. Padrão de fragmentação da substância **4**, kinoína B (**4**).

Figura 10. Padrão de fragmentação da substância **5**, kinoína A (**5**).

Figura 11. Padrão de fragmentação da substância **6**, kinoína A glicosídeo (**6**).

Figura 12. Padrão de fragmentação da substância **7**, kinoína A diglicosídeo (**7**).

Figura 13. Curva de calibração de CIIb (**2**) usando o íon de m/z 387,25 $[M-C_6O_3H_{12}-H]^-$ por FT-ICR-MS/MS.

Figura 14. Curva de calibração de Fito-Ison-EtOH enriquecida com CIIb (**2**).

Figura 15. Curva de calibração de Fito-Ison-EtOAc enriquecida com CIIb (**2**).

Figura 16. Curva de crescimento de HeLa contra os tratamentos do fitopreparados, CIIb (2) e cisplatina.

Figura 17. Western blot de HeLa após 12 h de tratamento.

Figura 18. Western blot de HeLa após 24 h de tratamento.

Figura 19. Western blot de HeLa após 48 h de tratamento.

Figura 20. Expressão de p21 aos 5 dias e efeito sobre o ciclo celular após 24 h, de tratamento em HeLa.

Figura 21. Western blot de Nrf2 e caspase-9 em HeLa após 24 h de tratamentos.

Figura 22. Western blot de caspase-9 em HeLa após 12 h de tratamento.

Figura 23. Aparência física de um exemplar de camundongo de cada grupo dos diferentes tratamentos.

Figura 24. Representação gráfica das dimensões do tumor ao final dos tratamentos.

Figura 25. Desenvolvimento tumoral em camundongos após 15 dias de tratamentos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPITULO 1	13
REVISÃO DA LITERATURA	13
Problemática do câncer	13
Os Produtos Naturais e o Câncer	14
<i>Ibervillea sonora</i> , fitoquímica e suas propriedades contra o câncer	15
Atividade Biológica de Cucurbitacinas em Células de Câncer	17
O Desenho dos Fitopreparados de <i>Ibervillea sonora</i>	18
OBJETIVOS	20
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos	20
CAPITULO 2	21
MATERIAIS E MÉTODOS	21
Material Vegetal	21
Obtenção dos fitopreparados	21
<i>Fitopreparado com integridade fitoquímica – Fito-Ison-EtOH</i>	21
<i>Fitopreparado com maior conteúdo de cucurbitacinas – Fito-Ison-EtOAc</i>	21
<i>Análise por comparativa dos fitopreparados HPLC-PDA</i>	22
Fracionamento de Fito-Ison-EtOH	22
Identificação das substâncias isoladas por RMN e FT-ICR-MS	23
Triagem fitoquímica de Fito-Ison-EtOH e Fito-Ison-EtOAc por APCI-IT-MSn	23
Quantificação de CIIb (2) por FT-ICR-MS/MS	23
Atividade Biológica <i>In vitro</i> de Fitopreparados e CIIb (2)	24
<i>Cultura celular</i>	24
<i>Ensaio de proliferação celular pelo método do MTT</i>	24
<i>Western blot de HeLa pós-tratamento com fitopreparados e CIIb (2)</i>	25

<i>Ciclo celular por citometria de fluxo</i>	26
<i>Imunofluorescência de p21</i>	27
Atividade Antitumoral <i>in vivo</i> por xenoinxertos de Linha Celular HeLa em Camundongos Atímicos nu/nu	27
CAPITULO 3	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
Obtenção dos fitopreparados.....	28
Identificação das substâncias isoladas de Fito-Ison-EtOH	29
Identificação de substâncias em Fito-Ison-EtOH e Fito-Ison-EtOAc por APCI-IT-MSn	32
Quantificação de CIIb (2) nos fitopreparados de <i>I. sonora</i> por FT-ICR-MS/MS..	43
Efeito Antiproliferativo de Fitopreparados em Linhagens de Câncer	46
Atividade Antiproliferativa de Fitopreparados e CIIb (2) em HeLa após 24 h e após 72 h.....	48
Alterações na Via JAK2/STAT3 de Fitopreparados e CIIb (2) em HeLa.....	49
Efeitos no Ciclo Celular de HeLa por Fitopreparados e CIIb (2)	53
Atividade Antitumoral por Xenoinxertos de HeLa em Camundongos Atímicos nu/nu	58
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	71
Anexo 1. Dados de RMN das três substâncias isoladas de <i>I. sonora</i>	71
<i>Análise por FT-ICR-MS/MS de kinoína B diglicosídeo (1)</i>	72
<i>Análise FT-ICR-MS de CIIb (2)</i>	73
Anexo 3. Espectro de RMN da substância 3	74
<i>Experimento ¹H</i>	74
<i>Experimento DEPTQ</i>	75
<i>Experimento HSQC</i>	76

<i>Experimento HMBC</i>	77
Anexo 4. Atividade antiproliferativa de fitopreparados e CIIb (2).	78
Anexo 5. Alterações morfológicas induzidas por tratamentos na linha celular HeLa e ARPE19.	79

INTRODUÇÃO

O câncer, um grupo de aproximadamente cem doenças muito diferentes entre elas, é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo [1]. O desenvolvimento do câncer é um processo multifatorial de dano ao DNA que resulta na formação de células malignas que proliferam incontrolavelmente no corpo. As características particulares de cada tipo de células malignas classificam o tipo de câncer [2,3]. Os tratamentos usados contra o câncer não são perfeitos, pois muitos deles provocam uma variedade de efeitos colaterais. Uma das características das células cancerosas é que elas têm uma taxa de divisão muito alta. Geralmente, os agentes quimioterápicos não são específicos para as células cancerosas. Muitos deles atuam em células que estão em processo de divisão, como na maioria das células cancerosas. No entanto, muitas células do nosso corpo estão em constante processo de divisão, fazendo que com a quimioterapia também as atinjam, resultando nos efeitos colaterais característicos: queda de cabelo, pele e unhas frágeis, problemas gastrointestinais, para citar alguns [4]. Isso, de certa forma, exige a constante investigação de novos esquemas terapêuticos que, além de eficazes, também possam reduzir os efeitos colaterais.

Os produtos naturais têm sido a primeira alternativa de tratamento em todas as civilizações. Muitas substâncias bioativas que foram isoladas da natureza agora podem ser encontradas nas farmácias com algum nome comercial que não nos faz pensar que provem da natureza, como a aspirina, a morfina e alguns antibióticos, como a penicilina e a eritromicina. Embora agora não sejam mais extraídos da natureza, essa é sua origem. O mesmo aconteceu com os medicamentos anticâncer, pois um grande número de agentes quimioterápicos são provenientes ou derivados de origem natural, como é o taxol, a doxorrubicina e a vimblastina [5].

Dentre várias plantas medicinais, *Ibervillea sonora* é uma cucurbitácea que cresce no deserto de Sonora, México, cuja raiz seca e moída é usada como agente antidiabético e para o tratamento de câncer [6]. Dela, duas cucurbitacinas triterpênicas com potencial anticâncer foram isoladas: a kinoína A (**5**), que induz apoptose na linha celular HeLa, e a CIIb (**2**), com efeito antitumoral *in vivo* em um modelo de xenoinxertos da linha celular HeLa em camundongos imunossuprimidos [7,8].

A maior vantagem dos fitopreparados e fitoterápicos sobre as substâncias puras bioativas e os metabólitos secundários puros não está relacionada apenas com o tempo e os fatores econômicos envolvidos na etapa de obtenção ou isolamento, mas sim o fato de que os fitoterápicos podem apresentar atividades sinérgicas no organismo que aumentam a atividade farmacológica [9].

Nesta investigação, foram levados em consideração os antecedentes culturais (uso medicinal) e científicos [atividade biológica de CIIb (2)] dessa planta para o desenvolvimento de dois fitoterápicos de *I. sonorae*. Um deles foi desenhado para preservar a integridade fitoquímica da planta; o outro, buscando maior conteúdo em cucurbitacinas, classe de substâncias isolada anteriormente e que apresentou atividade biológica [8,17,18].

O capítulo 1 apresenta revisão da literatura sobre a problemática do câncer, o uso dos produtos naturais no câncer e do potencial antitumoral de *I. sonorae*. O capítulo 2 expõe a preparação dos fitopreparados e as técnicas envolvidas na avaliação da atividade antitumoral. O capítulo 3 discute a composição química dos fitopreparados e a avaliação biológica dos fitopreparados e CIIb (2) sobre o modelo de xenoinxertos de HeLa em camundongos atímicos nu/nu.

CAPITULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

Problemática do câncer

Atualmente, o câncer continua sendo um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo.

O aumento no número de casos e mortes por câncer no mundo é alarmante. Em 2012 foram registrados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes e em 2018 esses números foram de 18,1 milhões (aumento de 29%) e de 9,6 milhões (aumento de 17%), respectivamente [1,10]. Em termos da população mundial, esses números representam que em 2012 0,1% foi diagnosticada com câncer e, em 2018,

0,3%, sendo que a percentagem de óbitos permaneceu praticamente estável, provavelmente aos grandes avanços na medicina oncológica.

Mas, existem alguns tipos de câncer que continuam com taxa alta de incidência e mortalidade (como o do colo do útero, que ocupa o 4º lugar de incidência e mortalidade [1]), incluindo aqueles nos quais existem métodos preventivos, como as vacinas (como aquela contra o HPV) [11,12]. O HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de colo de útero, pois seu DNA está presente em 99,7% dos casos [11,12].

Curiosamente, a primeira linha celular humana imortal pertence ao câncer do colo do útero induzido pelo HPV, a linha celular HeLa, em homenagem à mulher de quem a linha celular foi obtida, Henrietta Lacks. Desde 1952, a linhagem celular foi estabelecida e, desde então, tem sido objeto de inúmeras pesquisas. A linhagem tornou-se muito importante em 1955, quando pesquisas com HeLa contribuíram para o desenvolvimento e lançamento da primeira vacina contra a poliomielite. No entanto, apesar de tantos anos desde a sua imortalização, HeLa continua sendo uma das linhas celulares mais estudadas, bem como um dos modelos para testar potenciais agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer do colo do útero e outros tipos de câncer relacionados ao HPV, como é o bucal [13].

O agente quimioterápico de primeira linha para tratar o câncer do colo do útero (e outros cânceres) é a cisplatina. Essa substância tem a capacidade de se intercalar ao DNA, impedindo sua replicação e induzindo um efeito citostático. Ela não discrimina nenhum tipo de célula, sendo uma das principais razões da sua alta citotoxicidade. No entanto, é mais ativa em células com alta taxa de divisão, como as células cancerosas. Isso faz com que, ainda hoje, a quimioterapia para esse tipo de câncer seja muito agressiva, com efeitos colaterais indesejáveis. Portanto, sempre houve a necessidade de melhorar e expandir as opções de tratamento para o câncer do colo do útero [14].

Os Produtos Naturais e o Câncer

Os produtos naturais têm sido utilizados no curso das civilizações como tratamentos para doenças e desconfortos. Existem registros de preparações farmacêuticas baseadas em plantas e outros produtos de origem natural que datam de 3.000 a 6.000 anos. A fonte desses produtos são plantas, animais, fungos,

bactérias e algas [15]. Atualmente, muitos dos produtos utilizados na medicina vêm ou são derivados da natureza. Um dos exemplos mais característicos desse tipo de produtos é o ácido acetilsalicílico, conhecido como Aspirina®. Atualmente, o princípio ativo dessa droga é sintetizado. No entanto, tem origem na salicina, um metabólito secundário extraído da planta *Salix alba*. Outro exemplo bastante popular é a penicilina, um dos antibióticos mais conhecidos descobertos acidentalmente pelo vencedor do Prêmio Nobel Alexandre Fleming, do fungo *Penicillium notatum*. Da mesma forma, existem muitos exemplos de drogas como morfina, eritromicina, e a lista continua [5].

Para o câncer, os exemplos mais característicos são o paclitaxel, cujo nome comercial é Taxol®, um metabólito secundário obtido de *Taxus brevifolia*, o ingerol-3-ingalte isolado de *Euphorbia peplus* e, os alcalóides vimblastina e vincristina, obtidos de *Catharanthus roseus* [5,16].

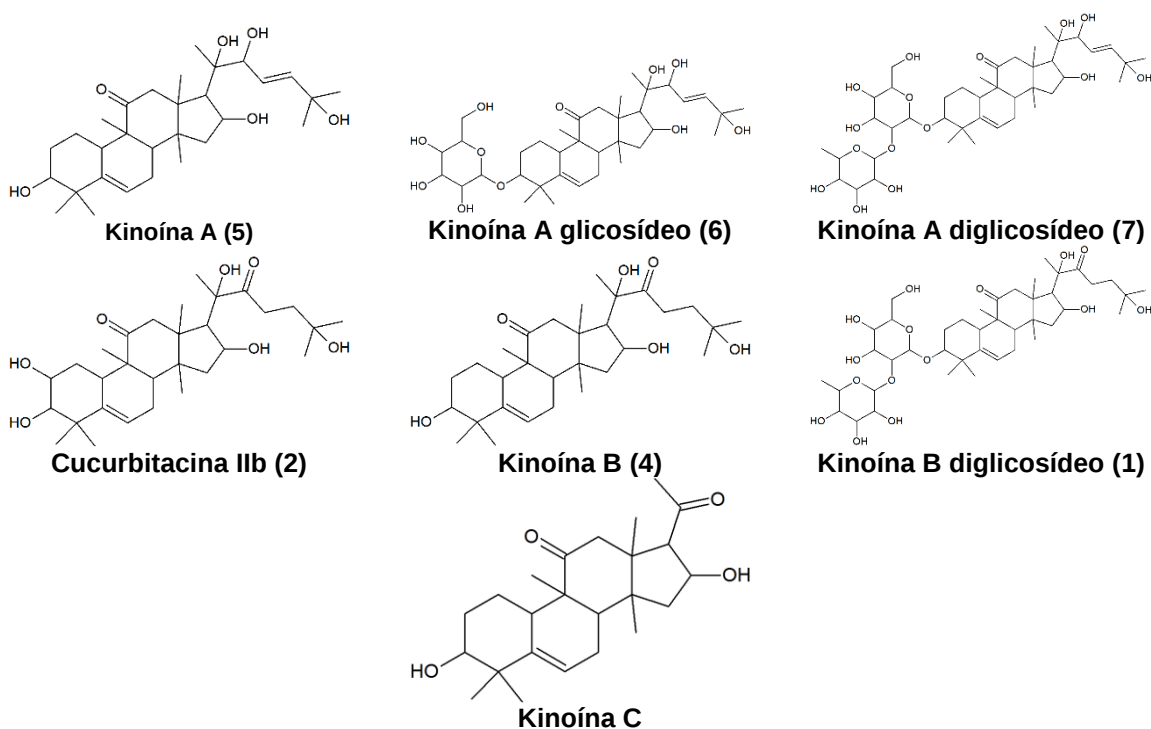
***Ibervillea sonora*, fitoquímica e suas propriedades contra o câncer**

Ibervillea sonora (S. Watson) Greene é uma planta da família Cucurbitaceae que cresce no noroeste do México, principalmente no deserto de Sonora, conhecida como "Wereke" ou "Guareque" (Figura 1). A raiz desta planta é amplamente utilizada na medicina tradicional nessa região do México para o tratamento de diabetes e câncer. A apresentação farmacêutica usada na medicina tradicional limita-se basicamente à secagem e pulverização da raiz, a introdução do pó nas cápsulas e sua administração oral [6]. Existe um produto derivado de *I. sonora* comercializado no México cuja formulação consiste em 0,2 g da planta seca (registro 010RH2013SSA na Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios, COFEPRIS), com indicação para "auxiliar no alívio de sintomas como palpitações, cefaleias, distúrbios visuais e tonturas", usos não indicados pela farmacopeia mexicana [6].

Estudos fitoquímicos em *I. sonora* determinaram que sua composição química inclui principalmente cucurbitacinas, as quais podem se encontrar na natureza na forma glicosilada (glicona) ou não glicosilada (aglicona), ambas encontradas em *I. sonora* (Figura 2) [8,17,18].



Figura 1. Raiz de *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene



* [8,17,18].

Figura 2. Cucurbitacinas de *I. sonorae**.

Investigações com extratos etanólicos brutos e frações provenientes das raízes de *I. sonorae* destacam o efeito hipoglicêmico em modelo de ratos diabéticos, mas sem atribuir essa atividade a nenhuma das cucurbitacinas identificadas fitoquimicamente [19–21]. Outros estudos relatam a atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória desses extratos e frações [22].

Por outro lado, no caso do câncer, duas cucurbitacinas triterpênicas exibiram atividade antiproliferativa em linhas celulares de câncer: a kinoína A (**5**), que induz a morte celular por apoptose em HeLa [8] e a cucurbitacina IIb, CIIb (**2**), que possui atividade antitumoral em modelo de xenoenxertos de HeLa em camundongos atímicos nu/nu [7,8].

Atividade Biológica de Cucurbitacinas em Células de Câncer

As cucurbitacinas são metabólitos secundários de natureza triterpênica, cuja estrutura química central é constituída pela 19-(10 $\rightarrow$ 9 β)-abeco-10 α -lanost-5-eno [23,24]. Essa família de substâncias é reconhecida por suas atividades biológicas, funcionando como imunomoduladores, até mesmo com atividades anticâncer [23]. Nas células cancerosas, muitas cucurbitacinas têm a capacidade de induzir a interrupção do ciclo celular, principalmente nas fases S e G2/M, de inibir a despolimerização do citoesqueleto, de induzir a morte celular por apoptose, autofagia ou por uma combinação de dois ou mais desses efeitos [8,23,32–38,24–31], por diferentes vias de ação. No entanto, sabe-se que as cucurbitacinas induzem a morte celular por apoptose, interferindo na via JAK2/STAT3 [28,29,35,39,40], que está intimamente relacionada aos processos de proliferação, diferenciação e apoptose, angiogênese, respostas imunes e metástases [41]. As interações estrutura-proteína desse processo não foram descritas, principalmente devido ao fato de que uma mesma cucurbitacina pode ou não interferir nessa via, dependendo da linha celular, como a cucurbitacina I [37]. Isso, por sua vez, dificulta a correlação na presença de farmacóforos nas cucurbitacinas que interferem na via de sinalização JAK2/STAT3.

Entre os diferentes efeitos biológicos que as cucurbitacinas podem induzir nas células cancerosas, a capacidade de inibir a despolimerização do citoesqueleto está associada à presença de um aceptor de Michael, na cadeia lateral do triterpeno, consistindo de um grupo cetona em C-22 conjugado a uma ligação dupla entre C-23 e C-24. Esse farmacóforo tem a capacidade de formar uma ligação covalente com as cisteínas da actina dos microtúbulos [30,42]. No entanto, as cucurbitacinas CIIb (**2**) e a kinoína A (**5**), isoladas de *I. sonorae* [7,8], não possuem essa característica estrutural. Por isso, um bom começo para determinar o mecanismo de ação dos fitopreparados e CIIb (**2**), é avaliar seu efeito sobre a expressão das proteínas mais afetadas pelas cucurbitacinas, como é STAT3.

A cucurbitacina CIIb (**2**) exibe atividade anti-inflamatória *in vitro* [34] e atividade antiproliferativa em linhas celulares de câncer de próstata androgênico independente (DU145 e PC3) e também na linhagem dependente de androgênicos (LNCaP), na qual apresenta maior efeito [43].

É interessante observar que essa planta tem sido consumida há longo tempo no norte do México, sem efeitos colaterais aparentes [6].

O Desenho dos Fitopreparados de *Ibervillea sonora*

O intuito desta pesquisa é o de desenvolver dois fitopreparados a partir das raízes de *I. sonora*, considerando as informações populares sobre seu uso, bem como os resultados prévios sobre sua composição química (cucurbitacinas) e sua atividade biológica (antitumoral).

Para isso, tomamos como referência definições e regulamentos internacionais (Organização Mundial da Saúde - OMS), mexicanos (Ley General de Salud) e brasileiros (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA). A OMS não estabelece uma diferenciação para fitopreparado, fitofármaco ou fitoterápico. Isso pode ser devido ao fato de que o significado de fitopreparado, ou seu equivalente, entre as leis de diferentes países pode variar drasticamente. No entanto, estabelece alguns conceitos gerais sobre as origens dos produtos naturais, dando sentido ao que é conhecido como Medicina Tradicional: "... soma total de conhecimentos, habilidades e práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, explicáveis ou não, usadas para manter a saúde e prevenir, diagnosticar, melhorar ou tratar doenças físicas e mentais" [44].

No México, onde *I. sonora* faz parte da medicina tradicional, a "Ley General de Salud" define, no artigo 224, seção B, subseção III, os fitopreparados como: "*Produtos feitos de material vegetal ou qualquer derivado deste, cujo principal ingrediente é a parte aérea ou subterrânea de uma planta ou extratos e tinturas, além de sucos, resinas, óleos graxos e essenciais, apresentados em forma farmacêutica, cuja eficácia e segurança terapêutica foram cientificamente confirmadas na literatura nacional ou internacional*". Quanto ao Regulamento para Suprimentos de Saúde, específica, no artigo 66, que um medicamento fitoterápico "... além de conter material vegetal, pode adicionar excipientes e aditivos à sua fórmula". De certa forma,

nenhuma das duas definições exige que conheçamos o conteúdo do fitopreparado, exceto o excipiente ou aditivo que ele pode exigir.

No Brasil, o órgão que regula esses produtos e seus derivados é a ANVISA. A agência possui um compêndio com um total de 655 páginas dedicadas exclusivamente a produtos fitoterápicos, com normas para o registro e avaliação de fitoterápicos. Nele, foram estabelecidos todos os regulamentos e processos que os produtos dessa natureza devem cumprir. Em nossas pesquisas, focamos nos critérios referentes à composição química.

Entende-se como fitopreparado um produto de origem vegetal que se encontra em etapa de investigação, e que tem como objetivo tornar-se um fitoterápico. Para construir o caminho dos requisitos necessários para padronizar os fitopreparados, avaliamos como a ANVISA define o termo “fitoterápico”: *“Produto obtido de matéria-prima vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou substância, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal”*.

A ANVISA estabelece alguns critérios para o desenvolvimento de fitoterápicos, dentre os quais destacamos o estudo fitoquímico, identificando a maior quantidade de substâncias presentes no fitopreparado, e a quantificação de um marcador químico. Esse marcador químico pode ser a substância mais abundante no fitopreparado ou aquele ao qual é atribuída a atividade biológica. Essa quantificação funciona como um controle de qualidade fitoterápico, garantindo que o produto mantenha suas características químicas e possa reproduzir os efeitos farmacológicos correspondentes.

Por isso, nesta pesquisa, foram utilizados cromatográficos acoplado aos espectrométricos para determinar a composição química de dois fitopreparados, bem como para quantificar o marcador químico escolhido. Na parte biológica, usamos linhas celulares e um modelo de camundongos imunossuprimidos para avaliar as diferenças entre as atividades biológicas dos dois fitopreparados em relação ao marcador utilizado para sua padronização.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar o efeito de dois fitopreparados de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene sobre a atividade antitumoral *in vivo* sobre a linhagem celular HeLa em camundongos atímicos nu/nu.

Objetivos Específicos

- Obter um fitopreparado que conserve a integridade fitoquímica de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene.
- Obter um fitopreparado com um conteúdo maior de cucurbitacinas de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene.
- Determinar a composição química qualitativa dos fitopreparados de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene por APCI-IT-MSn.
- Isolar e identificar a cucurbitacina CIIb (**2**) de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene para usá-la como marcador químico e padrão de referência para os ensaios biológicos.
- Padronizar os dois fitopreparados de *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene pelo método do padrão interno, utilizando CIIb (**2**), pela técnica FT-ICR-MS/MS.
- Avaliar a atividade antiproliferativa dos fitopreparados e de CIIb (**2**), pelo método do MTT, nas linhas celulares HeLa, LS180, A549, MDA-MB-231 e ARPE19.
- Comparar o mecanismo de ação dos fitopreparados com a CIIb (**2**) por western blot, através da avaliação das proteínas JAK2, STAT3, Bcl-2 e caspasa-3, na linha celular HeLa.
- Avaliar o desenvolvimento tumoral em modelo de xenoenxertos da linha celular HeLa em camundongos atímicos nu/nu, empregando os fitopreparados e usando CIIb (**2**) como referência.

CAPITULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

A espécie *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene (Cucurbitaceae) foi coletada no deserto de Sonora, no México. A identificação taxonômica foi feita pelo Eng. Jesús Sánchez Escalante e depositada no Herbário da Universidade de Sonora com número de voucher USON-22024. Resumidamente, a raiz (2000 g) da planta foi cortada em fatias e colocada em uma câmara de secagem por convecção a 40 °C até a secagem máxima. Posteriormente, as fatias secas (434 g) foram moídas em um moinho Wiley a 200 mesh. O pó resultante foi armazenado a –20 ° C.

Obtenção dos fitopreparados

Neste trabalho, a nomenclatura dos fitopreparados reúne o prefixo “Fito” refere-se ao tipo de produto, um fitopreparado ou produto de origem vegetal; o enfixo “Ison” refere-se à contração do nome científico da planta “*Ibervillea sonorae*” e o sufixo, EtOH e EtOAc, referem-se aos solventes usados na extração.

Fitopreparado com integridade fitoquímica – Fito-Ison-EtOH

Uma alíquota do pó (100 g) de *I. sonorae* foi percolada com 1000 mL de EtOH 70% com fluxo de 1,5 mL/min. O percolado foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e a temperatura fixa de 40 °C e em seguida liofilizado.

Fitopreparado com maior conteúdo de cucurbitacinas – Fito-Ison-EtOAc

Uma alíquota do pó (100 g) foi macerada com 1000 mL de EtOAc durante 7 dias com agitação periódica. Em seguida, o extrato foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura de 40 °C e liofilizado.

Análise por comparativa dos fitopreparados HPLC-PDA

Uma alíquota (100 mg) de cada um dos fitopreparados foi dissolvida em 2 mL de MeOH. As análises cromatográficas foram realizadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de conjunto de fotodiodos (HPLC-PAD, Waters), usando uma coluna cromatográfica Luna C18 20 x 21,2 mm com tamanho de partícula de 5 microns (Phenomenex). O detector de conjunto de fotodiodos (PDA) foi ajustado em 210 nm. A fase móvel consistiu de um gradiente formado pela mistura de ACN e H₂O (água ultrapura obtida do Milli'Q System [Millipore, Bedford, MA, EUA]); A eluição foi iniciada aos 0 min com 5% de ACN, depois, aos 40 min atingiu 30% de ACN, então, aos 50 min aumentou para 40% de ACN e, finalmente, aos 60 min o gradiente voltou a 5% de ACN.

Fracionamento de Fito-Ison-EtOH

Uma alíquota (1000 mg) do Fito-Ison-EtOH foi dissolvida em 20 mL de MeOH para dar uma solução de 50 mg/mL. O fracionamento foi realizado por meio de várias injeções de 2 mL dessa solução no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de conjunto de fotodiodos (HPLC-PAD, Waters), usando uma coluna cromatográfica Luna C18 20 x 21,2 mm com tamanho de partícula de 5 microns (Phenomenex). O detector de conjunto de fotodiodos (PDA) foi ajustado em 210 nm. A fase móvel consistiu de um gradiente formado pela mistura de ACN e H₂O (água ultrapura obtida do Milli'Q System [Millipore, Bedford, MA, EUA]); A eluição foi iniciada aos 0 min com 5% de ACN, depois, aos 40 min atingiu 30% de ACN, então, aos 50 min aumentou para 40% de ACN e, finalmente, aos 60 min o gradiente voltou a 5% de ACN. A Kinoína B diglicosídeo (**1**) (204 mg) foi obtida após 45,6 min, e uma mistura de CIIb (**2**) e a cucurbitacina **3** foi obtida após 52,8 min. Esta mistura foi separada em uma coluna cromatográfica de 1,5 x 20 cm empacotada com gel de sílica 200 mesh e eluída com EtOAc, fornecendo CIIb (**2**) (7,4 mg) e a cucurbitacina **3** (10,2 mg).

Identificação das substâncias isoladas por RMN e FT-ICR-MS

Os experimentos de RMN foram realizados em equipamento Bruker Advance 600 MHz. As amostras foram processadas usando CD₃OD como solvente. Os espectros RMN de ¹H, ¹³C, HMBC, HSQC e TOCSY foram registrados para CIIb (**2**) e para as outras substâncias isoladas. A determinação da massa de CIIb (**2**) foi realizada por FT-ICR-MS, em equipamento FTMS Solarix (Bruker) equipado com uma fonte ESI. Utilizando concentrações de 0,5 ppm em MeOH grau LC-MS. A amostra (0,5 ppm em MeOH grau LC-MS) foi injetada nas seguintes condições; temperatura do capilar 200 °C, 4,5 kV na fonte, tube lens –20 V, fluxo de gás de secagem 3 L/min e fluxo de amostra de 5 µL/h, com 50 varreduras de aquisição e tempo de retenção de íons de 0,5 s. A fragmentação foi realizada por CID com argônio (14 eV).

Triagem fitoquímica de Fito-Ison-EtOH e Fito-Ison-EtOAc por APCI-IT-MSn

Inicialmente, cada fitopreparado (10 mg) foi dissolvido em 1,5 mL MeOH/H₂O 85:15 v:v e efluído através de cartucho C18 (STRATA™, C18-E, Phenomenex) com mais 2 mL da mesma mistura de solventes. O eluato obtido foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura fixa de 40 °C.

Em seguida, cada fitopreparado foi redissolvido em MeOH grau LC-MS para gerar soluções de concentração de 5 ppm, que foram filtradas em membrana de PVDF de 0,22 µm.

Cada fitopreparado foi injetado no equipamento Thermo LTQ-XL equipado com APCI e analisador ion-trap operando no modo negativo, com fluxo de injeção de 10 µL/min, temperatura capilar de 320 °C, tube lens –124 V, 1,5 kV e 5 µA na fonte e 15 unidades arbitrárias de gás. A fragmentação foi realizada pelo método CID usando hélio para ativação iônica e energia de colisão de 30 eV.

Quantificação de CIIb (2**) por FT-ICR-MS/MS**

Este método de quantificação consiste em construir uma curva de calibração baseada na intensidade de um dos sinais da fragmentação do analito (CIIb (**2**)). Após determinarmos o padrão de fragmentação de CIIb (**2**) por FT-ICR-MS/MS, escolhemos como sinal o de *m/z* 387.2526 (Anexo 2) por ser o fragmento mais

abundante, e determinar as massas, proporções e intensidade dos fragmentos sob condições controladas em diferentes concentrações [45–48].

As soluções para a quantificação de CIIb (**2**) nos fitopreparados, pelo método de adição do padrão [49], foram preparadas da seguinte maneira: Foram preparadas 8 soluções de 1 ppm para Fito-Ison-EtOAc e 2 ppm para Fito-Ison-EtOH. A cada uma das soluções dos fitopreparados foram acrescentados; 0,0049 µg, 0,0098 µg, 0,0195, µg 0,0391 µg, 0,0781 µg, 0,1562 µg e 0,3125 µg de CIIb (**2**), deixando uma solução sem CIIb (**2**) adicionado (0,0000 µg). Em seguida, a curva de calibração para cada um dos fitopreparados foi construída a partir da injeção das respectivas soluções seriais de cada fitopreparado, registrando-se a intensidade do sinal de m/z 387.2526 [45–48], sob as seguintes condições; temperatura de 200 °C em capilar, 4.5 kV na fonte, tube lens a –20 V, fluxo de gás de secagem a 3 L/min e fluxo de amostra de 5 µL/h com 50 varreduras de aquisição com tempo de retenção de íons de 0,5 s. A fragmentação foi realizada por CID com argônio, a 14 eV. As curvas de calibração foram construídas usando o pacote Microsoft Office 2019 Excel.

Atividade Biológica *In vitro* de Fitopreparados e CIIb (2)

Cultura celular

Para as linhas celulares HeLa (câncer do colo do útero humano), A549 (carcinoma do pulmão humano), LS180 (carcinoma do cólon humano) e ARPE19 (retina humana), foi utilizado o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado ao 10 % com soro fetal bovino (D10F). O meio de cultura RPMI 1640 suplementado ao 10% com soro fetal bovino (RPMI10F) foi utilizado para a linha celular MDA-MB-231 (câncer de mama triplo negativo). As células foram cultivadas em uma incubadora a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e manipuladas em condições estéreis em capela de fluxo laminar com filtros HEPA de nível 2 de biossegurança.

Ensaio de proliferação celular pelo método do MTT

De cada um dos fitopreparados e CIIb (**2**) foram preparadas soluções de 40 mg/mL em DMSO, a partir das quais foram preparadas soluções seriais abaixo de

100 µg/mL. As soluções de cisplatina foram preparadas diretamente no meio de cultura isento de suplementos e soros, em concentrações seriadas abaixo de 50 µg/mL. A solução de trabalho de MTT foi preparada dissolvendo 5 mg de MTT em 1 mL de PBS 1X e filtrando em membrana de PVDF (0,22 µm) sob condições estéreis.

Uma suspensão de células de 200.000 células/mL foi preparada no meio de cultura correspondente a cada linha celular, e 10.000 células foram distribuídas em cada poço de uma placa de 96 poços. As células foram incubadas por 24 h. Após o tempo decorrido, 50 µL das soluções seriadas foram adicionados a cada um dos poços e a placa foi incubada, de acordo com o tempo de cada experimento, 24 h, 48 h e 72 h, sob condições de cultivo. Posteriormente, o meio de cultura foi removido das placas, os poços foram lavados com PBS1X. Subsequentemente, foram acrescentados 100 µL de meio de cultura com solução de MTT (9:1). A placa foi incubada por 4 h, sob condições de cultivo. Após 4 h, os cristais de formazán foram dissolvidos com 100 µL de álcool isopropílico acidificado, após 10 min de incubação, a leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro de placas, configurada para leitura dual, aos comprimentos de onda de 630 nm e 570 nm. Os cálculos correspondentes foram feitos no pacote Excel do Microsoft Office 2019.

Western blot de HeLa pós-tratamento com fitopreparados e Cllb (2)

Os anticorpos utilizados para estes ensaios foram: Anticorpo GAPDH Santa Cruz (SC-20357) a 1:200, anticorpo p-STAT3 (phospho Tyr705) Genetex (GTX118000) a 1:1000, anticorpo p-JAK2 (phospho Tyr1007/1008) Genetex (GTX61122) a 1:500, anticorpo Bcl-2 Santa Cruz (SC-7382) em 1:200, anticorpo Caspase-3 Santa Cruz (SC-65497) em 1:200, anticorpo Nrf2 Santa Cruz (SC-722) em 1:200 e anticorpo Claved-caspase-9 (Asp330) Cell Signaling (9501p) a 1:1000. As diluições dos anticorpos são feitas em TBS1X, 0,1% de tween 20 (TBS-T) e 5% de nonfat dry milk (Blotting Glade Blocker, Bio-Rad). A partir de cada um dos fitopreparados e de Cllb (2), foram preparadas soluções a 40 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO), a partir das quais foram preparadas soluções de 30 µM para Cllb (2), 30 µg/mL de Fito-Ison-EtOAc e 50 µg/mL de Fito-Ison-EtOH. A solução de cisplatina de 30 µM foi preparada diretamente no meio de cultura DMEM sem suplementos.

As células HeLa são cultivadas em frascos de cultura de 25 cm³ por 24 h em condições de cultura; posteriormente, o meio de cultura é descartado e substituído pelo que contém os tratamentos nas concentrações correspondentes, para cada teste. Após o tempo de incubação determinado para cada experimento e das proteínas a serem avaliadas, as células são colhidas com tripsina EDTA a 0,25% e centrifugadas com tudo e sobrenadante por 7 min a 1700 RPM. Usando um leito de gelo, os seguintes procedimentos foram realizados: o sobrenadante é descartado, o pacote de células é ressuscitado em tampão de lise com inibidores de fosfatase e protease; a solução é misturada em vórtice e centrifugada a 14.000 RPM por 30 min, o sobrenadante é recuperado e as proteínas são quantificadas pelo método de Bradford.

No gel de SDS 12% foram colocados 30 µg de proteína das amostras misturadas com tampão de carregamento. A transferência foi realizada em membranas de PVDF e o bloqueio com 5% de nonfat dry milk TBS-T. Os anticorpos foram incubados usando como solvente TBS-T nonfat dry milk 5%, seguido por três lavagens em membranas com TBS-T e incubação com anticorpos secundários conjugados com HRP utilizando nonfat dry milk com TBS-T 5%.

Ciclo celular por citometria de fluxo

As células HeLa foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm³ por 24 h e, posteriormente, os tratamentos foram adicionados a 30 µM para Cllb (2), 30 µg/mL de Fito-Ison-EtOAc, 50 µg/mL de Fito-Ison-EtOH e 30 µM de cisplatina, este último preparado diretamente no meio de cultura DMEM sem suplementos. As células tratadas foram incubadas por um período de 24 h. Após o tempo de incubação, as células foram colhidas com tripsina, lavadas com PBS 1X e fixadas com EtOH a 70%. Para esta análise, foi utilizado o kit The Muse® Cell Cycle, uma solução composta de iodeto de propídio e RNase A, que foi adicionada às células previamente lavadas com PBS 1X, a suspensão celular foi deixada em incubação por 30 minutos com a solução The Muse® Cell Cycle, e as leituras foram feitas no Guava® Muse® Cell Analyzer.

Imunofluorescência de p21

Brevemente, $1,2 \times 10^6$ células HeLa foram distribuídas em uma placa de 24 poços, com uma lamela circular no fundo de cada poço. A placa foi cultivada por um período de 24 horas e, em seguida, os tratamentos foram adicionados nas mesmas concentrações usadas nos testes de Western blot. Os tratamentos foram removidos após 48 h, o meio de cultura foi adicionado aos poços sem tratamentos e para em um período de incubação de 72 h. Após o último período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS1X e fixadas com PBS1X ao 4 % de formaldeído por 20 min. No final da fixação com o formaldeído, as células foram lavadas três vezes com PBS1X a 1% de BSA para subsequentemente permeabilizar e bloquear com uma solução de bloqueio em PBS1X e 1% de BSA por 45 min. Após permeabilização e bloqueio, as células foram incubadas durante a noite com anti-p21 1:200 à temperatura de 2 a 8 °C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes por cinco minutos com PBS1X e BSA a 1% e incubadas com o anticorpo secundário, Alexa Fluor 594 fluorocromo 1:1000 por 60 minutos. No final da incubação com o fluorocromo, as células foram lavadas novamente três vezes com PBS1X e BSA a 1%. As lamelas foram cobertas com solução DAPI 1:1000, montadas em uma lâmina e seladas nas extremidades. As observações foram feitas em um microscópio de fluorescência Carl-Zeiss.

Atividade Antitumoral *in vivo* por xenoenxertos de Linha Celular HeLa em Camundongos Atímicos nu/nu

Dez camundongos foram separados por grupo, formando um total de cinco grupos divididos em: Grupo 1 de DMSO a 2%, Grupo 2 de cisplatina a 2 mg/kg, Grupo 3 de Cilb (2) a 5 mg/kg, Grupo 4 de Fito-Ison-EtOAc a 20 mg/kg e Grupo 5 de Fito-Ison- EtOH a 30 mg/kg. Camundongos atímicos da linhagem nu/nu de 4 semanas foram xenotransplantados, na região subcutânea da parte superior do dorso, com 200 µL de uma solução HeLa de 5×10^6 células/mL. Após o tumor atingir as dimensões de 100 mm³, os tratamentos foram iniciados. Foi considerado um peso de 20 g para cada camundongo, administrando 200 µL de cada tratamento a cada três dias durante 15 dias. A administração dos tratamentos foi realizada por via subcutânea na superfície inferior do tumor, dentro da capela de fluxo laminar. Os camundongos foram mantidos

em biotério de biossegurança nível 3, em caixas com filtros de ar HEPA, temperatura controlada a 25 °C, comida e água *ad libitum* e ciclos de 12 h claro/escuro. O monitoramento do volume tumoral foi realizado com a ajuda de um vernier, usando a fórmula de $v = c (l^2/2)$, onde v = volume, c = comprimento e l = largura.

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

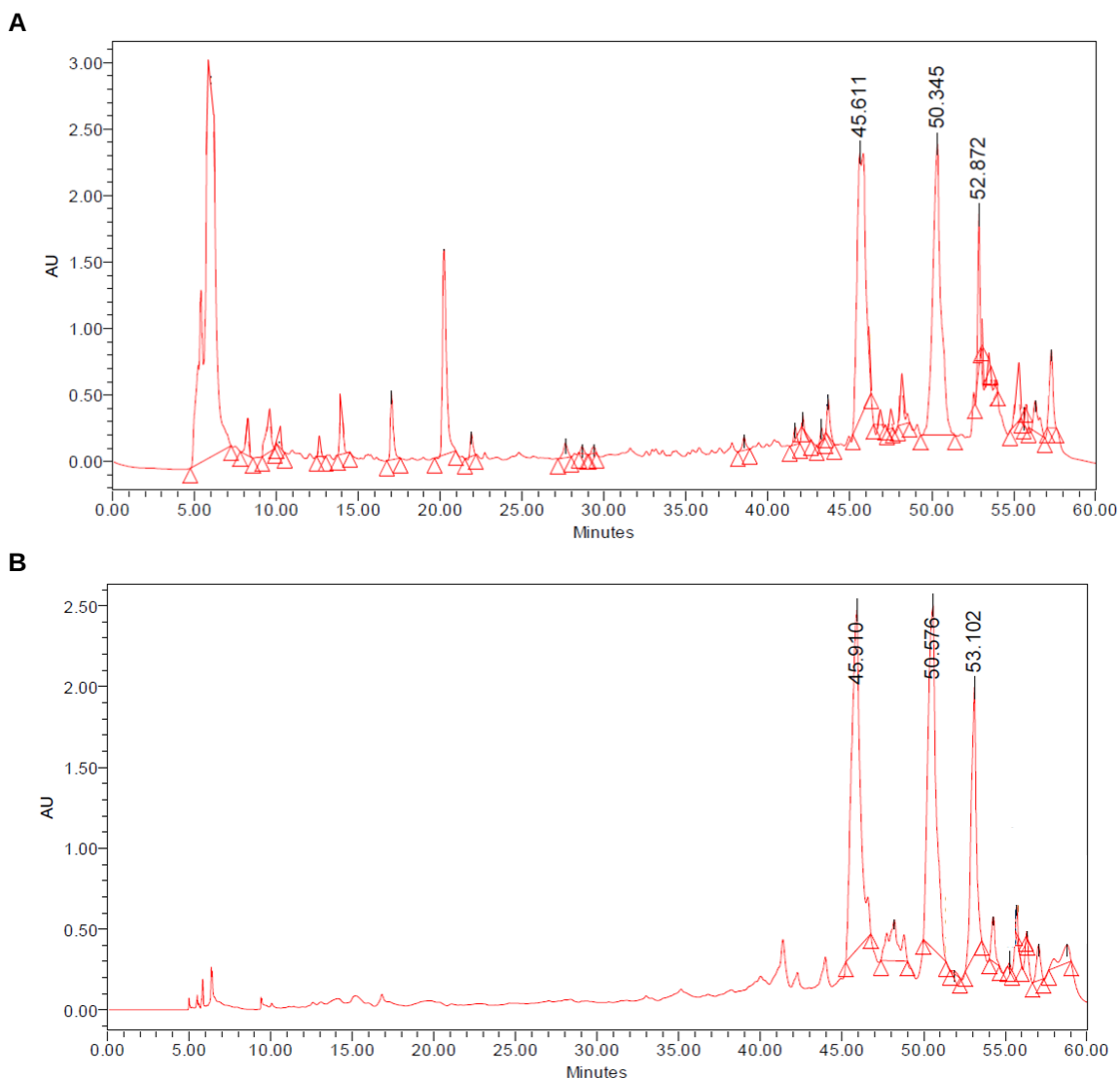
Obtenção dos fitopreparados

Os produtos naturais para fins medicinais podem ser obtidos de várias maneiras, que dependem do uso terapêutico para o qual serão utilizados [50]. A forma de administração de *I. sonorae* na medicina natural é oral, em cápsulas, que contêm o pó da raiz seca. No entanto, devido à identificação de algumas substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de tumores em um modelo murinho, como o CIIb (2) [7], foi planejado obter dois fitopreparados: um que retém a integridade fitoquímica da planta e outro, em que o conteúdo de cucurbitacina, na forma de genina, seja maior. Para obter esses dois fitopreparados, foram usados dois diferentes métodos de extração do pó da raiz seca. Para obter um fitopreparado com características fitoquímicas mais próximas daquelas da planta, foi utilizada a percolação com EtOH 70%, denominado “Fito-Ison-EtOH”. Para obter um fitopreparado com maior conteúdo de cucurbitacinas foi utilizada a extração por maceração com EtOAc e denominado “Fito-Ison-EtOAc”.

O rendimento obtido a partir do pó liofilizado foi de 16% para Fito-Ison-EtOH e 2% para Fito-Ison-EtOAc. Essa diferença provavelmente é devido ao fato de que a percolação é muito mais eficiente, devido ao contínuo fluxo de solvente não saturado na matriz vegetal [51]. Além disso, o Fito-Ison-EtOH tende a ser um fitopreparado mais complexo do que Fito-Ison-EtOAc devido à alta polaridade das cucurbitacinas presentes em *I. sonorae*, o que pode ser constatado pelos cromatogramas (210 nm) de cada fitopreparado (Figura 3).

Ambos cromatogramas apresentam separação praticamente de linha base. Contudo, no cromatograma de Fito-Ison-EtOAc as substâncias começam a eluir

apenas a partir de 40 min, enquanto que no de Fito-Ison-EtOH elas eluem a partir dos 5 min. Após 44 min, observam-se três picos de maior intensidade com tempos de retenção de aproximadamente 45 min, 50 min e 53 min.



Superior: Fito-Ison-EtOH; Inferior: Fito-Ison-EtOAc; 210 nm

Figura 3. Cromatogramas comparativos dos fitopreparados de *Ibertvillea sonorensis*

Identificação das substâncias isoladas de Fito-Ison-EtOH

Para determinar a natureza química das três substâncias, foram realizados NMR (Anexo 1) de ^1H , DEPTQ, TOCSY, HMBC e HSQC assim como espectrometria de massa de alta resolução, FT-ICR-MS (Anexo 2).

A Kinoína A diglicosídeo (**1**) e a cucurbitacina CIIb (**2**) isoladas de Fito-Ison-EtOH tiveram seus dados espectrométricos comparados com aqueles anteriormente publicados [8,17,18,52].

A estrutura da substância **3** foi determinada pelos experimentos ^1H , DEPTQ, HSQC, HMBC y TOCSY de RMN (Tabela 1, Anexo 3), pelos quais foram observados deslocamentos químicos semelhantes aos de **1**. As principais diferenças entre **1** e **3** encontram-se na cadeia lateral da cucurbitacina, especificamente nos carbonos C-22, C-23, C-24, C-25, C-27 e seus respectivos prótons (Tabela 1). O deslocamento químico de C-22 em **1** (δ 215,8) é característico da presença de um grupo cetona, enquanto que em **3** o deslocamento químico (δ 80,6) é característico de um álcool. Adicionalmente, os carbonos C-23 (δ 128,2) e C-24 (δ 134,4), e seus respectivos prótons H-23 (δ 5,77) e H-24 (δ 6,33), em **3** são característicos da presença de uma ligação dupla (Δ^{23}). Dois sinais adicionais em δ 141,6 e δ 115,5 são característicos também de uma ligação dupla terminal entre C-25 e C-27 ($\Delta^{25, 27}$), respectivamente.

Tabela 1. Dados espectrométricos de RMN da cucurbitacina **3**^{a, b}

Posição	^{13}C	^1Ha (J Hz)	^1Hb (J Hz)	Posição	^{13}C	^1Ha (J Hz)	^1Hb (J Hz)
1	24,6	0,88 (s)	1,54 (m)	22	80,6	4,03 (d, 6,1)	
2	26,4	1,54 (m)	1,77 (d, 3,5)	23	128,2	5,77 (dd, 6,1, 15,8)	
3	83,0	3,21 (s)		24	134,4	6,33 (d, 15,8)	
4	41,2			25	141,6		
5	142,4			26	17,5	1,83 (s)	
6	118,1	5,70 (d, 5,4)		27	115,5	4,92 (s)	
7	23,4	1,93 (dd, 5,4, 18,0)	2,34 (m)	28	21,5	0,94 (s)	
8	42,9	1,85 (m)		29	22,7	1,85 (s)	
9	47,7			30	18,1	1,25 (s)	
10	35,1	2,33 (s)		1'a	99,5	4,29 (d, 7,7)	
11	215,7			2'a	75,3	3,38 (m)	
12	48,7	2,42 (m)	3,13 (m)	3'a	76,2	3,15 (m)	
13	56,9			4'a	78,7	3,44 (dt, 9,0, 16,7)	
14	51,2			5'a	70,7	3,21 (t, 9,3)	
15	44,3	1,45 (d,13,2)	1,77 (dd, 9,3, 13,2)	6'a	61,6	3,60 (dd, 5,4, 11,5)	3,78 (d,11,5)
16	68,0	4,65 (m)		1'b	99,8	5,31 (s)	
17	55,4	2,33 (d, 6,7)		2'b	70,8	3,82 (dd, 1,6, 3,2)	
18	19,0	0,85 (d, 6,0)		3'b	70,6	3,60 (m)	
19	18,9	0,97 (s)		4'b	72,7	3,34 (m)	
20	75,8			5'b	71,0	4,58 (m)	
21	24,0	1,14 (s)		6'b	17,0	1,12 (s)	1,13 (d,1,9)

^a Os deslocamentos químicos são expressados em valores δ (ppm). TMS foi utilizado como referência interna.
^b Aquisição do espectro foi realizada em CD_3OD .

Outros sinais importantes de correlação da substância **3** são observados entre o próton anomérico da glucose (H-1', δ 4,29) e C-3 da aglicona (δ 83,0), entre o próton anomérico da rhamnose (H-1'', δ 5,31) e o C-2' (δ 75,3) da glucose e entre o C-25 da aglicona (δ 115,5) e os prótons H-24 (δ 6,33) e H-26 (δ 1,83) (Figura 4).

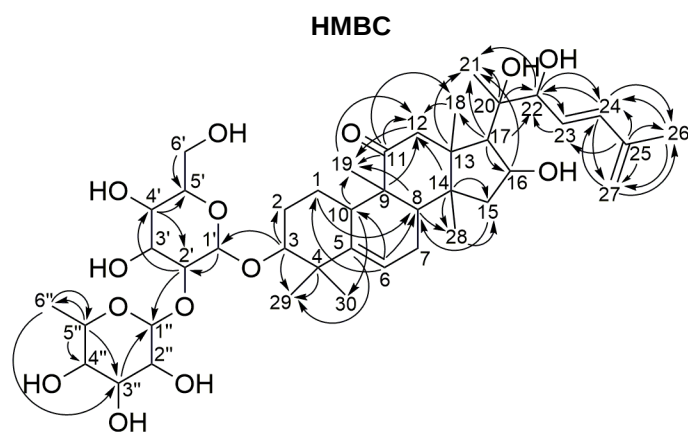
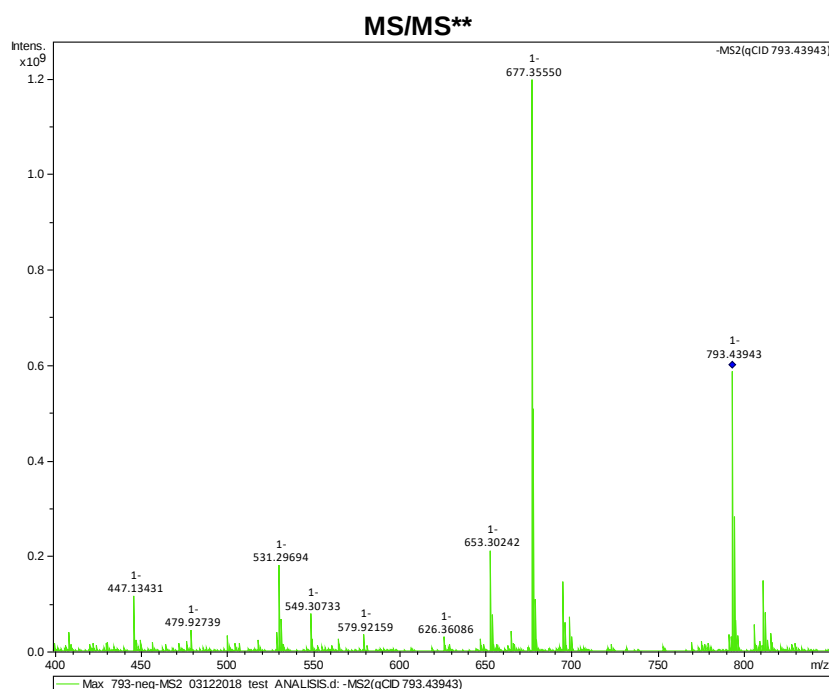
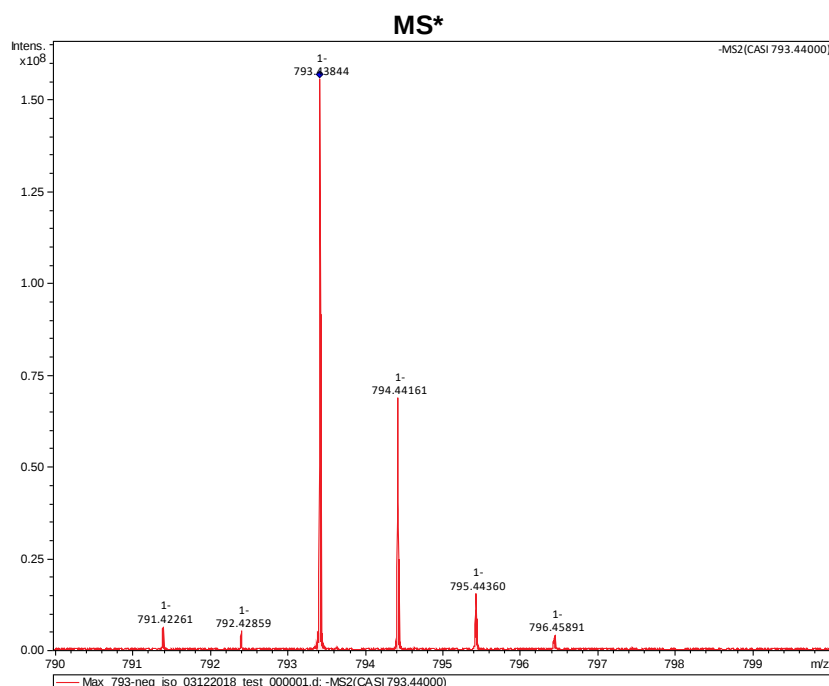


Figura 4. Correlações HMBC para a cucurbitacina **3**

Finalmente, a massa isotópica da molécula desprotonada m/z 793,4384 $[M-H]^-$, obtida da substância **3** por FT-ICR-MS (Figura 5), coincide com a fórmula molecular em seu estado ionizado, $C_{42}H_{65}O_{14}$ (793,4380), com erro aceitável de 0,5 ppm entre o valor teórico e o resultado experimental [53]. A fragmentação MS_2 do íon precursor m/z 793,4384 $[M-H]^-$ gerou o íon produto de m/z 793,4384 $[M-C_6H_{12}O_2-H]^-$, correspondente à fragmentação da cadeia lateral do triterpeno. Portanto, a substância **3** foi caracterizada como sendo a nova cucurbitacina **3**: “3-((-4,5-diidroxi-6-(hidroximetil)-3-((-3,4,5-triidroxi-6-metiltetraidro-2H-piran-2-il)oxi)tetraidro-2H-piran-2-il)oxi)-17-((E)-2,3-diidroxi-6-metilepta-4,6-dien-2-il)-16-hidroxi-4,4,9,13,14-pentametil-1,2,3,4,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-11H-ciclopenta[a]fenantren-11-ona”.



* MS; m/z 793,4384 $[M-H]^-$, → **MS/MS; m/z 677,3555 $[M-C_6H_{12}O_2-H]^-$ y m/z 531,2969 $[M-C_{12}H_{22}O_6-H]^-$.

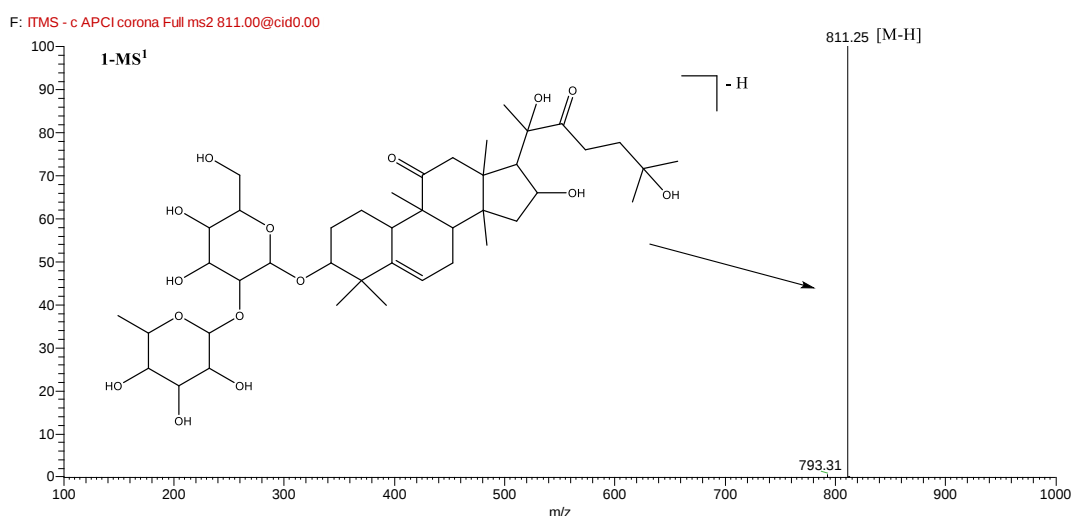
Figura 5. Espectro FT-ICR-MS da cucurbitacina 3

Identificação de substâncias em Fito-Ison-EtOH e Fito-Ison-EtOAc por APCI-IT-MSn

A espectrometria de massa é uma das ferramentas mais importantes na pesquisa fitoquímica de produtos naturais. Essa técnica permite identificar, através da massa e do padrão de fragmentação das substâncias, os substâncias contidos nas

amostras [54]. Entre as técnicas de espectrometria de massas, é necessária uma fonte para a ionização das amostras. Existem diferentes tipos de fontes de ionização, a mais comum é a ESI, que tem a capacidade de ionizar substâncias de polaridades muito diferentes. Por outro lado, também existe a fonte APCI ou ionização química à pressão atmosférica, esse tipo de ionização é utilizado para substâncias de natureza menos polar, como os triterpenos. Nesta investigação, após testar os dois tipos de fontes de ionização, a APCI no modo negativo, foi a que apresentou os melhores resultados, podendo assim identificar três triterpenos não glicosilados, que não conseguimos identificar usando a fonte de ionização ESI, e quatro triterpenos com unidades sacarídicas, ou seja, um total de sete substâncias identificadas por APCI-IT-MSn.

A fragmentação MS₂ do íon precursor m/z 811 [M-H]⁻ da substância **1** (Figura 6) gerou íon produto de m/z 793 [M-18-H]⁻, caracterizando a perda de uma molécula de H₂O. A fragmentação MS₃ do íon precursor m/z 793 [M-18-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 647 [M-18-146-H]⁻, indicando a perda de uma unidade de rhamnose. A fragmentação MS₄ do íon precursor de m/z 647 [M-18-146-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 485 [M-18-146-162-H]⁻, caracterizando a perda de uma unidade de glicose. Os resultados de RMN (Anexo 1) discutidos anteriormente e de FT-ICR-MS (Anexo 2), complementam a total identificação e caracterização da kinoína B diglicosídeo (**1**) [8,17].



(Continuação...)

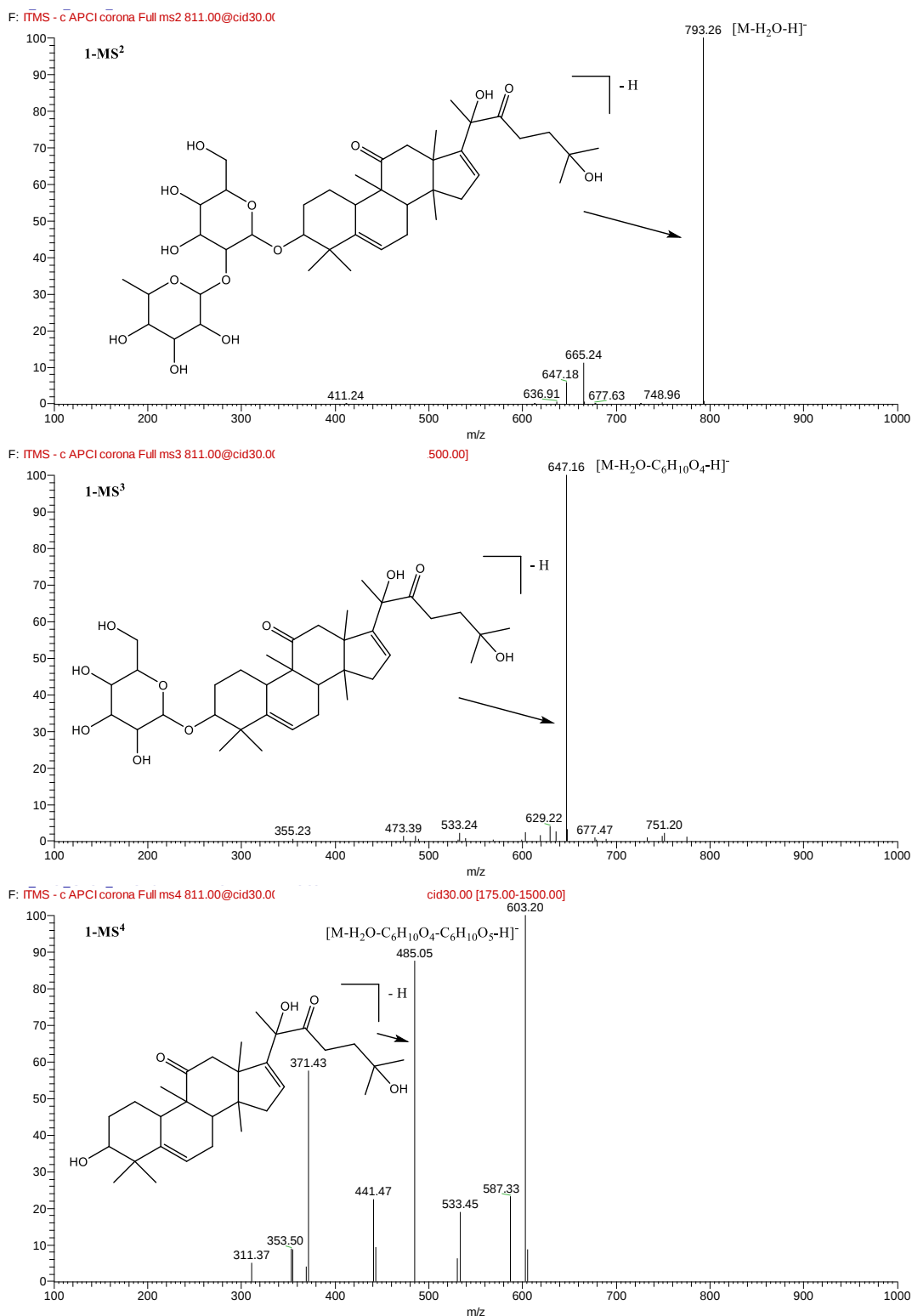


Figura 6. Padrão de fragmentação da substância **1**, kinoína B diglicosídeo (**1**).

A cucurbitacina CIIb (**2**) apresentou o íon referente à molécula desprotonada de m/z 519 [M-H]⁻. A fragmentação MS₂ do íon precursor de m/z 519 [M-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 501 [M-18-H]⁻, que representa a perda de uma molécula de H₂O.

A fragmentação MS₃ do íon precursor de m/z 501 [M-18-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 387 [M-18-114-H]⁻ (perda da cadeia lateral do triterpeno, C₆H₁₀O₂) (Figura 7).

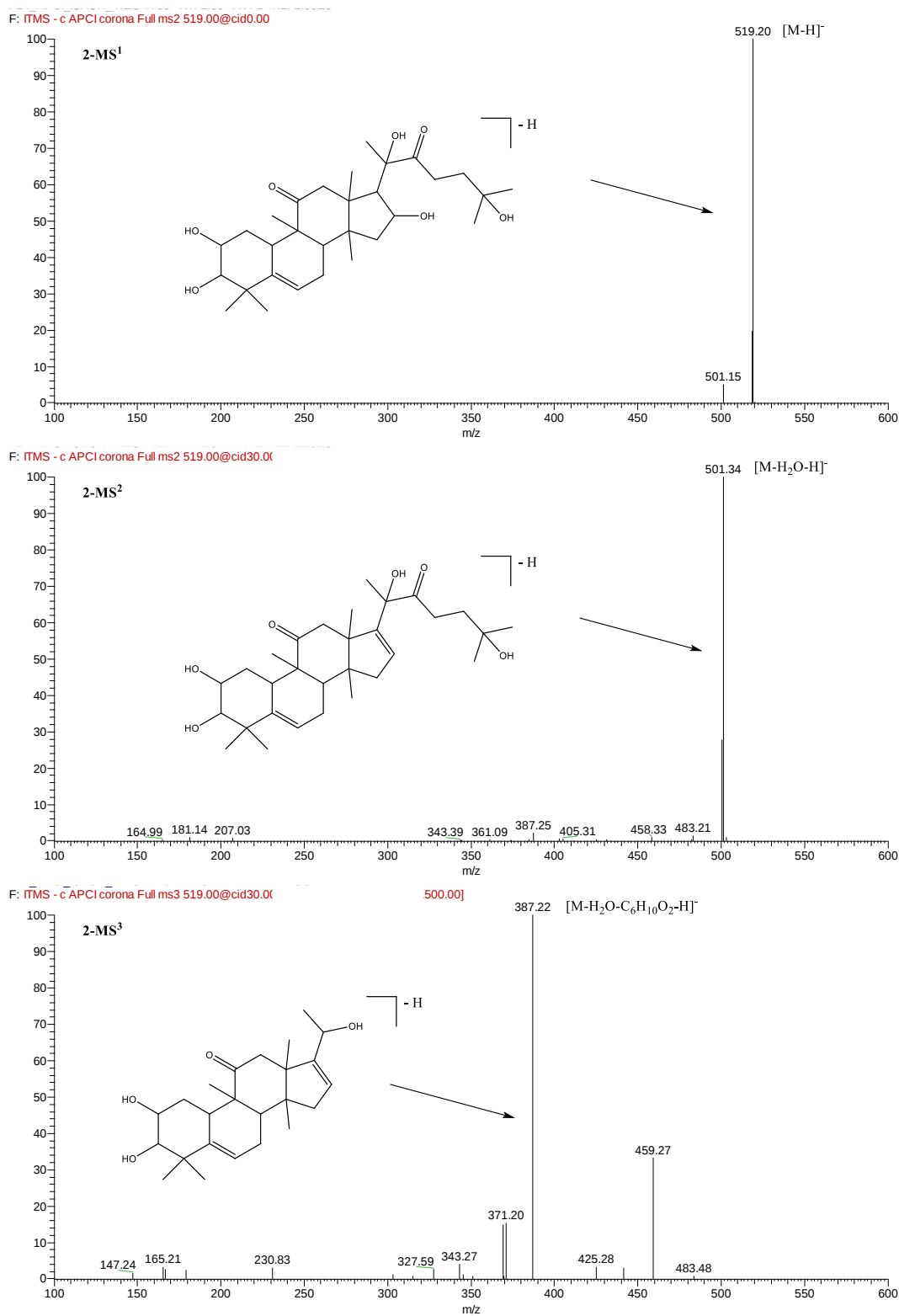
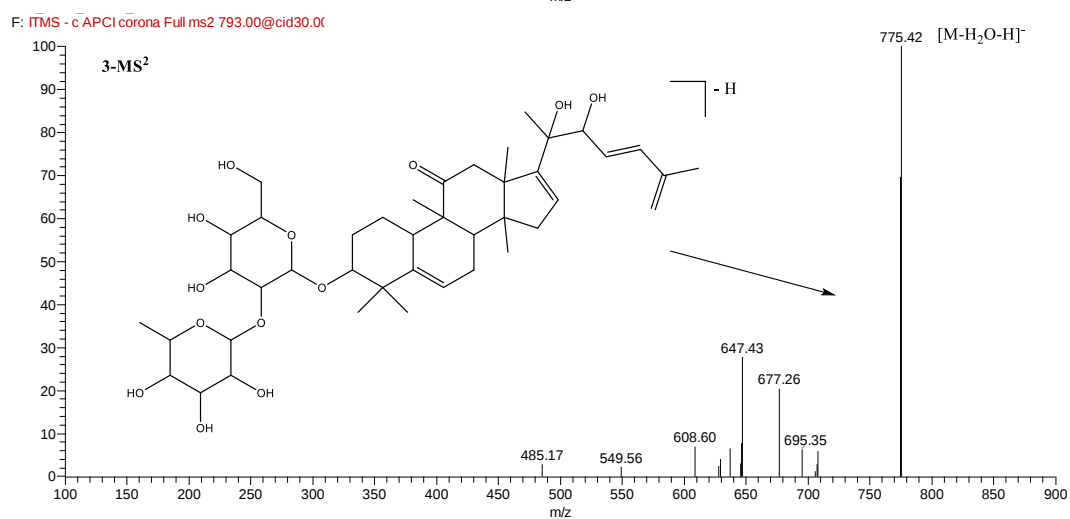
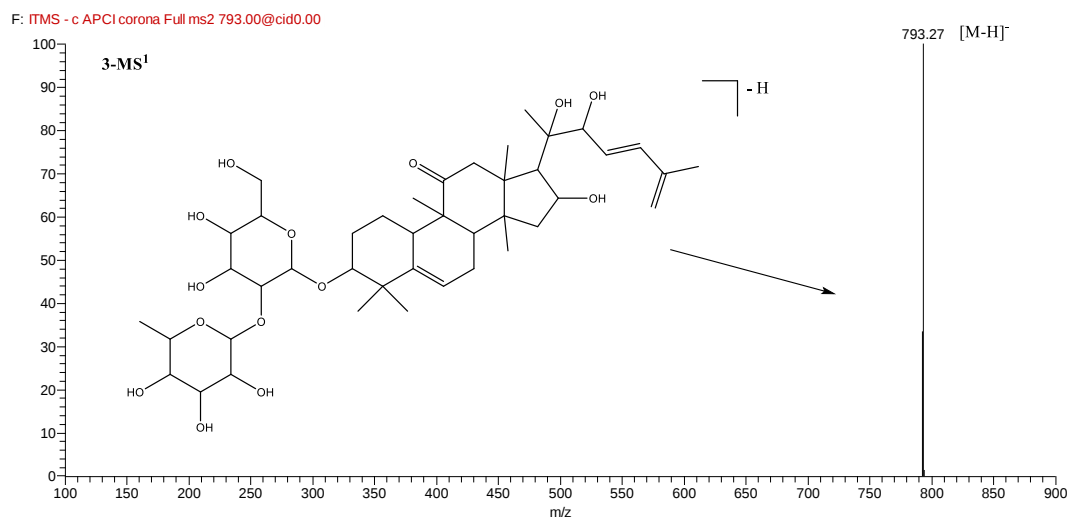


Figura 7. Padrão de fragmentação da substância 2, CIIb (2).

A substância **3** apresentou o íon referente à molécula desprotonada m/z 793 $[M-H]^-$. A fragmentação MS_2 do íon precursor de m/z 793 $[M-H]^-$ gerou íon produto de m/z 775 $[M-18-H]^-$, caracterizando a perda de uma molécula de H_2O . A fragmentação MS_3 do íon precursor de m/z 775 $[M-18-H]^-$ gerou o íon produto de m/z 629 $[M-18-146-H]^-$ (perda de uma unidade de rhamnose) (Figura 8).



(continuação...)

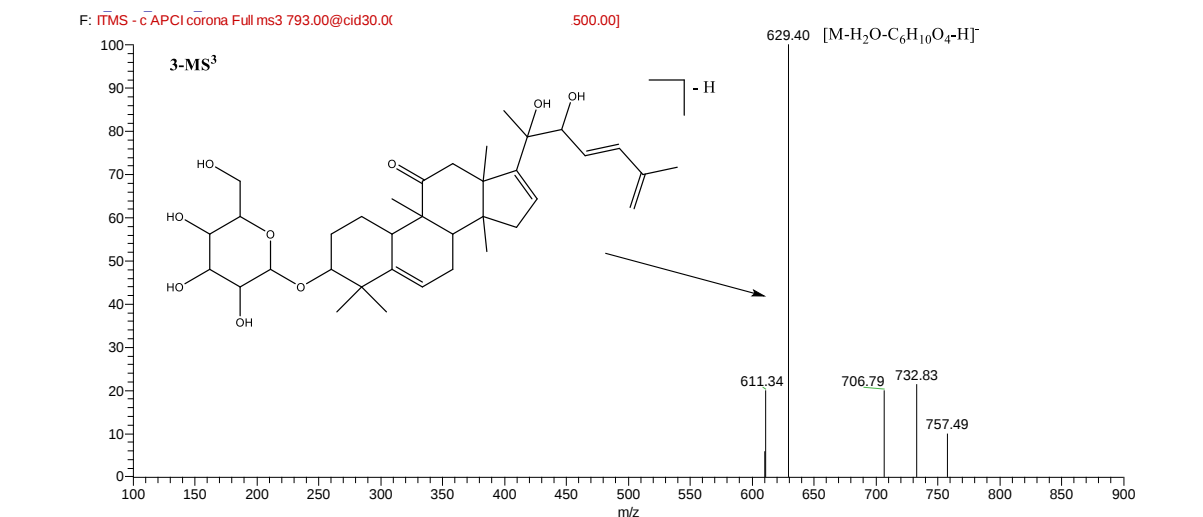
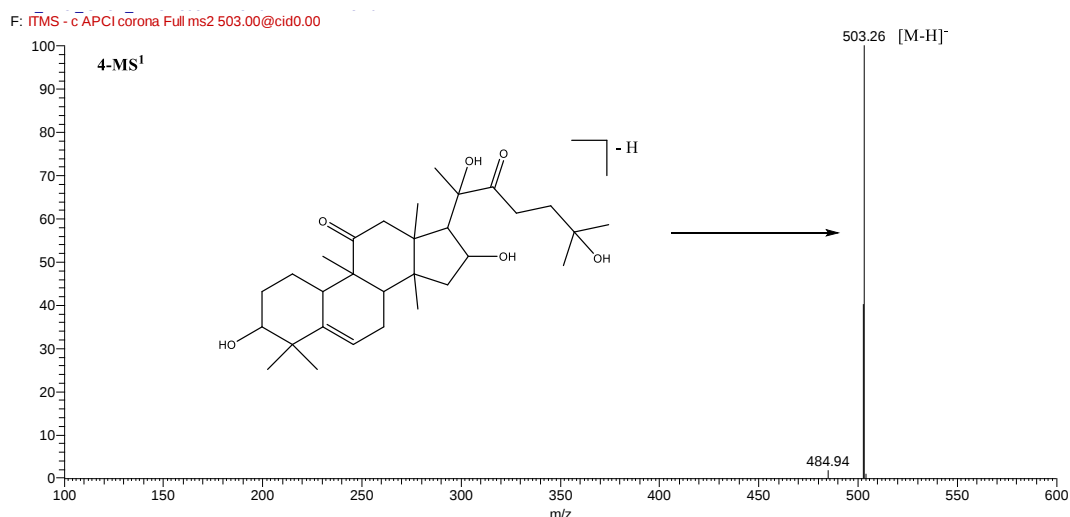


Figura 8. Padrão de fragmentação da substância 3.

Além dessas três substâncias isoladas, as análises usando APCI-IT-MSn levaram à identificação de outras substâncias conhecidas.

A fragmentação MS₂ do íon precursor de m/z de 503 [M-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 485 [M-18-H]⁻ (perda de uma molécula de H₂O). A fragmentação MS₃ do íon precursor de m/z 485 [M-18-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 371 [M-18-114-H]⁻ caracterizando a perda da cadeia lateral do triterpenos (C₆H₁₀O₂). Esse padrão de fragmentação é semelhante ao obtido para ClIb (2), o que indica que a substância 4 é a Kinoína B (Figura 9) [17].



(Continuação...)

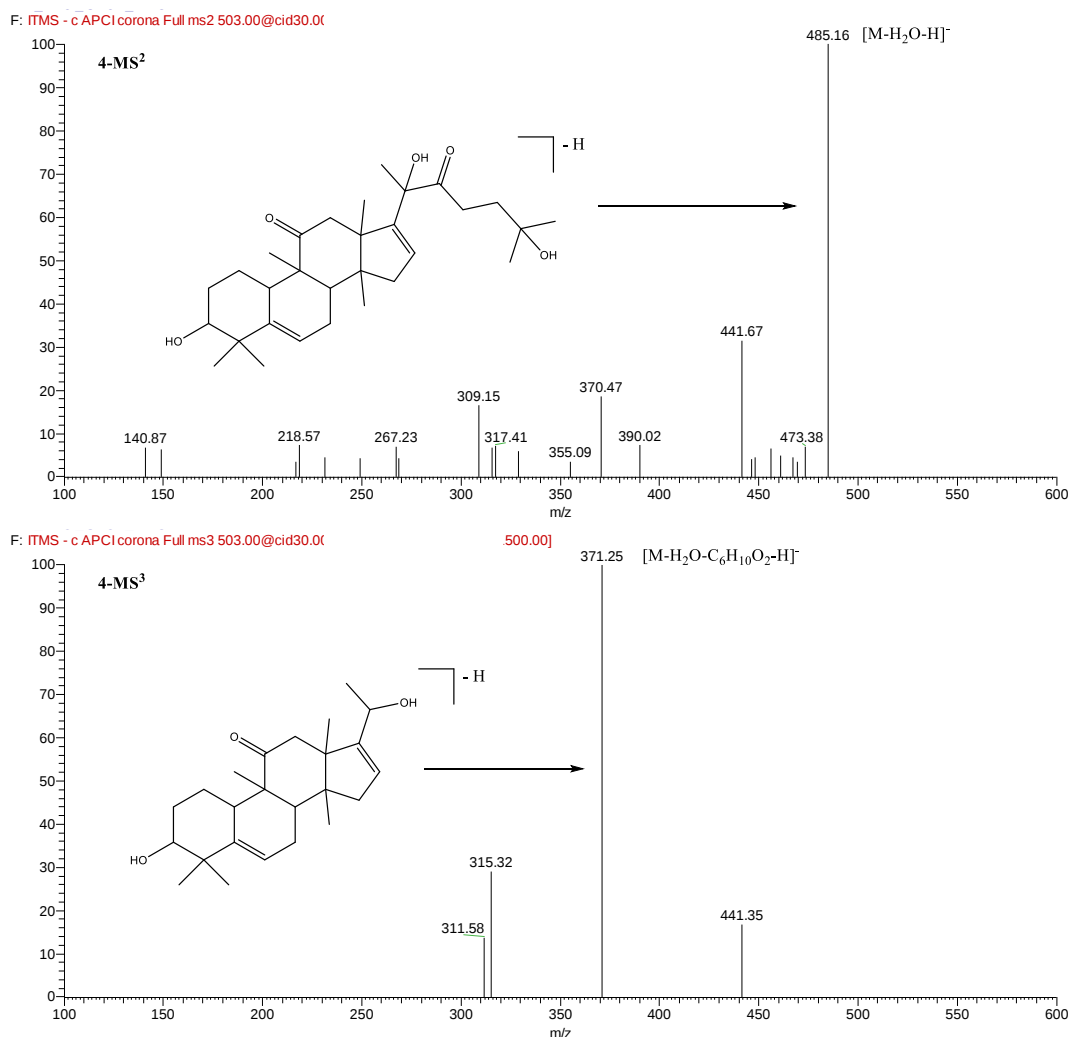


Figura 9. Padrão de fragmentação da substância **4**, kinoína B (**4**).

O espectro de massas da substância **5** apresenta o íon referente à molécula desprotona de m/z 503 [M-H]⁻. A fragmentação MS₂ do íon precursor de m/z 503 [M-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 387 [M-116-H]⁻, caracterizando a perda da cadeia lateral da cucurbitacina (C₆H₁₂O₂). Portanto, o substância **5** é a kinoína A (**5**) (Figura 10), um isômero estrutural de kinoína B (**4**), presente em *I. sonorae* [8,17].

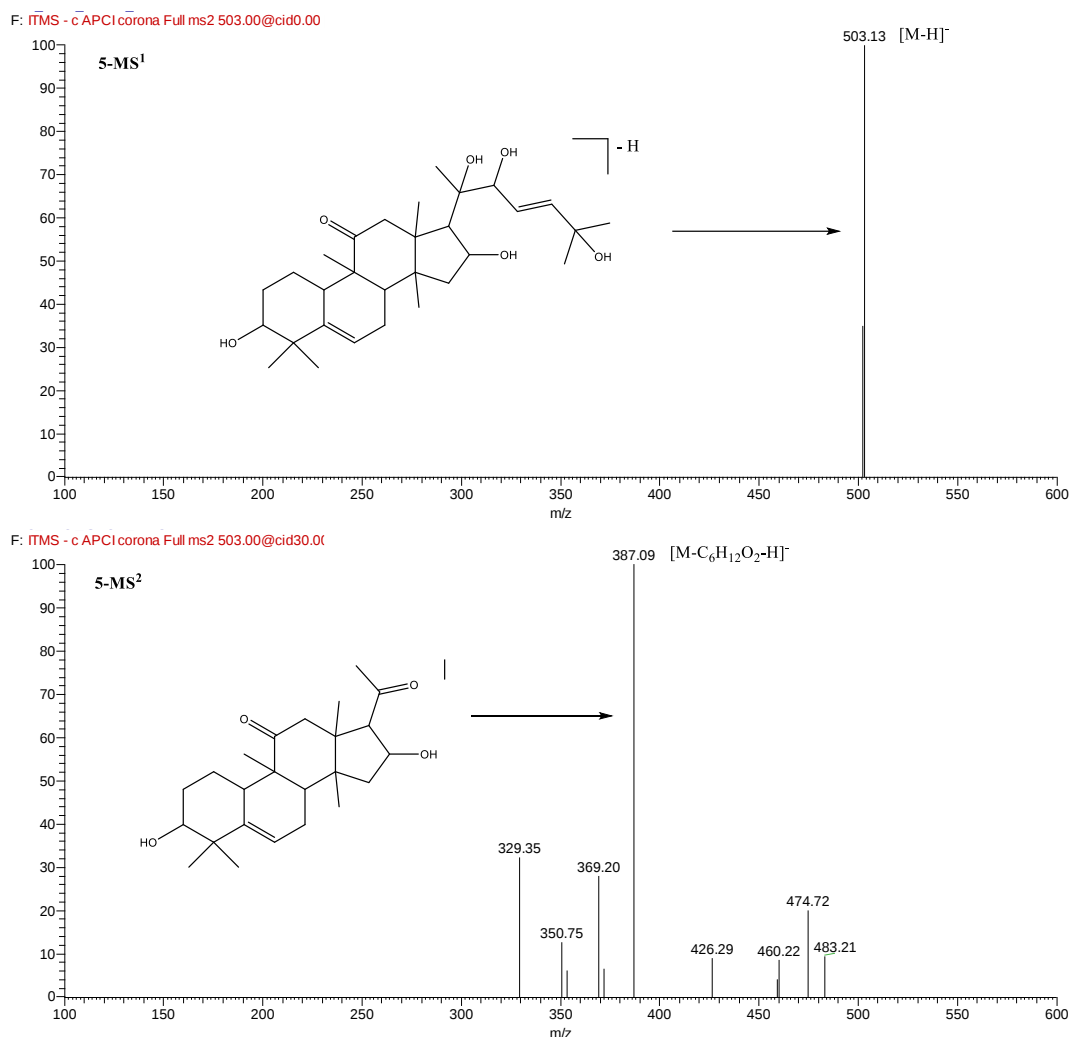


Figura 10. Padrão de fragmentação da substância **5**, kinoína A (**5**).

Fragmentação MS₂ do íon precursor m/z 665 [M-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 549 [M-116-H]⁻, caracterizando a perda da cadeia lateral de cucurbitacina (C₆H₁₂O₂). A fragmentação MS₃ do íon precursor de m/z 549 [M-116-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 387 [M-116-162-H]⁻, caracterizando a perda de uma unidade de glucose. Esse resultado indica que a substância **6** é a kinoína A glicosídeo (Figura 11), previamente identificada em *I. sonoreae* [8,17].

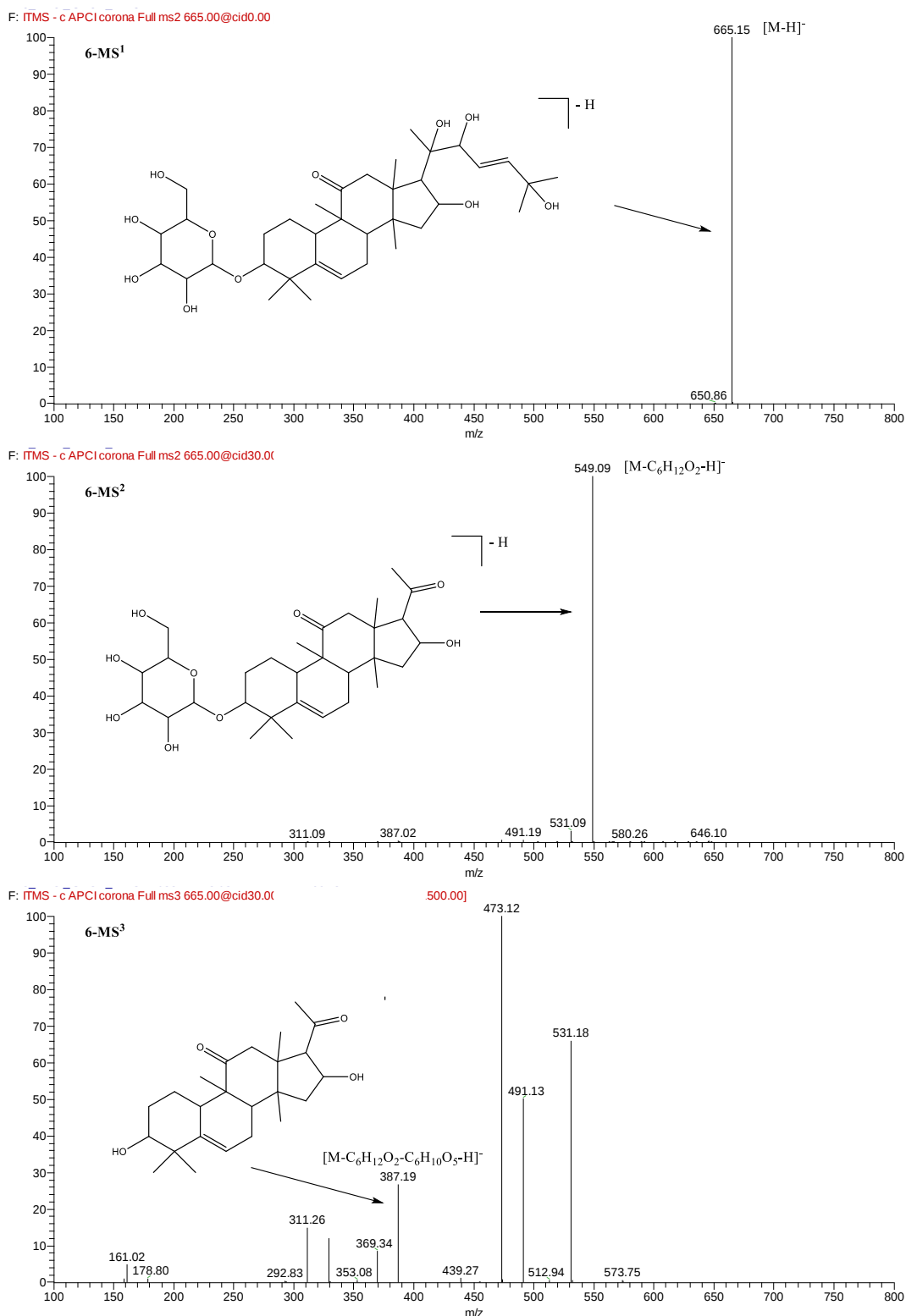
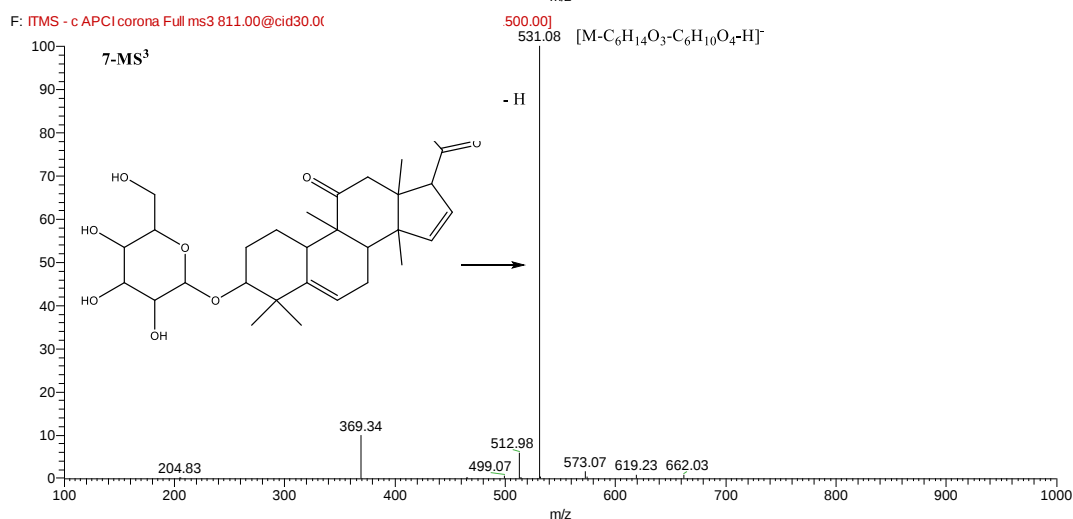
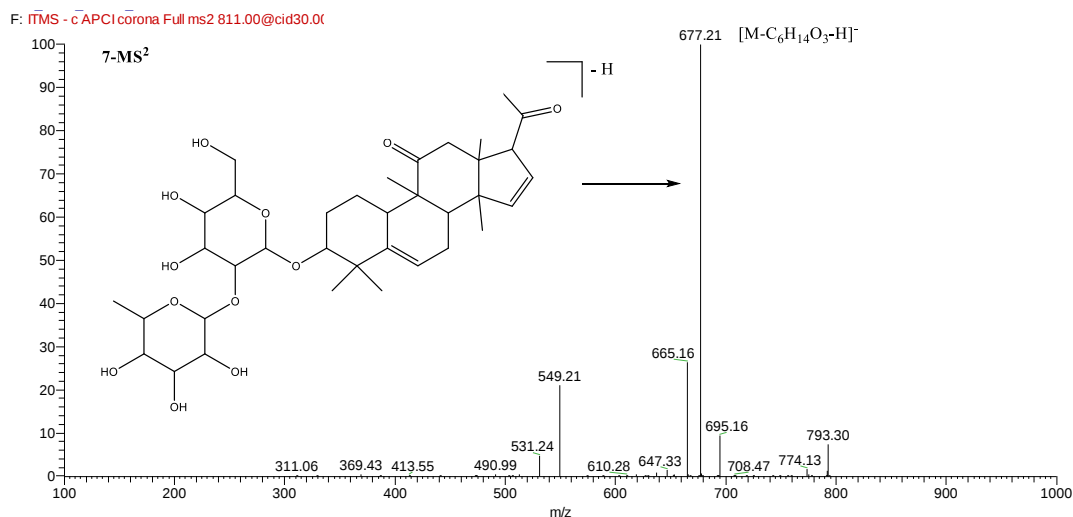
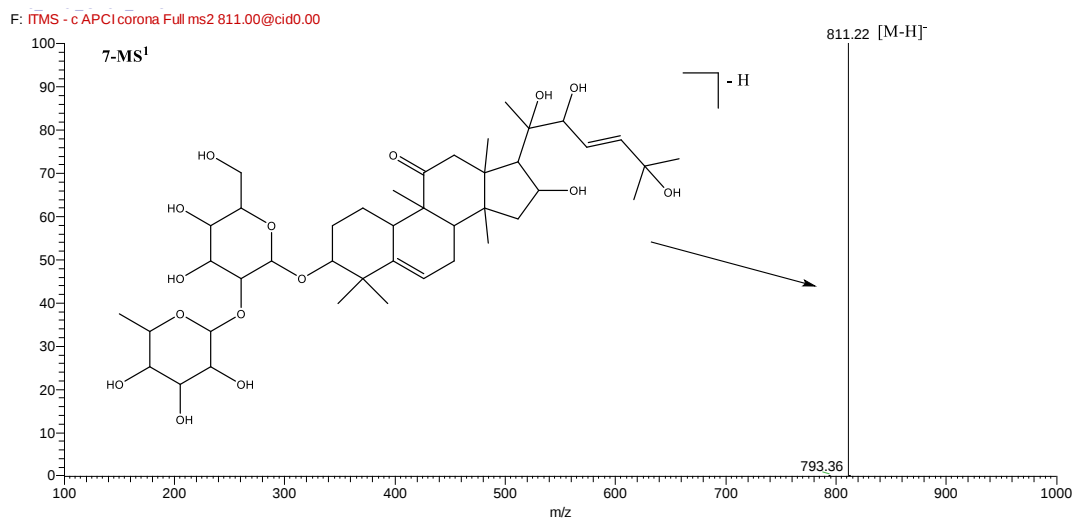


Figura 11. Padrão de fragmentação da substância **6**, kinoína A glicosídeo (**6**).

Fragmentação do íon precursor m/z 811 [M-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 677 [M-134-H]⁻, que representa a perda da cadeia lateral do triterpeno (C₆H₁₄O₃). A fragmentação MS₃ do íon precursor de m/z 677 [M-134-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 531 [M-134-146-H]⁻ caracterizando a perda de uma unidade de rhamnose. A

fragmentação MS₄ do íon precursor de m/z 531 [M-134-146-H]⁻ gerou o íon produto de m/z 369 [M-134-146-162-H]⁻ caracterizando a perda de uma unidade de glucose. Este padrão de fragmentação sugere que a substância **7** é a kinoína A diglicosídeo (Figura 12), previamente identificada em *I. sonoreae* [17].



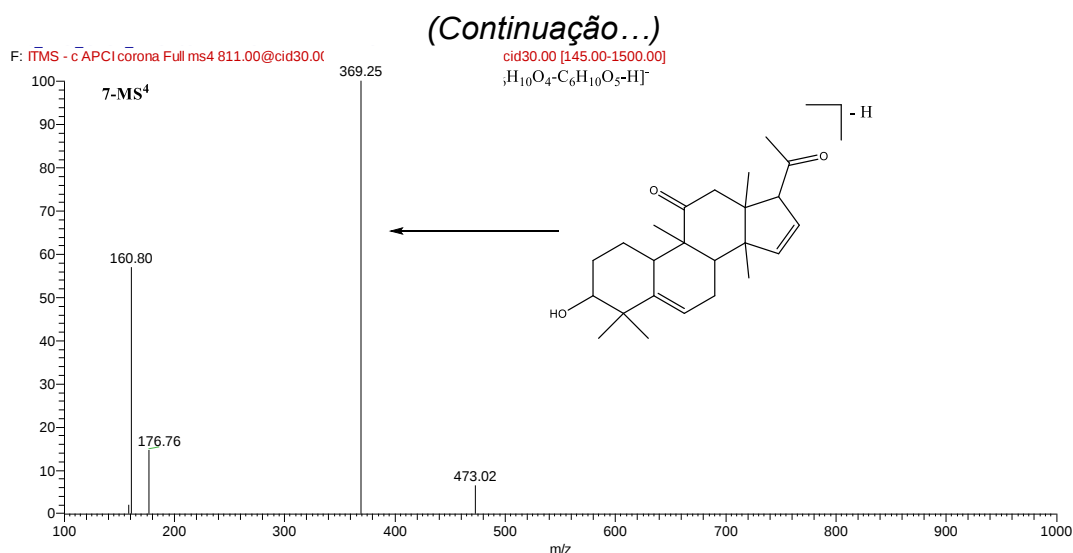
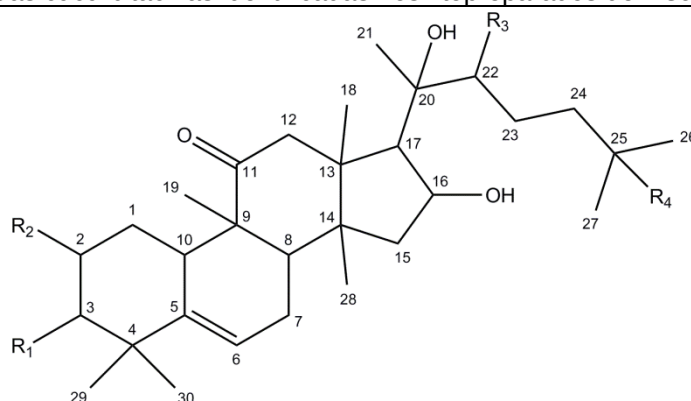


Figura 12. Padrão de fragmentação da substância **7**, kinoína A diglicosido (**7**).

Ambos fitopreparados apresentam todas as substâncias (Tabela 2).

Tabela 2. Estrutura das cucurbitacinas identificadas nos fitopreparados de *I. sonorae*.



Substância	Grupo R					
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	C23	C24
(1) KBdg ^{a, b}	O-Glu-O-Rha	H	O	OH	2H	2H
(2) ClIb (2) ^{a, b}	OH	OH	O	OH	2H	2H
(3) 3 ^{a, b}	O-Glu-O-Rha	H	OH	$\Delta^{25,27}$	H ($\Delta^{23,24}$)	H
(4) Kinoína B ^b	OH	H	O	OH	2H	2H
(5) Kinoína A ^b	OH	H	OH	OH	H ($\Delta^{23,24}$)	H
(6) KAg ^b	O-Glu	H	OH	OH	H ($\Delta^{23,24}$)	H
(7) KAdg ^b	O-Glu-O-Rha	H	OH	OH	H ($\Delta^{23,24}$)	H

^a Identificação por NMR e FT-ICR-MS/MS.

^b Identificação pelo padrão de fragmentação em APCI-IT-MSn.

KBdg: Kinoína B diglicosídeo

KAg: Kinoína A glicosídeo

KAdg: Kinoína A diglicosídeo

Quantificação de CIIb (2) nos fitopreparados de *I. sonorae* por FT-ICR-MS/MS

Um dos requisitos necessários para a caracterização de um fitoterápico é a quantificação de seus constituintes. Quando as atividades biológicas das substâncias que compõem a planta medicinal ou fitopreparado não são conhecidas, esse marcador químico pode ser uma das substâncias mais abundantes. No entanto, quando a atividade biológica de alguma das suas substâncias é conhecida, e ela estiver relacionada com a atividade do fitopreparado, é recomendável padronizar o fitopreparado de acordo com a concentração do metabólito ao qual a atividade biológica é atribuída [55]. No caso de *I. sonorae*, CIIb (2) é uma das substâncias às quais a atividade antitumoral é atribuída [7], de modo que a padronização dos fitopreparados obtidos anteriormente foi realizada com base na concentração dessa molécula.

A técnica usada para quantificar CIIb (2) foi o FT-ICR-MS/MS. Essa técnica de massas de alta resolução possui a tecnologia de ressonância de cíclotron por transformada de Fourier, que permite calcular e medir, com grande precisão e exatidão, a massa isotópica dos íons das substâncias em uma amostra. Para que o equipamento desempenhe essa função, os íons gerados na fonte de ionização devem primeiro passar por um quadrupolo, que tem a função de selecionar e fragmentar, e depois por um cíclotron, que executa a quantidade de varreduras necessárias para poder determinar com mais precisão a massa isotópica do íon de interesse. Essa característica faz com que o equipamento gere sinais dependentes da concentração. Assim, é possível aproveitar as particularidades dessa tecnologia para construir uma curva de concentração de CIIb (2) e determinar sua concentração nos fitopreparados [45–48,56–58].

Ao realizar a análise de CIIb por FT-ICR-MS/MS dois íons predominantes foram observados (Anexo 2), m/z 387,2538 $[M-C_6H_{12}O_3-H]^-$, como o mais abundante, seguido pelo de m/z 501,6224 $[M-H_2O-H]^-$. Para fins de especificidade na quantificação, as curvas de calibração foram realizadas com base no íon mais abundante. As concentrações seriais de CIIb (2) foram injetadas diretamente no equipamento e uma curva de concentração foi construída (Figura 13), com $R^2=0,99678$. A faixa de concentração das soluções empregadas para a construção da curva variou entre 9,38 nM e 600,15 nM de CIIb (2).

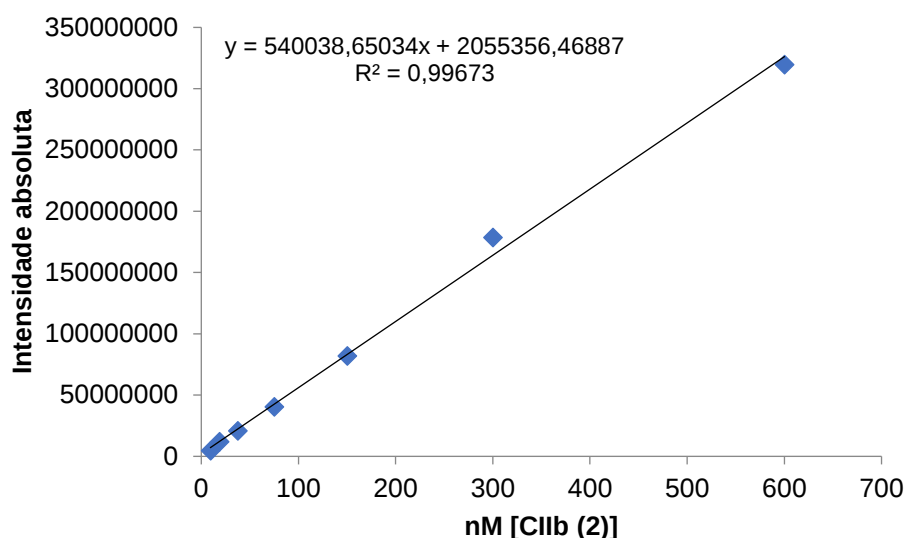


Figura 13. Curva de calibração de ClIb usando o íon de m/z 387,2538 $[M-C_6O_3H_{12}-H]^-$ por FT-ICR-MS/MS.

Um dos problemas da quantificação de substâncias em matrizes complexas, como os fitopreparados, é o efeito da matriz, que deve ser considerado na quantificação de uma substância. Este efeito consiste na interferência das substâncias acompanhantes no momento da quantificação. Uma das maneiras de resolver esse problema é realizar a quantificação usando o método de adição do padrão [49]. O método consiste em adicionar ClIb (**2**) aos fitopreparados e construir uma curva de calibração do fitopreparado enriquecido em diferentes concentrações de ClIb (**2**). Como a concentração “0,0000” de ClIb (**2**) enriquecido é realmente a amostra do problema, a inclinação e a interseção do Y, a partir da equação da linha, são usadas para calcular a concentração de ClIb (**2**) nos fitopreparados.

Embora a quantificação seja realizada em unidades de massa ou massa/volume, a proporção relatada é em termos de porcentagem; portanto, no final, reportamos % de ClIb (**2**) nos fitopreparados. Devido ao fato de que os dois fitopreparados foram obtidos por diferentes métodos, uma curva de calibração foi construída para cada um deles. A curva para o Fito-Ison-EtOH foi construída em faixa de concentração enriquecida com soluções de ClIb entre 0 e 300 nM resultando em $R^2=0,9936$ (Figura 14).

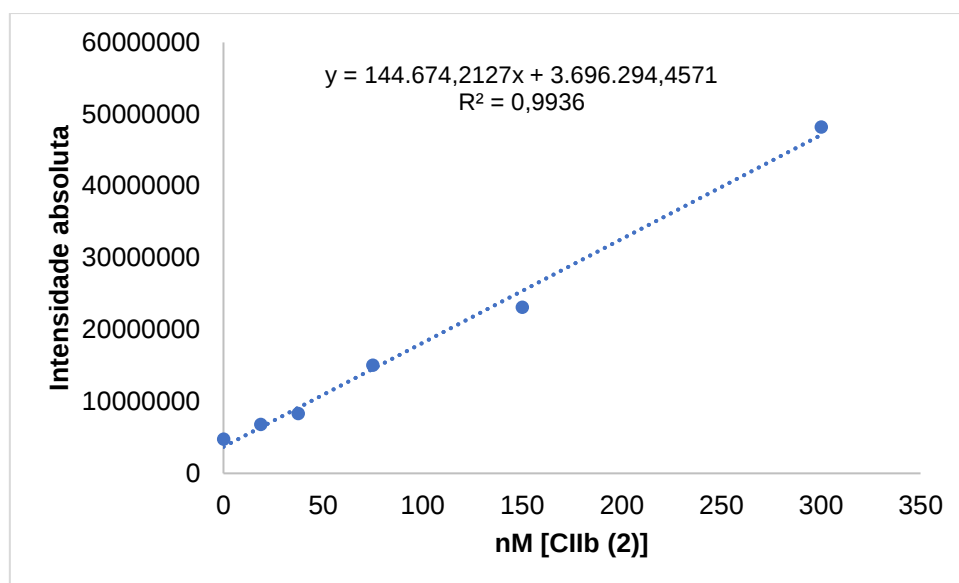


Figura 14. Curva de calibração de Fito-Ison-EtOH enriquecida com CIIb (2).

A curva para quantificação do Fito-Ison-EtOAc empregou soluções enriquecidas com CIIb na faixa entre 0 e 600 nM, resultando em $R^2=0,9921$ (Figura 15).

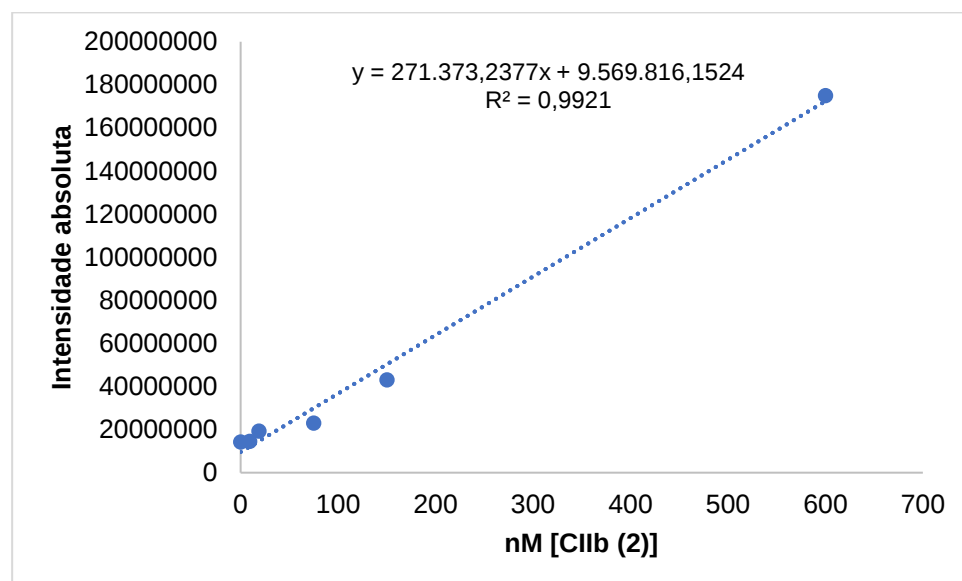


Figura 15. Curva de calibração de Fito-Ison-EtOAc enriquecida com CIIb (2).

Portanto, usando esse método foi possível determinar que o Fito-Ison-EtOAc possui 1,84% (18,4 mg/g de extrato) de CIIb, enquanto Fito-Ison-EtOH possui 0,67% (6,7 mg/g de extrato).

Tendo-se determinado as concentrações, é possível realizar os experimentos de atividade biológica e de interpretá-los adequadamente.

Efeito Antiproliferativo de Fitopreparados em Linhagens de Câncer

O presente projeto começou a ser idealizado após os resultados obtidos por Torres-Moreno (2017), que isolou CIIb (2) e determinou sua atividade antiproliferativa, apoptótica e antitumoral *in vitro* e *in vivo*, em xenoenxertos de HeLa em camundongos imunossuprimidos [7]. Torres-Moreno, discutiu que um dos possíveis mecanismos de ação da CIIb (2) na HeLa é através da via JAK2/STAT3, afetando diretamente a proteína Bcl-2, o potencial da membrana mitocondrial e induzindo a morte celular por apoptose ativando caspasa 3.

A linha celular HeLa é caracterizada principalmente por ser uma linha de câncer do colo do útero relacionada ao vírus HPV. O contágio com o HPV é um dos principais fatores para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, principalmente devido aos mecanismos de virulência em que alguns oncogenes virais, como o E6, inibem a fosforilação da p53, um fator importante na regulação do ciclo celular [11]. Além dos resultados do potencial de membrana, indução da morte celular de CIIb (2) em HeLa [7] e a relação entre cucurbitacinas e sua capacidade de interferir em vias como JAK2/STAT3 [28,35–37,59], é possível fazer hipótese do possível mecanismo de ação de CIIb (2).

Antes de nos apresentar a caracterização da via de ação do CIIb (2) e dos fitopreparados em HeLa, algumas outras linhas celulares foram propostas para explorar as diferentes possibilidades de interação do CIIb (2). De acordo com as características de cada linha celular, elas foram escolhidas; LS180: carcinoma do cólon, caracterizado por sua mutação no kRas, no entanto, foi observada que ativação de p53 nessas células induz a morte celular por apoptose [60]; A549: adenocarcinoma pulmonar, possui mutação no kRas e alterações na via STAT3, essa característica nos permitirá comparar com os resultados obtidos no LS180 e dar uma ideia das possíveis vias nas quais a CIIb (2) poderia intervir [35,61]; MDA-MD-231: câncer de mama triplo negativo, um dos tipos mais agressivos de câncer de mama, não possui receptores de estrogênio e progesterona; além disso, possui mutações nos kRas e na p53 [62,63]; e ARPE19: linha celular da retina humana imortalizada espontaneamente, como referência de uma linha celular não cancerosa [64].

Além dos fitopreparados, o efeito antiproliferativo de kinoína B diglicosídeo (1), substância 3 e CIIb (2) após 48 h, também foi avaliado pelo método MTT. A CIIb (2)

volta a formar partes dos ensaios de proliferação celular porque é a molécula de referência na atividade biológica e o marcador químico nos fitopreparados.

Os resultados da atividade antiproliferativa continuam mostrando HeLa como a linha celular mais suscetível a CIIb (2), em comparação com os resultados de Torres-Moreno, há apenas uma diferença de 4 µM entre os dois resultados. A próxima linha celular, em ordem de capacidade de inibição por CIIb (2), é LS180. Para os fitopreparados, os resultados foram melhores que o esperado; Primeiro, devido à maior concentração de CIIb (2) no Fito-Ison-EtOAc, esperava-se uma atividade antiproliferativa mais forte em relação ao Fito-Ison-EtOH. Por outro lado, em A549 a atividade antiproliferativa de Fito-Ison-EtOAc e CIIb (2) não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), enquanto Fito-Ison-EtOH não apresentou atividade antiproliferativa ($IC_{50} > 100 \mu g / mL$), o que demonstra que os mecanismos de ação são independentes da presença ou concentração de CIIb (2) nos fitopreparados, pelo menos para esta linhagem celular (Tabela 3).

No ensaio com ARPE19, nenhuma das amostras utilizadas apresentou atividade antiproliferativa, o que fornece seletividade aos fitopreparados e CIIb (2) sobre as células cancerosas, neste painel de linhas celulares. No entanto, é necessário realizar testes adicionais em linhas celulares não cancerosas da mesma estirpe celular e comparar adequadamente com o tipo de câncer que inibe a proliferação celular.

Tabela 3. Atividade antiproliferativa dos fitopreparados e substâncias isolados de *I. sonorae*.

Amostra	Linhas celulares*				
	A549	HeLa	LS180	MDA-MB-231	ARPE-19
CIIb (2)	22,8 ± 2,9 ^a	5,8 ± 0,7 ^a	54,7 ± 7,2 ^a	43,6 ± 15,7 ^a	ND
Fito-Ison-EtOH	ND	33 ± 2,7 ^c	ND	57,6 ± 11,5 ^a	ND
Fito-Ison-EtOAc	30,7 ± 7,7 ^a	18,6 ± 1,1 ^b	55,2 ± 7,5 ^a	59,7 ± 31,1 ^a	ND
Kinoína B diglicosídeo (1)	ND	ND	ND	ND	ND
Cucurbitacina 3	ND	ND	ND	ND	ND

* Os resultados de IC_{50} são expressos em µg/mL da média de três experimentos independentes ± SD.

ND: IC_{50} não detectada na máxima concentração avaliada de 100 µg/mL.

^{a-c} Diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos na mesma linha celular (colunas): ANOVA one-way; Tukey post-hoc ($p < 0,05$).

A CIIb (2) e os fitopreparados apresentaram uma atividade no MDA-MB-231 que não apresenta diferenças estatisticamente significantes entre eles, praticamente a mesma dose é necessária, de qualquer um dos três, para inibir 50 % da proliferação celular. No entanto, como pode se observar, os desvios padrão dos três resultados estão acima de 20 % do seu próprio valor, ou seja, muito grandes. Ao analisar os

gráficos de dose-atividade, a razão pela qual o desvio padrão é tão grande é observada, é um comportamento citostático para CIIb (2) e fitopreparados (Anexo 4). Existem algumas cucurbitacinas que possuem a capacidade de induzir a interrupção do ciclo celular em células de câncer na fase G2/M [28,29,39,65], enquanto outras atuam ao nível de citoesqueleto, impedindo sua despolimerização [30,32,42]. Esse comportamento também é observado na atividade induzida pelos fitopreparados e CIIb (2) em HeLa, A549 e LS180.

O principal objetivo da avaliação neste painel de linhas celulares foi selecionar a linha celular mais suscetível aos fitopreparados e CIIb (2), a fim de realizar a avaliação antitumoral, em que HeLa continuou a ser perfilado como a linha celular de escolha. No entanto, devido aos resultados obtidos com os fitopreparados, onde é observado um efeito citostático nas concentrações mais altas e, ao contrário, alterações morfológicas importantes em HeLa (Anexo 5), como contração celular e formação aparente de corpos apoptóticos, decidiu-se realizar uma cinética de viabilidade com MTT, de 24 a 72 h, dos fitopreparados e CIIb (2) em HeLa.

Atividade Antiproliferativa de Fitopreparados e CIIb (2) em HeLa após 24 h e após 72 h

Uma das maneiras mais ilustrativas de observar a evolução da proliferação celular ao longo do tempo, é utilizando uma curva de crescimento [66], isto com o objetivo de selecionar as doses para serem utilizadas nos ensaios de Western Blot. A Figura 16 exibe o comportamento da proliferação de células HeLa em quatro tratamentos diferentes.

A concentração mínima de Fito-Ison-EtOAc na qual a viabilidade da cultura celular de HeLa foi comprometida, após 72 h, foi 25 µg/mL; para Fito-Ison-EtOH foi de 50 µg/mL; para CIIb (2) foi de 12,5 µg/mL e para a cisplatina foi de 6,25 µg/mL. Portanto, foram escolhidas concentrações para o teste para Western Blot de 30 µg/mL, 50 µg/mL, 15 µg/mL e 9 µg/mL para Fito-Ison-EtOAc, Fito-Ison-EtOH, CIIb (2) e cisplatina, respectivamente.

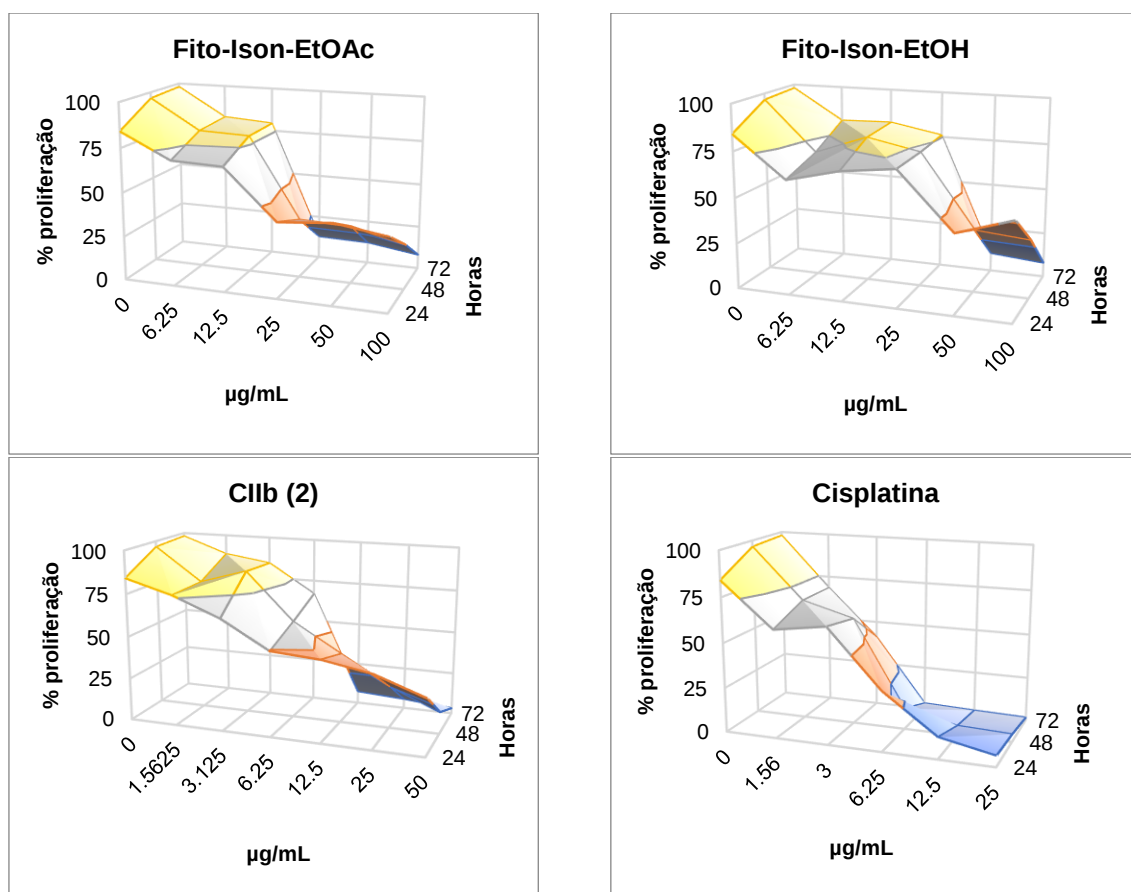


Figura 16. Curva de crescimento de HeLa e dos tratamentos com os fitopreparados, CIIb (2) e cisplatina.

Alterações na Via JAK2/STAT3 de Fitopreparados e CIIb (2) em HeLa

Muitas das cucurbitacinas estudadas contra o câncer têm a capacidade de interferir na via JAK2/STAT3 [28,29,35,37,39,59,65]. Outras induzem apoptose independentemente de JAK2/STAT3 [39,67], interrupção do ciclo celular em G2/M dependente ou independente de JAK2/STAT3 [28,29,39,65], inibição da despolimerização do citoesqueleto [30,32,42], e até indução de autofagia, em diferentes linhas celulares de câncer [26,31].

Os diferentes mecanismos de ação das cucurbitacinas são devidos às pequenas variações nos grupos funcionais em sua estrutura triterpênica. Até o momento, não foram realizados estudos detalhados da relação estrutura-atividade das cucurbitacinas, nem foram descritos mecanismos de ação para CIIb (2) em linhas celulares de câncer. A única confirmação da relação estrutura-atividade das cucurbitacinas é com aquelas que têm o aceptor de Michael na cadeia lateral dos triterpenos, consistindo de um grupo cetona em C22 e $\Delta^{23,24}$. Essa característica lhes

dá a capacidade de formar uma ligação covalente com a Cys257 da f-actina, na linha celular HeLa [42]. No entanto, CIIb (2) não possui esse farmacóforo. Portanto, uma das principais vias de ação de CIIb (2) em HeLa poderia pela via STAT3 [18,68]. Por isso, nesta etapa do trabalho avaliamos o efeito de CIIb (2) e dos fitopreparados sobre a expressão das proteínas mais afetadas pelas cucurbitacinas, como é STAT3.

STAT3 é uma proteína citoplasmática que modula a expressão de genes reguladores do apoptose, diferenciação, proliferação, metástases, angiogênese e resposta imune. Para a sua ativação, STAT3 tem que ser fosforilado por receptores de fatores de crescimento da membrana, como JAK2, ou citoplasmático como SFKs [41]. Em HeLa, STAT3 é sobre expressa, mas não fosforilado [69].

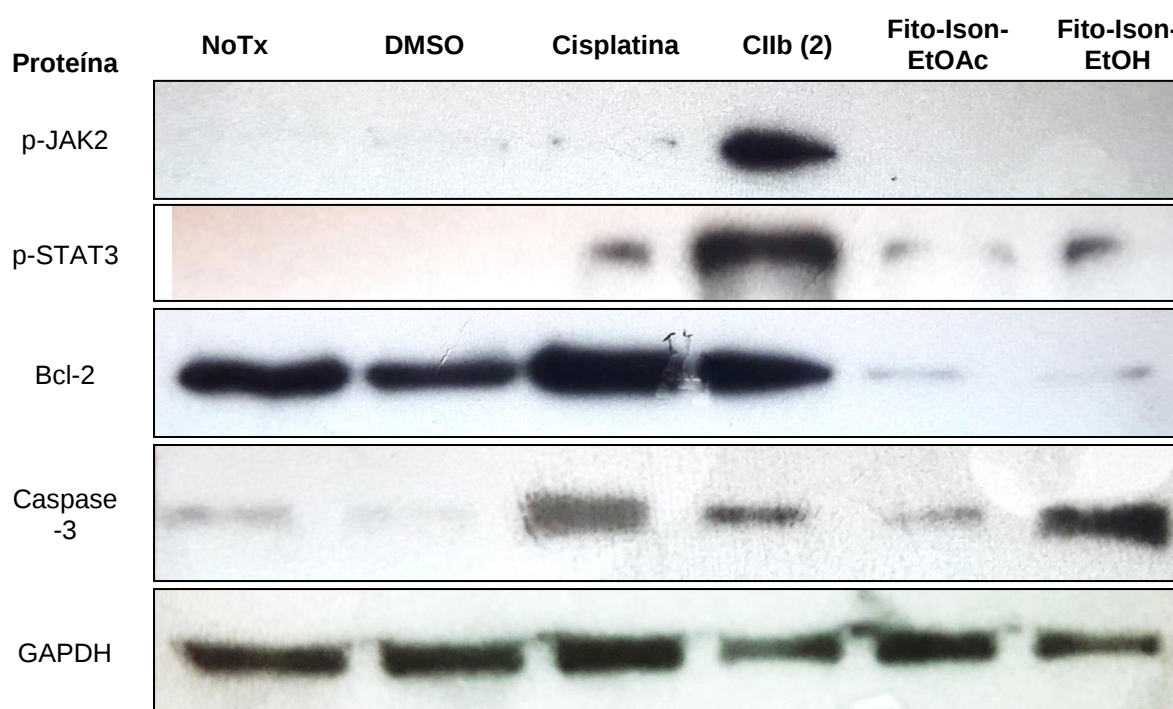
A cisplatina ($\text{PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$) é um dos agentes quimioterápicos de primeira escolha contra para o tratamento de câncer de colo de útero. No entanto, é um agente intercalante do DNA que não é específico para células cancerosas, porém, conseguindo atingir também células não cancerosas induz efeitos colaterais indesejáveis no paciente [14].

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de proliferação celular de três dias (Figura 16), foram consideradas as concentrações que determinam em qual concentração a cultura de células pode ou não recuperar sua viabilidade. Para realizar os ensaios de Western Blot, foram selecionadas concentrações acima desse limiar, garantindo assim o dano à viabilidade das células. Para Fito-Ison-EtOAc a concentração escolhida foi 30 $\mu\text{g/mL}$, para Fito-Ison-EtOH, 50 $\mu\text{g/mL}$, para CIIb (2), 15 $\mu\text{g/mL}$ (30 μM), e para a cisplatina, 9 $\mu\text{g/mL}$ (30 μM) em soluções de 0,25% de DMSO.

Após 12 h, o tratamento com CIIb (2) induz o aumento na expressão de JAK2 e de STAT3 em suas formas fosforiladas, bem como a sobre expressão de Bcl-2, sendo que a presença de caspase-3 é o primeiro indício da apoptose (Figura 17). Os fitopreparados Fito-Ison-EtOAc e Fito-Ison-EtOH não induziram a fosforilação de JAK2, e muito pouco efeito sobre p-STAT3. No entanto, Fito-Ison-EtOH produziu dano a mitocondrial, observado pela supressão de Bcl-2, um forte indício de apoptose, revelado pela expressão da caspase-3 maior do que a induzida por CIIb (2), a qual, portanto, é independente da via JAK2/STAT3 [41].

Após 24 horas de tratamento (Figura 18), observa-se a expressão de p-JAK2 induzida por CIIb (2) e pelo Fito-Ison-EtOAc, mas apenas ligeiramente pelo Fito-Ison-EtOH. No entanto, apenas CIIb (2) induziu a expressão de p-STAT3 e manteve a de

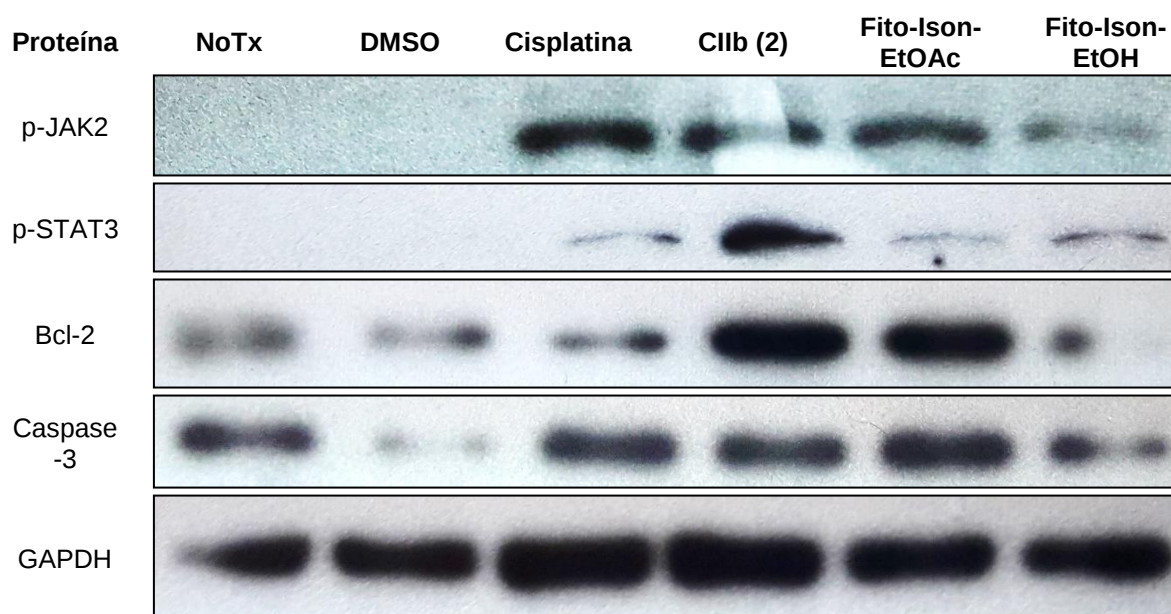
Bcl-2, sendo que esta última aumentou consideravelmente pela ação do Fito-Ison-EtOAc. Observa-se que a caspase-3 permaneceu expressa pela ação do Fito-Ison-EtOH, mas que aumentou em relação às primeiras 12h pela ação do Fito-Ison-EtOAc e de Cllb (2). Isso indica que o Fito-Ison-EtOAc pode inibir a fosforilação do p-STAT3 quando o JAK2 é fosforilado, mecanismo este diferente daquele induzido por Cllb (2).



NoTx; Células não tratadas
DMSO; dimetilsulfóxido ao 0,25%
Cisplatino; 9 µg/mL [30 µM]
Cllb (2); Cucurbitacina IIb 15 µg/mL [30 µM]
Fito-Ison-EtOAc; 30 µg/mL
Fito-Ison-EtOH; 50 µg/mL

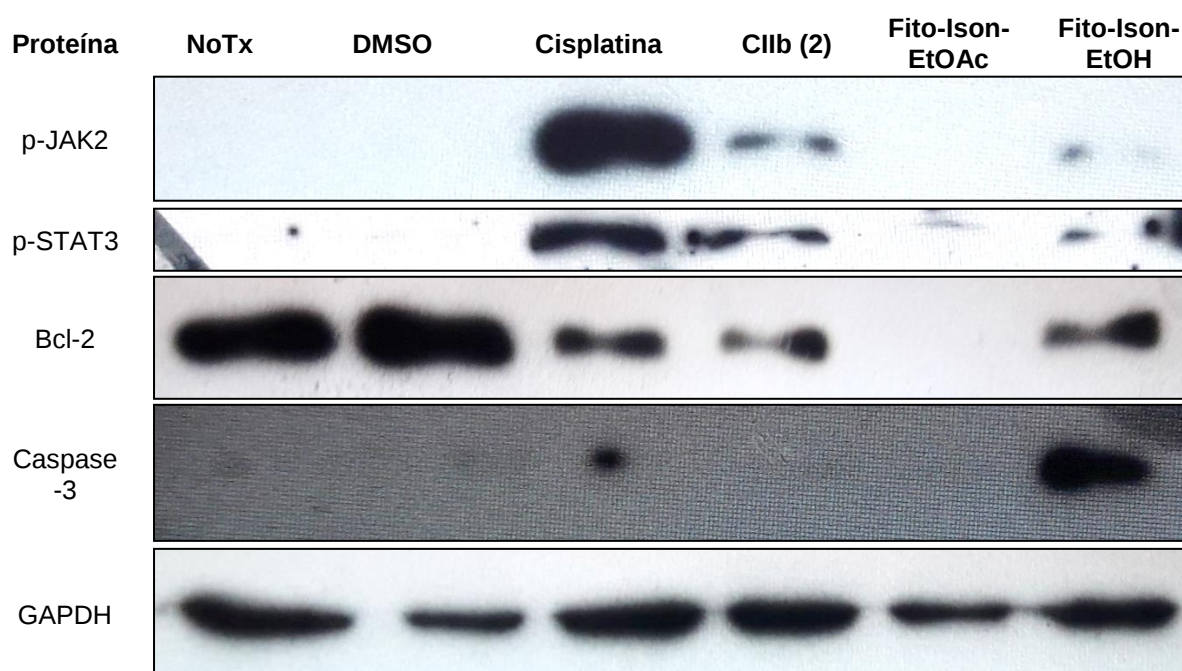
Figura 17. Western blot de HeLa após 12 h de tratamento

Após 48 horas de tratamento (Figura 19), observa-se que o Fito-Ison-EtOAc e o Cllb (2) detiveram a expressão da caspase-3, enquanto o Fito-Ison-EtOH mantém a expressão dessa proteína. Esses resultados sugerem que provavelmente está ocorrendo inibição do sinal de apoptose devido a um processo de interrupção celular. Algumas cucurbitacinas, como a cucurbitacina E, têm a capacidade de arrestar células de câncer de mama na fase G2/M, mostrando evidência da expressão do inibidor de CDKs, p21 [29]. O conjunto desses resultados indica que o mecanismo de ação de Cllb (2) e dos fitopreparados é diferente.



NoTx; Células não tratadas
DMSO; dimetilsulfóxido ao 0,25%
Cisplatina; 9 µg/mL [30 µM]
CIIb (2); Cucurbitacina IIb 15 µg/mL [30 µM]
Fito-Ison-EtOAc; 30 µg/mL
Fito-Ison-EtOH; 50 µg/mL

Figura 18. Western blot de HeLa após 24 h de tratamento



NoTx; Células não tratadas
DMSO; dimetilsulfóxido ao 0,25%
Cisplatina; 9 µg/mL [30 µM]
CIIb (2); Cucurbitacina IIb 15 µg/mL [30 µM]
Fito-Ison-EtOAc; 30 µg/mL
Fito-Ison-EtOH; 50 µg/mL

Figura 19. Western blot de HeLa após 48 h de tratamentos

Esses resultados sugerem que após 24 h a alta expressão de Bcl-2 e da função efetora da apoptose em Fito-Ison-EtOAc e CIIb (2) pode ser um sinal de dano mitocondrial, estando relacionada à formação de ROS [26,39], induzindo assim um desequilíbrio redox e produzindo alterações no potencial de membrana mitocondrial, como relatou Torres-Moreno [7,68].

Se o dano às mitocôndrias por ROS for considerável, isso explicaria a indução de apoptose pela presença de caspase-3, via citocromo c, após 12 horas para o Fito-Ison-EtOH; para o caso de Fito-Ison-EtOAc e de CIIb (2), explicaria a alta expressão de Bcl-2 para controlar os danos mitocondriais ao longo do tempo de tratamento. Porém, existe também a possibilidade de que a expressão de p-STAT3 possa contribuir para a expressão de Bcl-2 [69]. No entanto, quando são observados os resultados de Fito-Ison-EtOAc, no qual a maioria de seus componentes são cucurbitacinas, Bcl-2 é super expressa, independentemente da presença de p-STAT3, sugerindo que a super expressão de Bcl-2 pode estar relacionada ao dano direto das ROS às mitocôndrias, induzida por cucurbitacinas e por CIIb (2) que integram o fitopreparado.

Com o Fito-Ison-EtOH isso não ocorre, pois não há ativação da via JAK2/STAT3 e não há expressão de Bcl-2, observando-se apenas a indução de apoptose pela expressão da caspase-3, a partir das 12 h até 48 h. A diferença mais notável pode ser observada na inibição da expressão da caspase-3 após 48 h no tratamento com CIIb (2) e naquele com Fito-Ison-EtOAc. Isso pode ser um sinal de interrupção do ciclo celular, como acontece com CIIb (2), na concentração de 8 µM, como reporta Torres-Moreno [68]. No entanto, após 48 h, observa-se que a expressão de caspase-3 pelo tratamento com qualquer um dos dois fitopreparados é independente da fosforilação de STAT3.

Efeitos no Ciclo Celular de HeLa por Fitopreparados e CIIb (2)

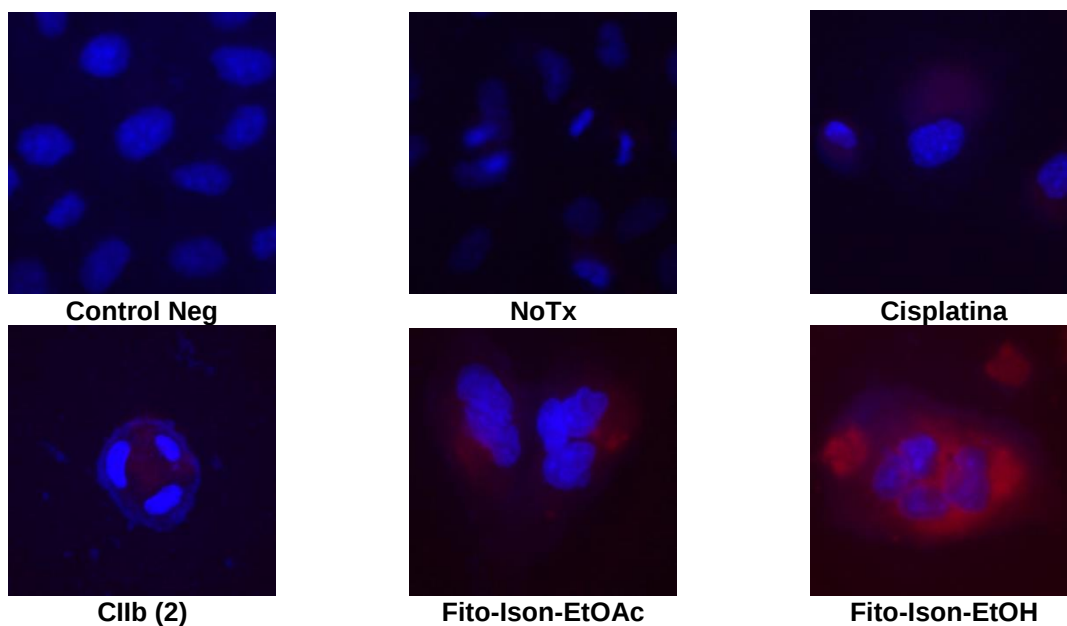
Como tem se reportado em estudos prévios, CIIb (2) (8 µM) induz em HeLa a interrupção do ciclo celular na fase G2/M, assim como dano ao DNA [68]. Uma das proteínas cuja expressão está intimamente relacionada ao dano do DNA é p21. Essa proteína induz a interrupção do ciclo celular, em qualquer fase, através da inibição das proteínas CDKs [11,70,71]. Para identificar a possível expressão de p21 em HeLa pelos tratamentos com os fitopreparados ou com CIIb (2), foram utilizadas as

mesmas concentrações empregadas nos ensaios Western blot. Os resultados são positivos para a expressão de p21 nos tratamentos com CIlb (2) e com os fitopreparados (Figura 20-A). Além disso, pode ser observado, nos tratamentos com CIlb (2) ou com os fitopreparados, células multinucleadas, produtos da interrupção da divisão celular.

Para observar a fase do ciclo celular, a citometria de fluxo foi realizada após um período de 24 horas de exposição aos tratamentos (Figura 20-B). Os resultados dos tratamentos são consistentes com os de Western Blot e p21, particularmente em culturas com tratamento com CIlb (2) ou com Fito-Ison-EtOAc, nos quais se observa que a maioria da população celular está na fase S e G2/M, respectivamente.

Nos resultados obtidos com os fitopreparados, pode-se observar uma população de células com um nível de conteúdo de DNA (DNA CONTENT INDEX) maior que o intervalo da fase celular G2/M (5-7 unidades). Isso pode ser devido à presença de células gigantes, que são observadas ao microscópio, as quais, de acordo com as fases do ciclo celular, continuariam sendo células na fase G2/M. Portanto, a cucurbitacina CIlb (2) estaria conservando as células nas fases S e G2/M, conforme já foi relatado para algumas cucurbitacinas [28,29,39,65], enquanto os fitopreparados as conservam na fase G2/M.

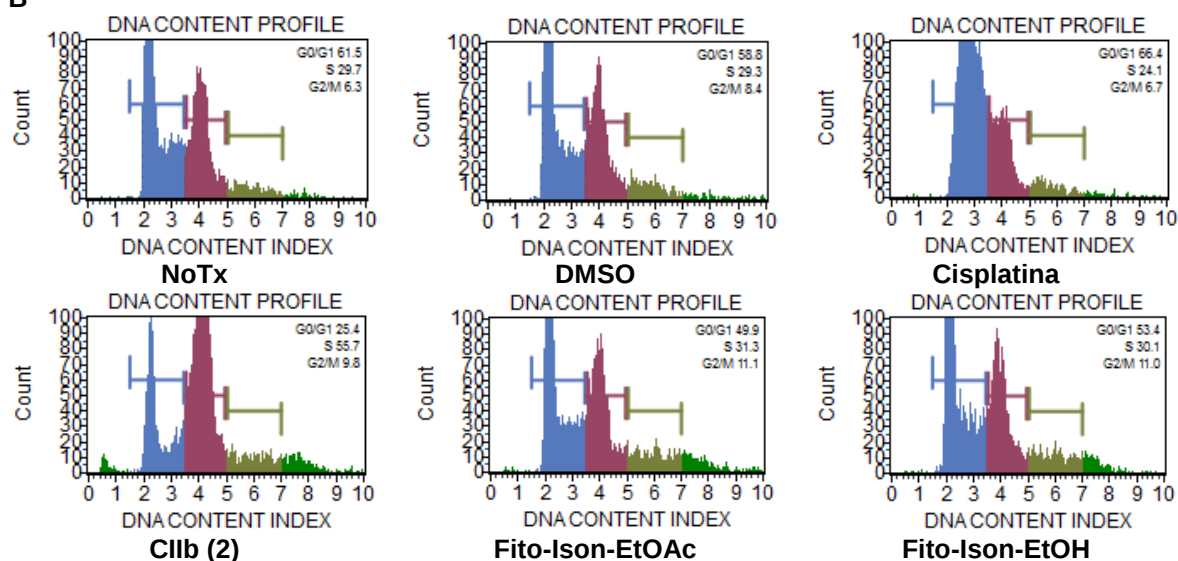
A



Azul: DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole).
Vermelho: p21 positivo; Alexa-fluor 594 α-ms.

(Continuação...)

B



NoTx; Células sem tratamento.
DMSO; dimetilsulfóxido al 0,25%
Cisplatina; 9 µg/mL [30 µM]
CIlb (2); Cucurbitacina IIb 15 µg/mL [30 µM]
Fito-Ison-EtOAc; 30 µg/mL
Fito-Ison-EtOH; 50 µg/mL

Figura 20. Expressão de p21 aos 5 dias e efeito sobre o ciclo celular após 24 h de tratamento em células HeLa.

Indução de Apoptose em células HeLa pela Via Intrínseca por CIlb (2) e pelos Fitopreparados

Um dos mecanismos de controle redox das mitocôndrias é através da expressão da proteína antioxidante glutathiona. Essa proteína possui um grupo tiol livre reativo aos radicais livres. Quando a glutathiona ainda mantém seu grupo tiol livre, é conhecida como glutathiona reduzida (GSH). Em contrapartida, quando o grupo tiol se oxida, por exemplo, pela neutralização de um radical livre, passa a ser conhecida como glutathiona oxidada (GSSG). A expressão da GSH é regulada pela proteína Nrf2, que por sua vez é negativamente regulada pela proteína Keap1. Quando a célula começa a saturar com ROS, o Keap-1 oxida e libera Nrf2 para regular a expressão de GSH. Portanto, a presença de Nrf2 pode ser um fator importante na determinação da provável causa de um desequilíbrio redox. Há evidências de que a cucurbitacina I, inibe o Nrf2, induzindo desequilíbrio redox [39,72]. De acordo com nossos resultados, o melhor momento para a detecção de Nrf2 é após 24 horas, tanto pelo

fato de que a caspase-3 encontra-se expressa após o tratamento com os dois fitopreparados ou com CIIb (2), quanto pelo fato de que ocorre a expressão de Bcl-2 após o tratamento com Fito-Ison-EtOAc ou com CIIb (2), enquanto que com o tratamento com Fito-Ison-EtOH a expressão de Bcl-2 ocorre após 48h (Figuras 17, 18 e 19).

Os resultados mostram a inibição de Nrf2 nos tratamentos com os fitopreparados e CIIb (2) em relação aos controles (Figura 21). Isso sugere que um aumento de ROS nas células pode estar diretamente relacionado ao sinal de apoptose da caspase-3 por meio de danos mitocondriais que permitiram a liberação do citocromo-c no citoplasma, subsequente formação de apoptossomo com Apaf-1 e ativação da procaspase-9, confirmada a ativação da via intrínseca do apoptose.

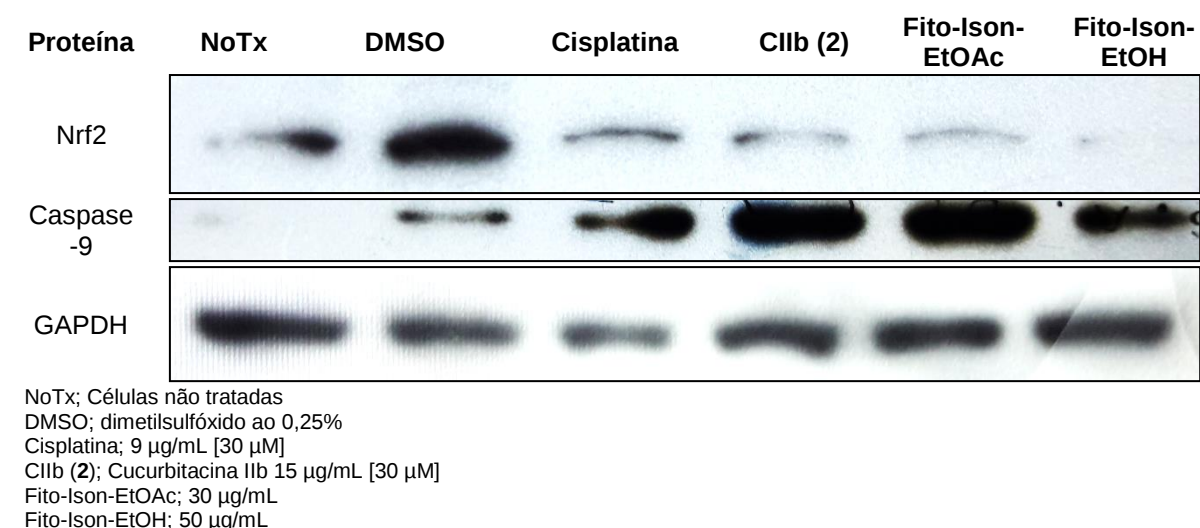


Figura 21. Análise por Western blot de Nrf2 e caspase-9 em HeLa após 24 h de tratamento

Se a inibição do Nrf2 estiver desencadeando a ativação do apoptose pela via intrínseca, mediada pelas ROS e pela liberação do citocromo-c, a caspase-9 deve aparecer entre 12 e 24 horas, e é precisamente isso o que ocorre em todos os tratamentos (Figura 21 e 22).

Analisando os resultados, observamos que o CIIb (2) interfere na via JAK2/STAT3 [68], enquanto no Fito-Ison-EtOAc e Fito-Ison-EtOH a expressão é baixa até mesmo após 48 h de tratamento. No entanto, devido ao comportamento na expressão de Bcl-2, deduziu-se que os mecanismos de morte celular dos fitopreparados são independentes da via JAK2/STAT3. Ao observar o comportamento da caspase-3, percebemos que o Fito-Ison-EtOH revela mecanismo de ação diferente do Fito-Ison-EtOAc e de CIIb (2). Ao realizar os testes de ciclo celular, foram

confirmadas as diferenças no mecanismo de ação dos três tratamentos, sendo CIIb (2) quem induz interrupção do ciclo celular na fase S e os fitopreparados na fase G2/M. Os resultados da expressão de p21 sugerem que a interrupção do ciclo celular é devida aos danos no DNA, provavelmente devido à formação de ROS, como foi relatado para outras cucurbitacinas, como a cucurbitacina B e a cucurbitacina I [26,39].

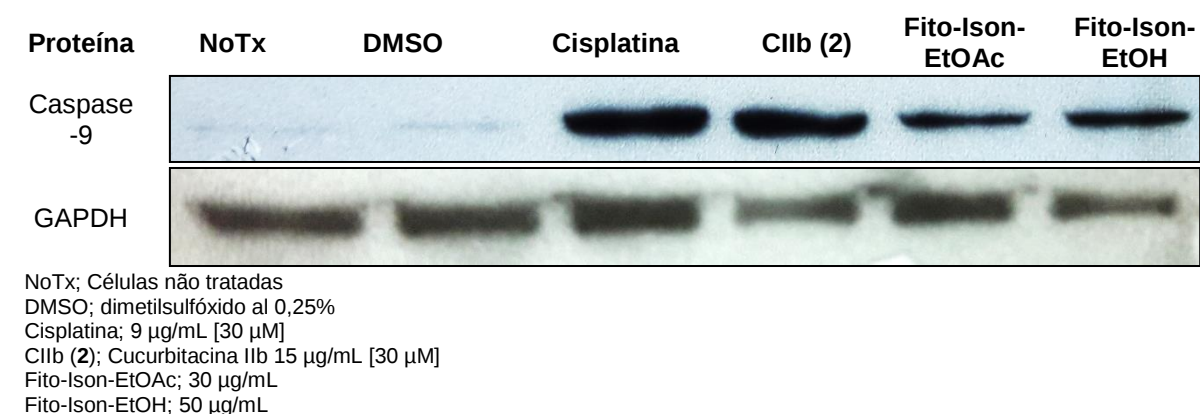


Figura 22. Western blot de caspase-9 em HeLa após 12 h de tratamento

Os resultados da expressão de Nrf2 e caspase-9 sugerem que CIIb (2) também pode induzir a morte celular por apoptose através da inibição de Nrf2, incrementando o dano ao potencial da membrana mitocondrial [68] pelo aumento nas ROS e, conseqüentemente, induzindo a morte celular pela via intrínseca da apoptose. Em paralelo, o dano ao DNA induzido pelas ROS induziria também a expressão de p21, e a conseqüente interrupção celular na fase S.

O Fito-Ison-EtOAc possui um mecanismo de ação diferente do CIIb (2). Após 12 h inibe a expressão de Bcl-2. No entanto, a expressão dessa proteína aumenta para níveis semelhantes aos induzidos por CIIb (2) após 24 h. A expressão da caspase-3 permanece presente de maneira muito semelhante à provocada por CIIb (2) nos três períodos de tempos avaliados. Tanto CIIb (2) e Fito-Ison-EtOAc inibem parcialmente o Nrf2, ativam a expressão da caspase-9 e p21. No entanto, foi observada com interrupção apenas de uma população na fase G2/M do ciclo celular nas células tratadas com Fito-Ison-EtOAc.

As células tratadas com Fito-Ison-EtOH têm uma via de ação completamente independente de JAK2/STAT3, inibem a expressão de Bcl-2 e Nrf2, induzem a expressão de caspase-9, p21 e caspase-3, com um pequeno aumento na população em G2/M. É provável que esse tratamento mantenha uma produção constante e mais

alta de ROS que do que os outros tratamentos, mantendo a expressão da caspase-3, predominando a morte celular sobre a interrupção do ciclo celular.

Atividade Antitumoral por Xenoenxertos de HeLa em Camundongos Atímicos nu/nu

Para determinar se os fitopreparados ou CIIb (2) também podem inibir o desenvolvimento do tumor [7], foram realizados xenoenxertos de HeLa na região subcutânea da parte superior do dorso dos camundongos. As doses a serem avaliadas para cada tratamento não são necessariamente proporcionais às usadas nos ensaios *in vitro*. No entanto, Torres-Moreno lançou as bases desse teste *in vivo* com CIIb (2), com excelentes resultados em concentrações de 10 mg/kg de CIIb (2) [7]. Tomando esses valores como referência, foram escolhidas doses de 5 mg/kg de CIIb (2). Quando observarmos a proporcionalidade das concentrações dos fitopreparados para obter os mesmos resultados que o CIIb (2) em ensaios *in vitro*, foi necessário empregar aproximadamente o dobro da massa de Fito-Ison-EtOAc e aproximadamente três vezes a quantidade de Fito-Ison-EtOH em relação à de CIIb (2). Por isso, foram utilizados 20 mg/kg para o Fito-Ison-EtOAc e 30 mg/kg para o Fito-Ison-EtOH. Para o controle positivo, usaram-se doses de 2 mg/kg de cisplatina [73] e para o controle negativo DMSO 2%.

Uma das características de testes *in vivo* é que é possível monitorar as alterações físicas pelas quais o animal sofre durante o tratamento, bem como as alterações no peso e na aparência física, fatores muito importantes especialmente em tratamento para combater o câncer.

A aparência física do camundongo no final dos tratamentos de CIIb (2) e fitopreparados é muito semelhante à do veículo DMSO (Figura 23). A aparência física do camundongo tratado com Fito-Ison-EtOH mostra pele mais firme do que os outros dos grupos. Por outro lado, os camundongos que foram tratados com cisplatina têm pele com aparência mais frágil.

Embora o tamanho do tumor possa ser apreciado pela observação do camundongo, a aparência física do animal pode interferir na percepção das dimensões do tumor, e somente após sua remoção é que o tamanho e o desenvolvimento do tumor podem realmente ser avaliados (Figura 24). A aparência externa do tumor varia de acordo com cada um dos tratamentos. O tumor que se

desenvolveu em ambiente livre dos tratamentos é consideravelmente maior em comparação àqueles que receberam tratamento, além de mais vascularizado.

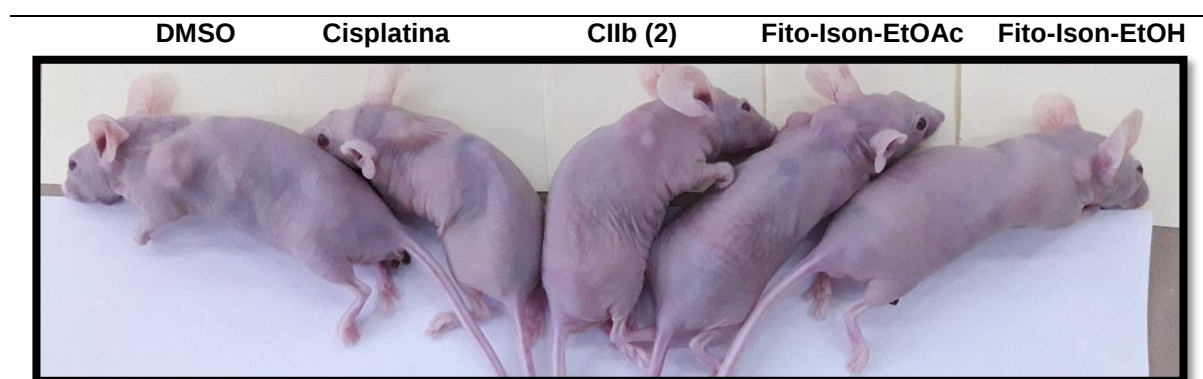


Figura 23. Aparência física de um exemplar de camundongo de cada grupo dos diferentes tratamentos.

A representação da atividade antitumoral (Figura 25) mostra a influência dos tratamentos no tumor quinze dias após o tratamento. Nos primeiros três dias, apesar da ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a evolução do tumor de cada tratamento, o tratamento com Fito-Ison EtOH já indica uma tendência para inibir o crescimento do tumor. Após 9 dias de tratamento já existem diferenças estatisticamente significativas entre o veículo (DMSO) e o Fito-Ison-EtOH.

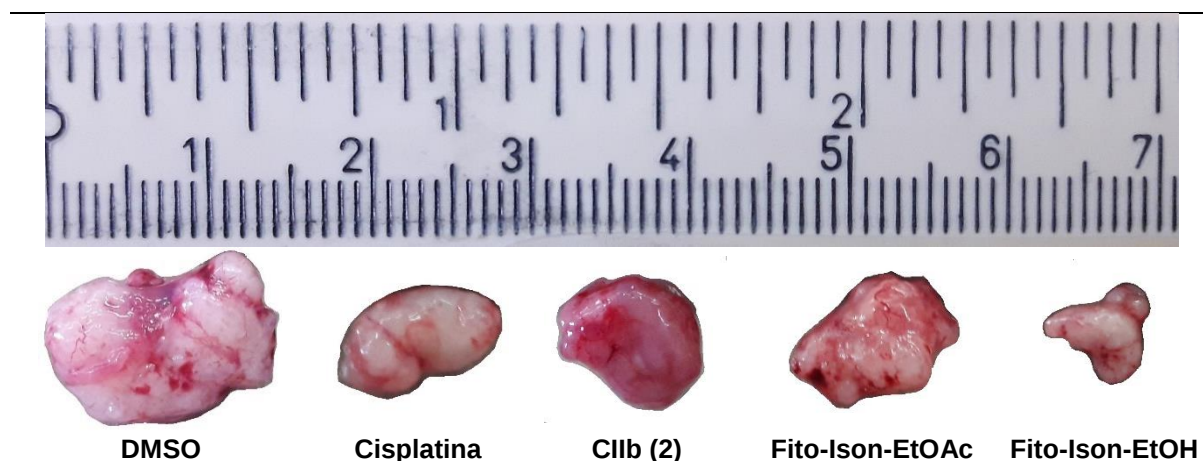
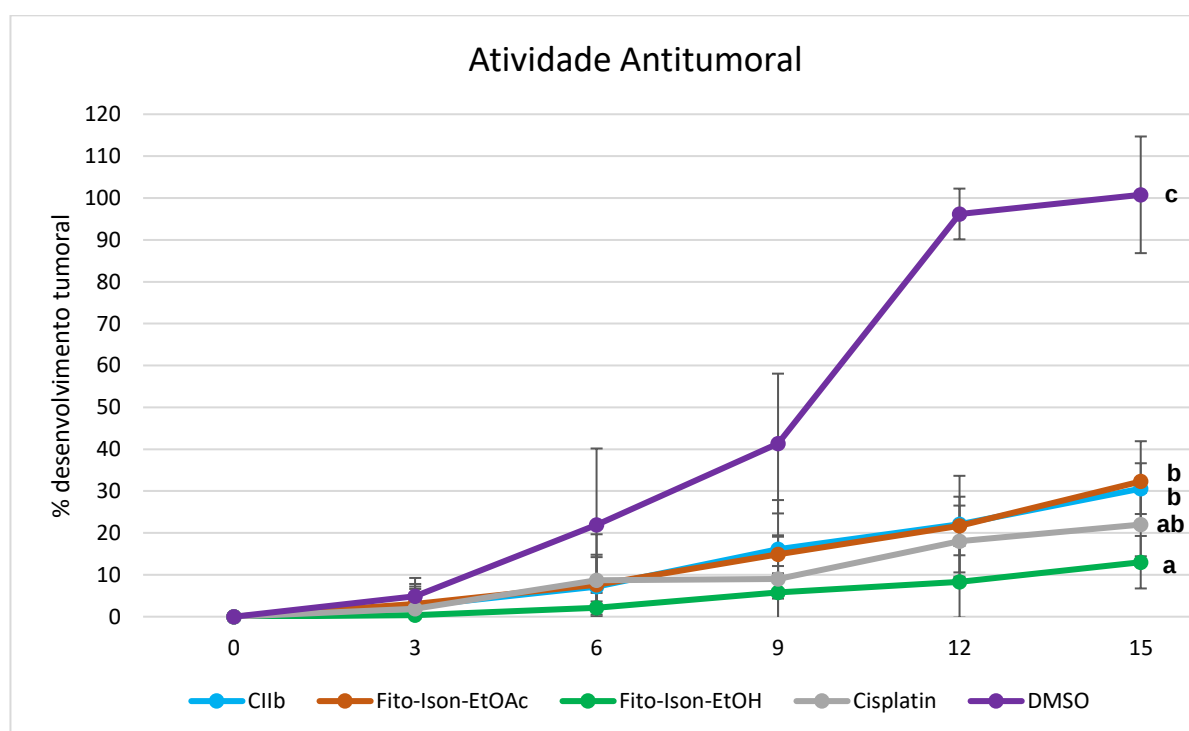


Figura 24. Representação gráfica das dimensões do tumor ao final dos tratamentos.

Ao final do tratamento, as dimensões dos tumores apresentam diferenças significativas entre os tratamentos. O Fito-Ison-EtOH inibe o crescimento do tumor em $86 \pm 6,3\%$, seguido pela cisplatina ($78 \pm 6,5\%$). A cucurbitacina CIlb (2) inibiu $70 \pm 6,0\%$ e o Fito-Ison-EtOAc $68 \pm 9,6\%$, e também não apresentaram diferenças significativas na inibição do desenvolvimento tumoral em relação à cisplatina.

Portanto, embora Fito-Ison-EtOH tenha sido o tratamento com o maior potencial antitumoral, ambos fitopreparados e CIIb (2) [7] possuem potencial anticancerígeno similar ao da cisplatina ($p < 0,05$).

A cisplatina é um agente intercalante do DNA, que inibe sua síntese. É o agente quimioterápico de primeira escolha para o câncer do colo do útero [14], sendo sua eficácia basicamente nossa referência como controle positivo. Como observado em experimentos anteriores, o CIIb (2) e o Fito-Ison-EtOAc apresentam mecanismo de ação semelhante a ela, sendo que a cucurbitacina CIIb (2) é um agente que também induz a interrupção do ciclo celular na fase S (30 μ M) e na fase G2/M em baixas concentrações (8 μ M) [68]. Por outro lado, o Fito-Ison-EtOH mantém a expressão da caspase-3 por mais tempo (48 h) do que o Fito-Ison-EtOAc e do que CIIb (2). Portanto, após 48 h, os tumores tratados com Fito-Ison-EtOH teriam uma proporção maior de células em apoptose do que os tratados com Fito-Ison-EtOAc e CIIb (2), explicando a efetividade do Fito-Ison-EtOH na inibição do desenvolvimento de tumoral.



^{a-c} Diferenças estatisticamente significativas: ANOVA two-way, Tuke post-hoc ($p < 0,05$).

Figura 25. Desenvolvimento tumoral em camundongos após 15 dias de tratamentos.

As diferenças que existem entre a composição química dos fitopreparados, podem ser as responsáveis pelas diferenças nos resultados dos testes de atividade biológica. Embora ambos fitopreparados possuam, além de CIIb (2), quatro

glicosídeos de cucurbitacinas, o Fito-Ison-EtOH foi obtido com EtOH 70 % pelo método de percolação, o que faz com que os glicosídeos de cucurbitacina estejam em maior proporção do que em Fito-Ison-EtOAc. Por exemplo, alguns glicosídeos de cucurbitacinas, como a cucurbitacina B e E podem interferir na formação dos filamentos de actina através da via PKB, reduzindo os níveis de survivina em células cancerosas [74]. Portanto, além de CIIb (2), os glicosídeos das cucurbitacina podem também estar envolvidos na atividade antitumoral dos fitopreparados.

Continuaremos a estudar os efeitos de CIIb (2) e dos fitopreparados sobre o câncer, aprofundando a investigação dos efeitos biológicos observados neste estudo e aplicando-os em pesquisas futuras. É também importante propor modificações nas concentrações de CIIb (2) e dos fitopreparados, além de testar doses maiores e intervalos mais curtos entre os tratamentos e de determinar as doses letais e os possíveis efeitos colaterais.

CONCLUSÕES

Análises cromatográficas por HPLC-PDA mostraram que Fito-Ison-EtOH é um fitopreparado mais complexo do que o Fito-Ison-EtOAc. Por sua vez, embora a composição química dos dois fitopreparados seja baseada em sete substâncias principais, o Fito-Ison-EtOAc apresenta maior concentração de CIIb (2). Porém, o rendimento para a obtenção de Fito-Ison-EtOH é mais promissor para o desenvolvimento de um fitoterápico de *Ibervillea sonora*. Isso justificou a continuidade do estudo com os dois fitopreparados.

Os resultados da atividade antiproliferativa ratificaram que, dentre o painel celular testado, HeLa é a linhagem celular mais suscetível a CIIb (2), o que justificou a continuidade dos estudos.

No ensaio com ARPE19, nenhuma das amostras apresentou atividade antiproliferativa, o que indica a seletividade dos fitopreparados e de CIIb (2) sobre as células cancerosas, resultado essencial para o uso adequado como anticancerígeno.

As concentrações mínimas que comprometem a viabilidade da cultura celular de HeLa após 72h são de 25 µg/mL para Fito-Ison-EtOAc, 50 µg/mL para Fito-Ison-EtOH e 12,5 µg/mL para CIIb (2), que são resultados promissores para extratos complexos multicomponentes provenientes de plantas, impulsionando a continuidade dos estudos.

Os ensaios Western Blot evidenciaram que, apesar das diferenças que existem entre os fitopreparados e CIIb (2) sobre a via STAT3, os três tratamentos têm o potencial de induzir a morte celular por apoptose através do desequilíbrio redox, devido à inibição de Nrf2.

No caso do mecanismo do Fito-Ison-EtOH, ele ocorre pela manutenção da expressão da caspase-3 por 48 h, evidenciando proporção maior de células em apoptose do que os tratados com Fito-Ison-EtOAc e CIIb (2), explicando sua ação no desenvolvimento tumoral.

Nos ensaios *in vivo*, houve inibição do crescimento tumoral de $86 \pm 6,3\%$ com o tratamento com Fito-Ison-EtOH, $68 \pm 9,6\%$ com o Fito-Ison-EtOAc, $70 \pm 6,0\%$ com a cucurbitacina CIIb (2), não havendo diferenças significativas com a inibição de $78 \pm 6,5\%$ pelo uso da cisplatina.

O conjunto desses resultados indica que, embora o Fito-Ison-EtOAc, tenha apresentado maior atividade antiproliferativa, os dois fitopreparados e a cucurbitacina CIIb (2) possuem potencial antitumoral similar ao da cisplatina, embora por diferentes mecanismos de ação. A maior facilidade de obtenção e o maior rendimento da extração estimulam a continuidade do estudo com o Fito-Ison-EtOH.

REFERÊNCIAS

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] Tariq A, Sadia S, Pan K, Ullah I, Mussarat S, Sun F, et al. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. *Phyther Res* 2017. <https://doi.org/10.1002/ptr.5751>.
- [3] Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2017. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>.
- [4] Demaria M, O’Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, et al. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov* 2017. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0241>.
- [5] Dias DA, Urban S, Roessner U. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2012. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.
- [6] Yetman D, Van Devender T. Mayo Ethnobotany. 1st ed. University of California Press; 2002.
- [7] Torres-Moreno H. Mecanismos moleculares de triterpenos de *Ibervillea sonorae* asociados a la muerte celular por apoptosis in vitro e in vivo. Universidad de Sonora, 2017.
- [8] Torres-Moreno H, Velázquez CA, Garibay-Escobar A, Curini M, Marcotullio MC, Robles-Zepeda RE. Antiproliferative and apoptosis induction of cucurbitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Ind Crops Prod* 2015;77:895–900. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.055>.
- [9] Apaya MK, Chang MT, Shyur LF. Phytomedicine polypharmacology: Cancer therapy through modulating the tumor microenvironment and oxylin dynamics. *Pharmacol Ther* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.001>.
- [10] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- [11] Ajay AK, Meena AS, Bhat MK. Human papillomavirus 18 E6 inhibits phosphorylation of p53 expressed in HeLa cells. *Cell Biosci* 2012. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-2>.
- [12] Mantovani F, Banks L. The Human Papillomavirus E6 protein and its

- contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204869>.
- [13] Aledo J. La vida inmortal de Henrietta Lacks o la historia de las células HeLa. *Encuentros En La Biol* 2010.
- [14] Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)* 2011. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>.
- [15] Halberstein R a. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol* 2005;15:686–99. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.02.004>.
- [16] Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: Past, present and future. *Nat Rev Cancer* 2002. <https://doi.org/10.1038/nrc723>.
- [17] Achenbach H, Horn K, Dominguez XA, Rombold C, Gómez López EG. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonorae*. *Phytochemistry* 1993. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85535-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85535-Y).
- [18] Torres-Moreno H, Marcotullio MC, Velázquez C, Ianni F, Garibay-Escobar A, Robles-Zepeda RE. Cucurbitacin IIb, a steroidal triterpene from *Ibervillea sonorae* induces antiproliferative and apoptotic effects on cervical and lung cancer cells. *Steroids* 2020;157:108597. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2020.108597>.
- [19] Hernández-Galicia E, Calzada F, Roman-Ramos R, Alarcón-Aguilar FJ. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: Isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med* 2007. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967117>.
- [20] Rivera-Ramírez F, Escalona-Cardoso GN, Garduño-Siciliano L, Galaviz-Hernández C, Paniagua-Castro N. Antiobesity and Hypoglycaemic Effects of Aqueous Extract of *Ibervillea sonorae* in Mice Fed a High-Fat Diet with Fructose. *J Biomed Biotechnol* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/968984>.
- [21] Zapata-Bustos R, Alonso-Castro AJ, Gómez-Sánchez M, Salazar-Olivo LA. *Ibervillea sonorae* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. *J Ethnopharmacol* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.041>.
- [22] Torres-Moreno H, López-Romero JC, Vázquez-Solorio JY, Velázquez-Contreras CA, Garibay-Escobar A, Díaz-López R, et al. Antioxidant, anti-

- inflammatory and antiproliferative properties of *Ibervillea sonora*. South African J Bot 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.029>.
- [23] Kaushik U, Aeri V, Mir SR. Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. Pharmacogn Rev 2015. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156314>.
- [24] Hussain H, Green IR, Saleem M, Khattak KF, Irshad M, Ali M. Cucurbitacins as Anticancer Agents: A Patent Review. Recent Pat Anticancer Drug Discov 2018. <https://doi.org/10.2174/1574892813666181119123035>.
- [25] Lee DH, Iwanski GB, Thoennissen NH. Cucurbitacin: Ancient compound shedding new light on cancer treatment. ScientificWorldJournal 2010. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.44>.
- [26] Ren G, Sha T, Guo J, Li W, Lu J, Chen X. Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells. J Nat Med 2015. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0918-4>.
- [27] Kim M, Park SY, Jin ML, Park G, Son HJ. Cucurbitacin B inhibits immunomodulatory function and the inflammatory response in macrophages. Immunopharmacol Immunotoxicol 2015. <https://doi.org/10.3109/08923973.2015.1085065>.
- [28] Ku JM, Kim SR, Hong SH, Choi HS, Seo HS, Shin YC, et al. Cucurbitacin D induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting STAT3 and NF- κ B signaling in doxorubicin-resistant human breast carcinoma (MCF7/ADR) cells. Mol Cell Biochem 2015. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2509-9>.
- [29] Kong Y, Chen J, Zhou Z, Xia H, Qiu MH, Chen C. Cucurbitacin e induces cell cycle G2/M phase arrest and apoptosis in triple negative breast cancer. PLoS One 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103760>.
- [30] Duncan KLK, Duncan MD, Alley MC, Sausville EA. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. Biochem Pharmacol 1996. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(96\)00557-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00557-6).
- [31] Yuan G, Yan SF, Xue H, Zhang P, Sun JT, Li G. Cucurbitacin i induces protective autophagy in glioblastoma in Vitro and in Vivo. J Biol Chem 2014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528760>.
- [32] Knecht DA, LaFleur RA, Kahsai AW, Argueta CE, Beshir AB, Fenteany G. Cucurbitacin I Inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. PLoS One 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014039>.
- [33] Lopez-Haber C, Kazanietz MG. Cucurbitacin i inhibits Rac1 activation in breast

- cancer cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism and independently of janus tyrosine kinase 2 and P-Rex1s. *Mol Pharmacol* 2013. <https://doi.org/10.1124/mol.112.084293>.
- [34] Wang Y, Zhao GX, Xu LH, Liu KP, Pan H, He J, et al. Cucurbitacin IIb exhibits anti-inflammatory activity through modulating multiple cellular behaviors of mouse lymphocytes. *PLoS One* 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089751>.
- [35] Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D, Sebt SM. Cucurbitacin Q: A selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene* 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208470>.
- [36] Escandell JM, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL. Bcl-2 is a negative regulator of interleukin-1 secretion in murine macrophages in pharmacological-induced apoptosis. *Br J Pharmacol* 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00856.x>.
- [37] Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebt SM. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res* 2003.
- [38] Wang X, Tanaka M, Peixoto HS, Wink M. Cucurbitacins: elucidation of their interactions with the cytoskeleton. *PeerJ* 2017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3357>.
- [39] Deng C, Zhang B, Zhang S, Duan C, Cao Y, Kang W, et al. Low nanomolar concentrations of Cucurbitacin-I induces G2/M phase arrest and apoptosis by perturbing redox homeostasis in gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* 2016. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.13>.
- [40] Thoennissen NH, Iwanski GB, Doan NB, Okamoto R, Lin P, Abbassi S, et al. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0536>.
- [41] Johnston PA, Grandis JR. STAT3 signaling: Anticancer strategies and challenges. *Mol Interv* 2011. <https://doi.org/10.1124/mi.11.1.4>.
- [42] Sörensen PM, Iacob RE, Fritzsche M, Engen JR, Briehar WM, Charras G, et al. The natural product cucurbitacin e inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS Chem Biol* 2012. <https://doi.org/10.1021/cb300254s>.

- [43] Ren S, Ouyang DY, Saltis M, Xu LH, Zha QB, Cai JY, et al. Anti-proliferative effect of 23,24-dihydrocucurbitacin F on human prostate cancer cells through induction of actin aggregation and cofilin-actin rod formation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-1921-z>.
- [44] World Health Organization (WHO). WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. *World Heal Organ* 2013. <https://doi.org/2013>.
- [45] Lorenz SA, Moy MA, Dolan AR, Wood TD. Electrospray ionization fourier transform mass spectrometry quantification of enkephalin using an internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19991115\)13:21<2098::AID-RCM759>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19991115)13:21<2098::AID-RCM759>3.0.CO;2-O).
- [46] Padley HR, Bashir S, Wood TD. Quantification of Biomolecules by External Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometry. *Anal Chem* 1997. <https://doi.org/10.1021/ac9700235>.
- [47] Höring M, Ejlsing CS, Hermansson M, Liebisch G. Quantification of Cholesterol and Cholesteryl Ester by Direct Flow Injection High-Resolution Fourier Transform Mass Spectrometry Utilizing Species-Specific Response Factors. *Anal Chem* 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05013>.
- [48] Ogunwale MA, Chen Y, Theis WS, Nantz MH, Conklin DJ, Fu XA. A novel method of nicotine quantification in electronic cigarette liquids and aerosols. *Anal Methods* 2017. <https://doi.org/10.1039/c7ay00501f>.
- [49] Thakare R, Chhonker YS, Gautam N, Alamoudi JA, Alnouti Y. Quantitative analysis of endogenous compounds. *J Pharm Biomed Anal* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.017>.
- [50] WHO. Annex 1 WHO guidelines on good herbal processing practices for herbal medicines. *WHO Tech Rep Ser No 1010* 2018.
- [51] Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med (United Kingdom)* 2018. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
- [52] Konoshima T, Takasaki M, Kozuka M, Haruna M, Ito K, Estes JR, et al. Constituents of Rosaceous Plants. I. Structures of New Triterpenoids from *Cowania mexicana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2011. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.1612>.
- [53] Herniman JM, Langley GJ, Bristow TWT, O'Connor G. The validation of exact

- mass measurements for small molecules using FT-ICRMS for improved confidence in the selection of elemental formulas. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.02.027>.
- [54] Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat Prod Rep* 2016. <https://doi.org/10.1039/c5np00073d>.
- [55] ANVISA. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Diário Of [Da] República Fed Do Bras 2017.
- [56] Deng P, Higashi RM, Lane AN, Bruntz RC, Sun RC, Ramakrishnam Raju M V., et al. Quantitative profiling of carbonyl metabolites directly in crude biological extracts using chemoselective tagging and nanoESI-FTMS. *Analyst* 2018. <https://doi.org/10.1039/c7an01256j>.
- [57] Gallego SF, Højlund K, Ejsing CS. Easy, Fast, and Reproducible Quantification of Cholesterol and Other Lipids in Human Plasma by Combined High Resolution MSX and FTMS Analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 2018. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1829-2>.
- [58] Gallego SF, Hermansson M, Liebisch G, Hodson L, Ejsing CS. Total fatty acid analysis of human blood samples in one minute by high-resolution mass spectrometry. *Biomolecules* 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9010007>.
- [59] Dong Y, Lu B, Zhang X, Zhang J, Lai L, Li D, et al. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis* 2010. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq167>.
- [60] Hata AN, Rowley S, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Ji F, et al. Synergistic activity and heterogeneous acquired resistance of combined MDM2 and MEK inhibition in KRAS mutant cancers. *Oncogene* 2017. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.258>.
- [61] Mohrherr J, Haber M, Breitenacker K, Aigner P, Moritsch S, Voronin V, et al. JAK–STAT inhibition impairs K-RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *Int J Cancer* 2019. <https://doi.org/10.1002/ijc.32624>.
- [62] Patra S, Young V, Llewellyn L, Senapati JN, Mathew J. BRAF, KRAS and PIK3CA mutation and sensitivity to Trastuzumab in breast cancer cell line model. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2017.

- <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.8.2209>.
- [63] Chavez KJ, Garimella S V., Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* 2010. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>.
 - [64] Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 1996. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0020>.
 - [65] Guo J, Wu G, Bao J, Hao W, Lu J, Chen X. Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner. *PLoS One* 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088140>.
 - [66] Letašiová S, Jantová S, Čipák L, Múčková M. Berberine-antiproliferative activity in vitro and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. *Cancer Lett* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.08.024>.
 - [67] Silva IT, Carvalho A, Lang KL, Dudek SE, Masemann D, Durán FJ, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B. *PLoS One* 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117794>.
 - [68] Torres-Moreno H, Marcotullio MC, Velázquez C, Arenas-Luna VM, Hernández-Gutiérrez S, Robles-Zepeda RE. Cucurbitacin IIb from *Ibervillea sonora* Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrested via STAT3 Inhibition. *Anticancer Agents Med Chem* 2020. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200415101701>.
 - [69] Choi HJ, Jung HL, Park SY, Ju HC, Han JS. STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells. *Exp Mol Med* 2009. <https://doi.org/10.3858/emmm.2009.41.2.012>.
 - [70] Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: A function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)00043-0).
 - [71] Wsierska-Gdek J, Schloffer D, Kotala V, Horky M. Escape of p53 protein from E6-mediated degradation in HeLa cells after cisplatin therapy. *Int J Cancer* 2002. <https://doi.org/10.1002/ijc.10580>.
 - [72] Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.021>.
 - [73] Jung HS, Erkin OC, Kwon MJ, Kim SH, Jung JI, Oh YK, et al. The synergistic

therapeutic effect of cisplatin with Human papillomavirus E6/E7 short interfering RNA on cervical cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2012. <https://doi.org/10.1002/ijc.26197>.

- [74] Tannin-Spitz T, Grossman S, Dovrat S, Gottlieb HE, Bergman M. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.012>.

ANEXOS

Anexo 1. Dados de RMN das três substâncias isoladas de *I. sonoreae*

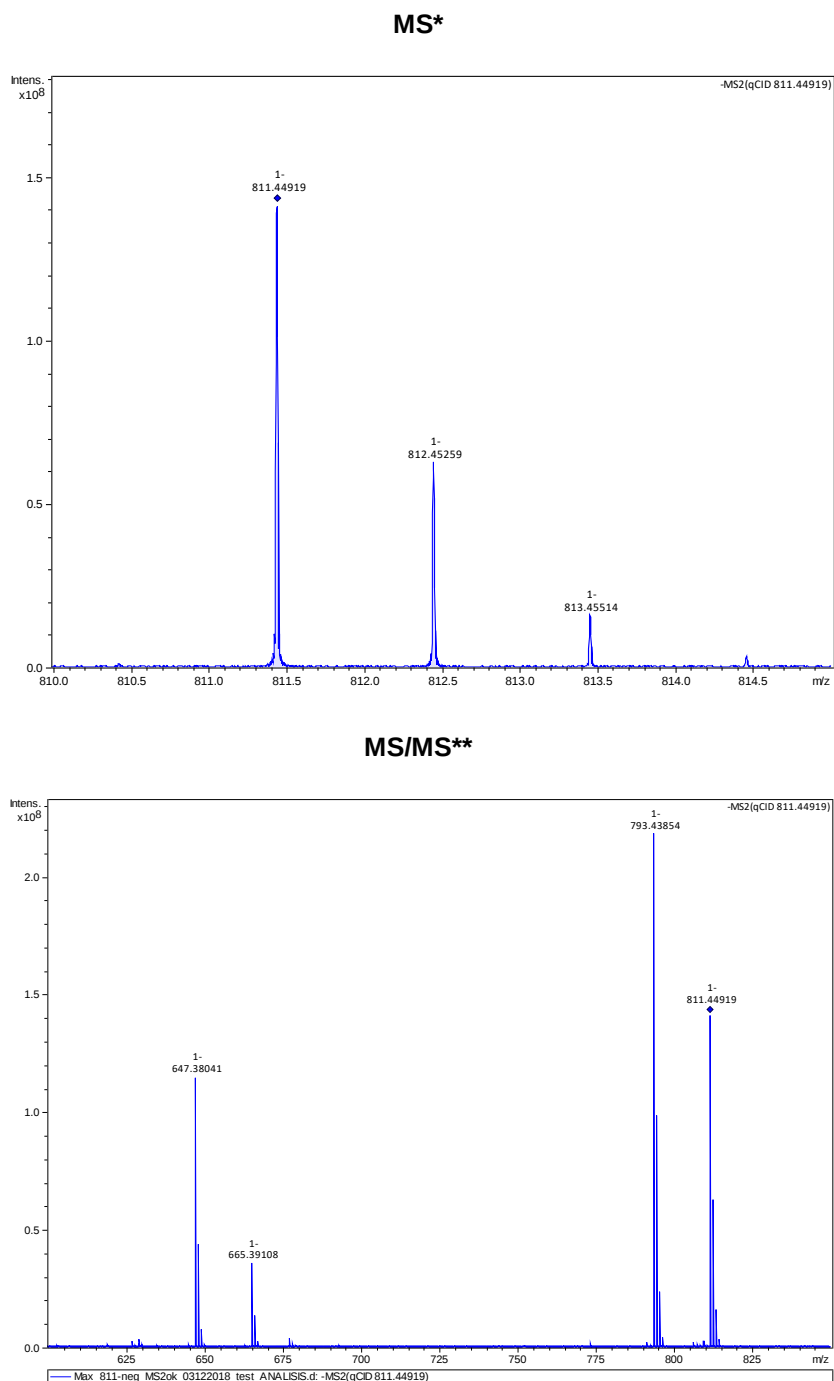
Anexo1. Dados espectrométricos das cucurbitacinas isolados de <i>I. sonoreae</i> . ^{a, b}								
Kinoína B diglicosídeo (1)			CIIb (2)			Substância 3		
Cnº	¹³ C	¹ H (m, J in Hz)	Cnº	¹³ C	¹ H (m, J in Hz)	Cnº	¹³ C	¹ H (m, J in Hz)
1	24.6	0.93 (s) 1.6 (dd, 7.6, 14.3)	1	33.2	1.72 (dt, 4.0, 4.0, 12.2) 0.94 (m)	1	24.6	0.88 (s) 1.54 (m)
2	26.4	1.64 (s) 1.84 (m)	2	70.1	3.47 (ddd, 4.2, 9.7, 11.5)	2	26.4	1.54 (m) 1.77 (d, 3.46)
3	82.9	3.27 (d, 14.4)	3	80.5	2.78 (d, 9.3)	3	83.0	3.21 (s)
4	41.2		4	42.0		4	41.2	
5	142.4		5	141.3		5	142.4	
6	118.1	5.73 (d, 5.7)	6	118.6	5.67 (d, 5.7)	6	118.1	5.7 (d, 5.5)
7	23.4	2.37 (dd, 7.2, 18.4) 1.94 (d, 5.7, 17.8)	7	23.1	2.31(dd, 8.0 19.3) 1.93(dd, 5.7, 19.4)	7	23.4	1.93 (dd, 5.3, 18.0) 2.34 (m)
8	42.9	1.88 (d, 7.8)	8	42.8	1.86 (d, 8.0)	8	42.9	1.85 (m)
9	48.4		9	56.8		9	47.7	
10	35.2	2.37 (d, 14.4)	10	33.4	2.4 (d, 13.3)	10	35.1	2.33 (s)
11	215.3		11	214.9		11	215.7	
12	48.8	2.51 (d, 14.4)	12	50.4	2.47 (s) 3.18 (m)	12	48.7	2.42 (m) 3.13 (m)
13	47.8		13	47.7		13	56.9	
14	50.5		14	48.4		14	51.2	
15	45.2	1.37 (d, 13.2) 1.81 (dd, 9.3, 13.0)	15	45.1	1.31 (d, 13.0) 1.75 (dd, 9.2, 12.8)	15	44.3	1.45(d,13.2) 1.77(dd, 9.3, 13.2)
16	70.1	4.4 (t, 7.8, 7.8)	16	70.0	4.34 (t, 7.8, 7.8)	16	68.0	4.65 (m)
17	57.8	2.57 (d, 7.4)	17	57.8	2.5 (d, 7.4)	17	55.4	2.33 (d, 6.8)
18	19.0	0.88 (s) 1.02 (s)	18	19.0	0.83 (s)	18	19.0	0.85 (d, 6.0)
19	21.5	0.99 (s)	19	18.3	1.22 (s)	19	18.9	0.97 (s)
20	79.4		20	79.4		20	75.8	
21	24.1	1.35 (s)	21	24.0	1.31 (m)	21	24.0	1.14 (s)
22	215.8		22	215.9		22	80.6	4.03 (d, 6.0)
23	31.7	2.71 (m) 2.84 (m)	23	31.6	2.65 (ddd, 5.1, 10.4, 16.2) 2.78 (ddd, 5.4, 10.9, 18.3)	23	128.2	5.77 (dd, 6.1, 15.8)
24	36.7	1.71 (m)	24	36.6	1.65 (m)	24	134.3	6.33 (m)
25	69.5		25	69.9		25	141.6	
26	27.7	1.18 (m)	26	28.0	1.12 (s)	26	17.5	1.83 (d, 3.6) 1.77 (d, 3.5)
27	28.0	1.18 (m)	27	27.8	1.12 (s)	27	115.5	4.92 (s)
28	24.0	1.21 (s)	28	20.7	0.89 (s)	28	21.5	0.94 (s)
29	24.1	1.35 (s)	29	23.8	1.1 (s)	29	22.7	1.85 (s)
30	18.5	1.3 (s)	30	19.1	1 (s)	30	18.1	1.25 (s)
1'	99.4	4.34 (d, 7.7)				1'	99.5	4.29 (d, 7.7)
2'	78.7	3.48 (t, 9.0, 9.0)				2'	75.3	3.38 (m)
3'	75.5	3.43 (m)				3'	76.2	3.15 (m)
4'	70.7	3.27 (t, 9.3, 9.3)				4'	78.7	3.44 (t, 9.0, 9.0)
5'	76.2	3.19 (m)				5'	70.7	3.21 (t, 9.3, 9.3)
6'	61.5	3.83 (d, 11.5) 3.65 (dd, 5.6, 11.8)				6'	61.6	3.78 (d, 11.5) 3.6 (d, 11.7)
1''	99.8	5.35 (d, 1.1)				1''	99.8	5.31 (s)
2''	70.9	3.87 (dd, 1.5, 3.1)				2''	70.8	3.82 (dd, 1.6, 3.2)
3''	70.6	3.65 (dd, 3.13 9.5)				3''	70.6	3.6 (m)
4''	72.7	3.4 (t, 9.7, 9.7)				4''	71.0	4.58 (m)
5''	68.1	4.07 (dd, 6.2, 9.4)				5''	72.7	3.34 (m)
6''	17.0	1.16 (m) 1.21 (m)				6''	17.0	1.12 (s) 1.13 (d, 1.9)

^a Os deslocamentos químicos estão expressados em valores δ (ppm). TMS é usado como referência interna.

^b Espectro gravado em CD₃OD.

Anexo 2. Análise por FT-ICR-MS/MS de kinoína B diglicosídeo (**1**) e CIlb (**2**)

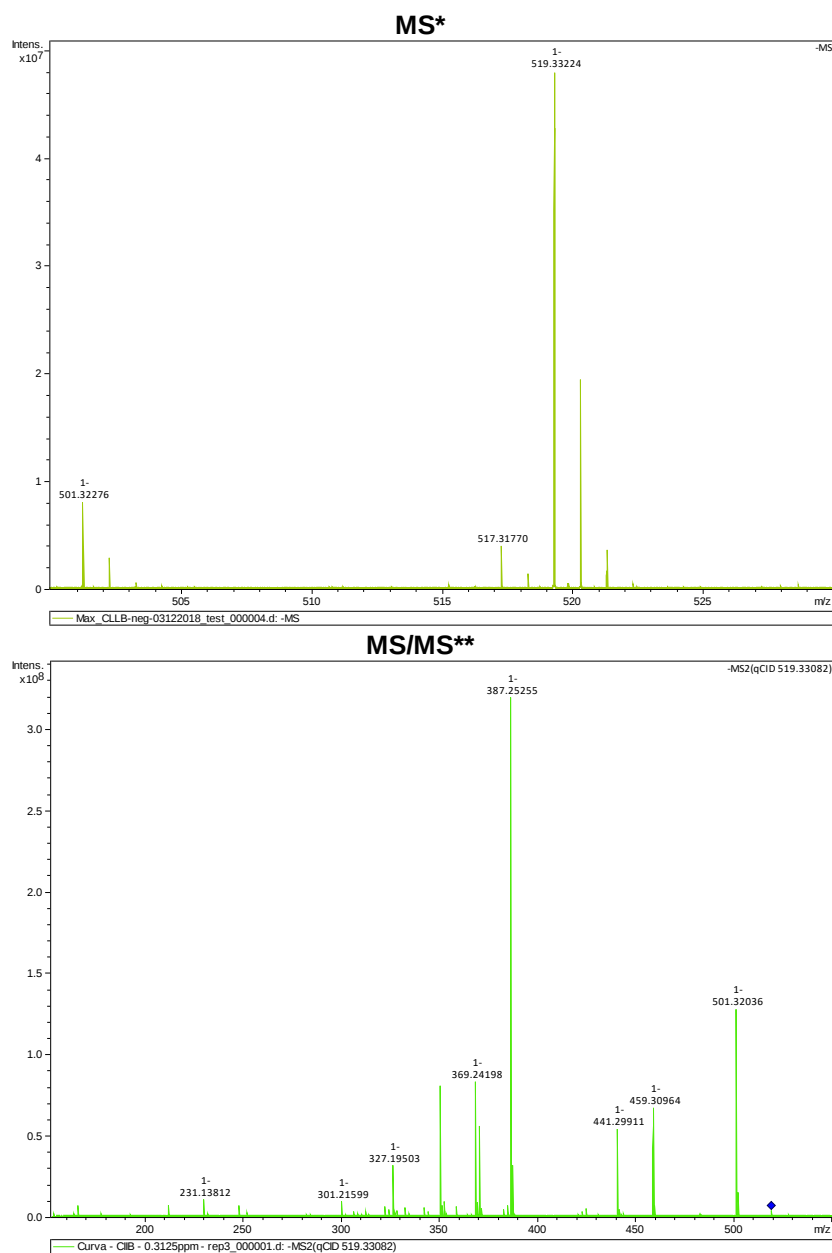
Análise por FT-ICR-MS/MS de kinoína B diglicosídeo (**1**)



* MS; m/z 811.44919 [M-H]⁻, → **MS/MS; m/z 793.43854 [M-H₂O-H]⁻, m/z 647.38041 [M-C₆H₁₂O₅-H]⁻ y m/z 665.39108 [M-C₆H₁₀O₄-H]⁻.

Espectro FT-ICR-MS/MS da kinoína B diglicosídeo (**1**).

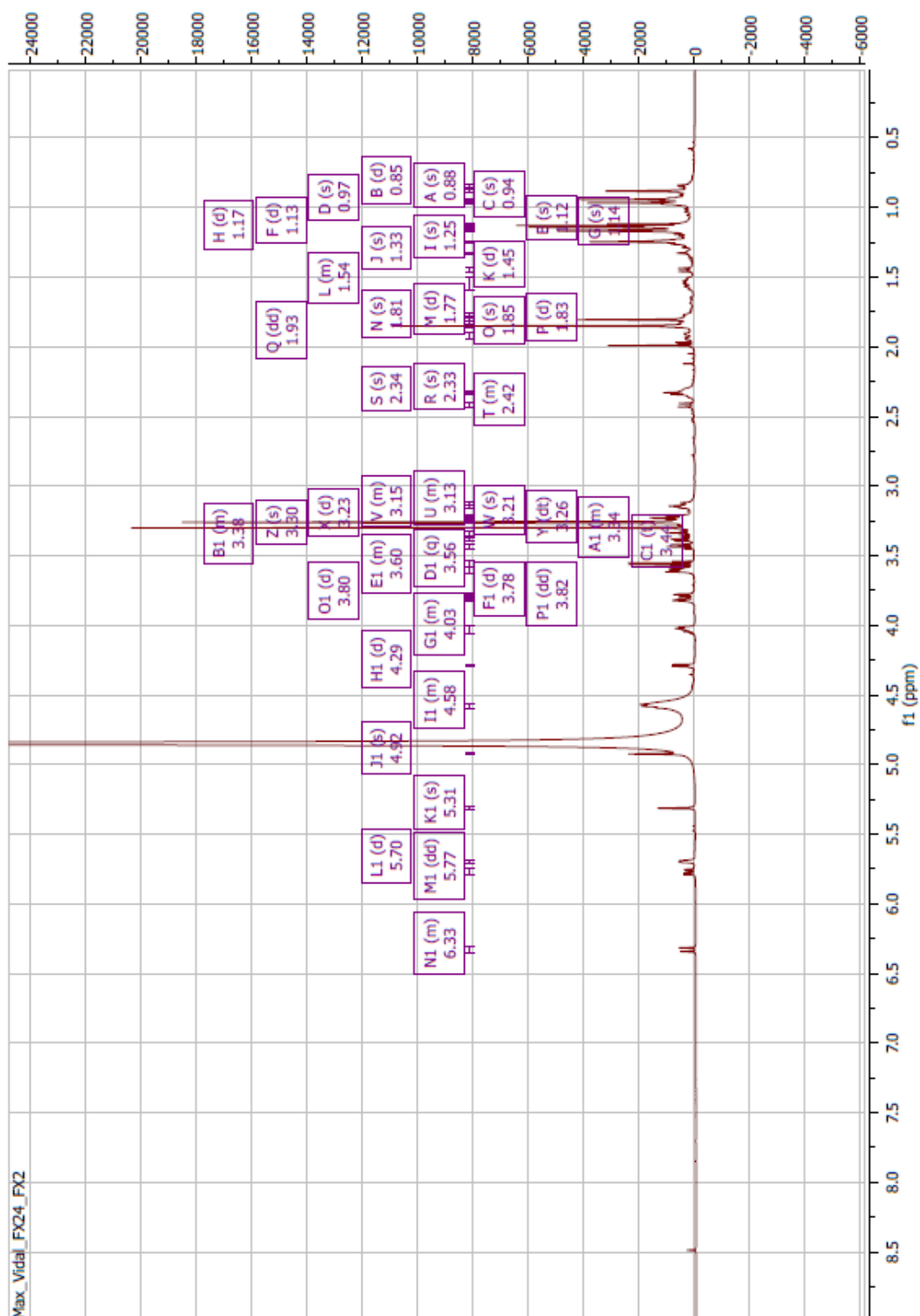
Analise FT-ICR-MS de CIIb (2).



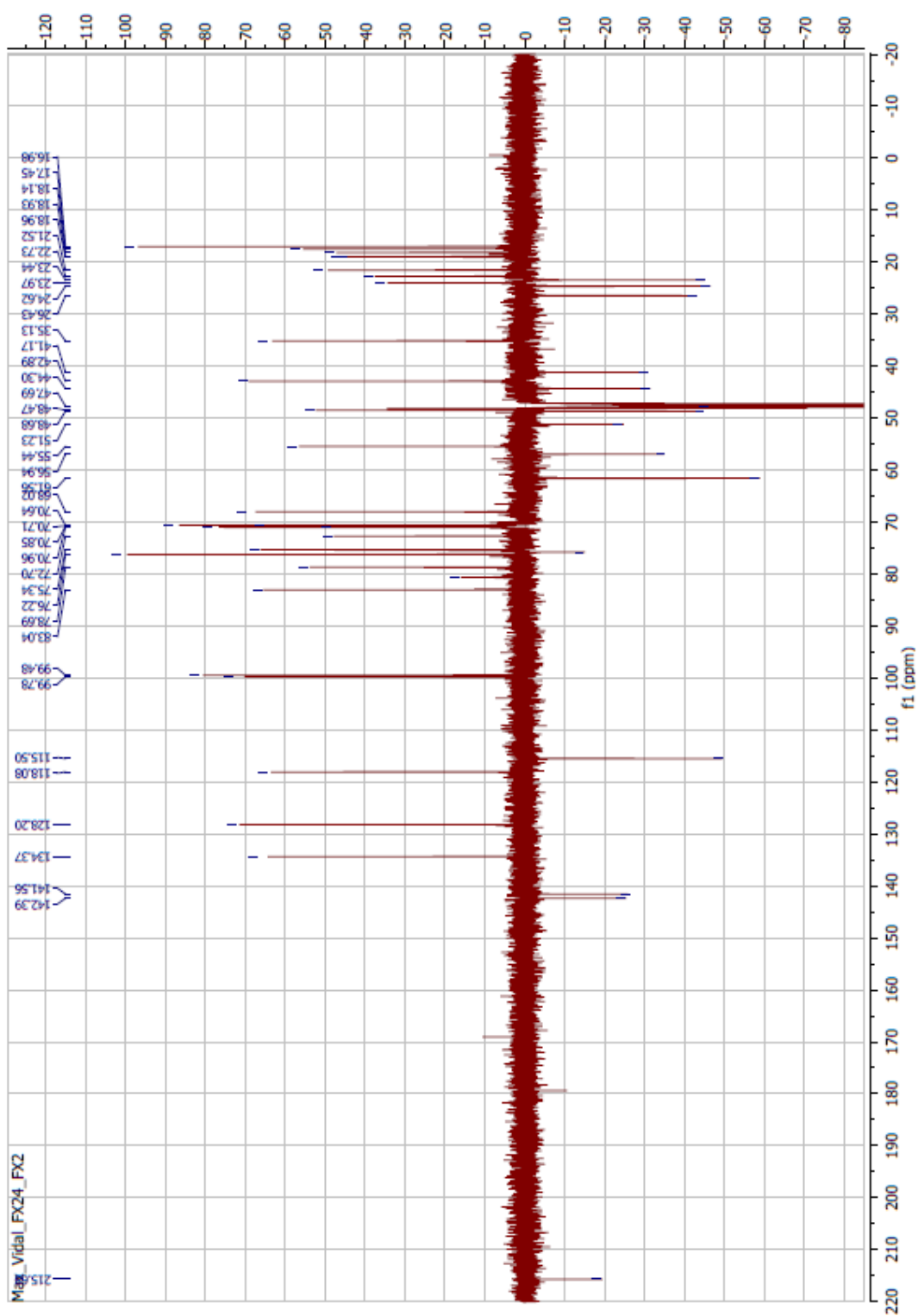
* MS; m/z 519.33224 $[M-H]^-$, → **MS/MS; m/z 387.25379 $[M-C_6H_{12}O_3-H]^-$ y m/z 501.62241 $[M-H_2O-H]^-$,
Espectro FT-ICR-MS da CIIb (2).

Anexo 3. Espectro de RMN da substância 3.

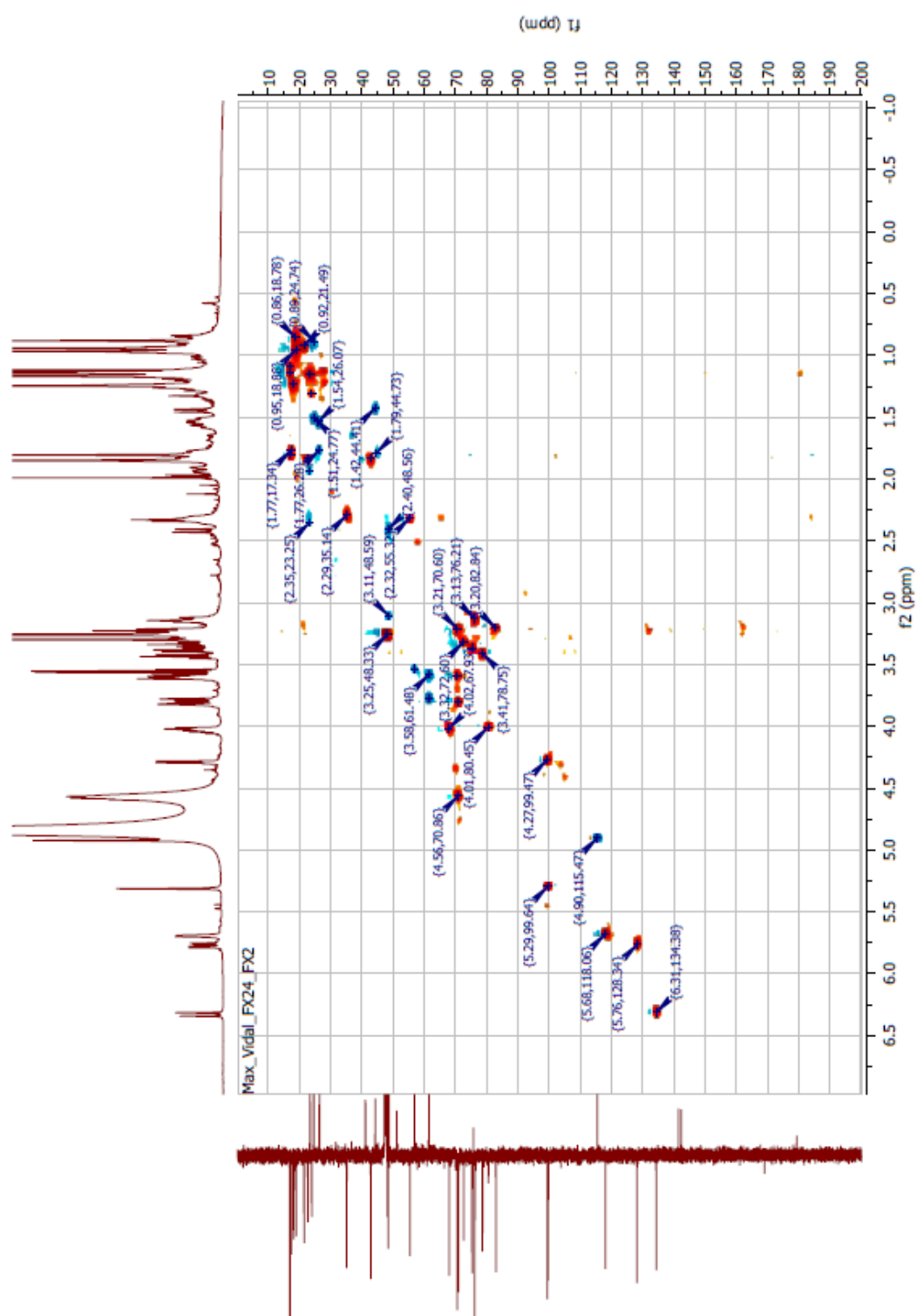
Experimento ^1H



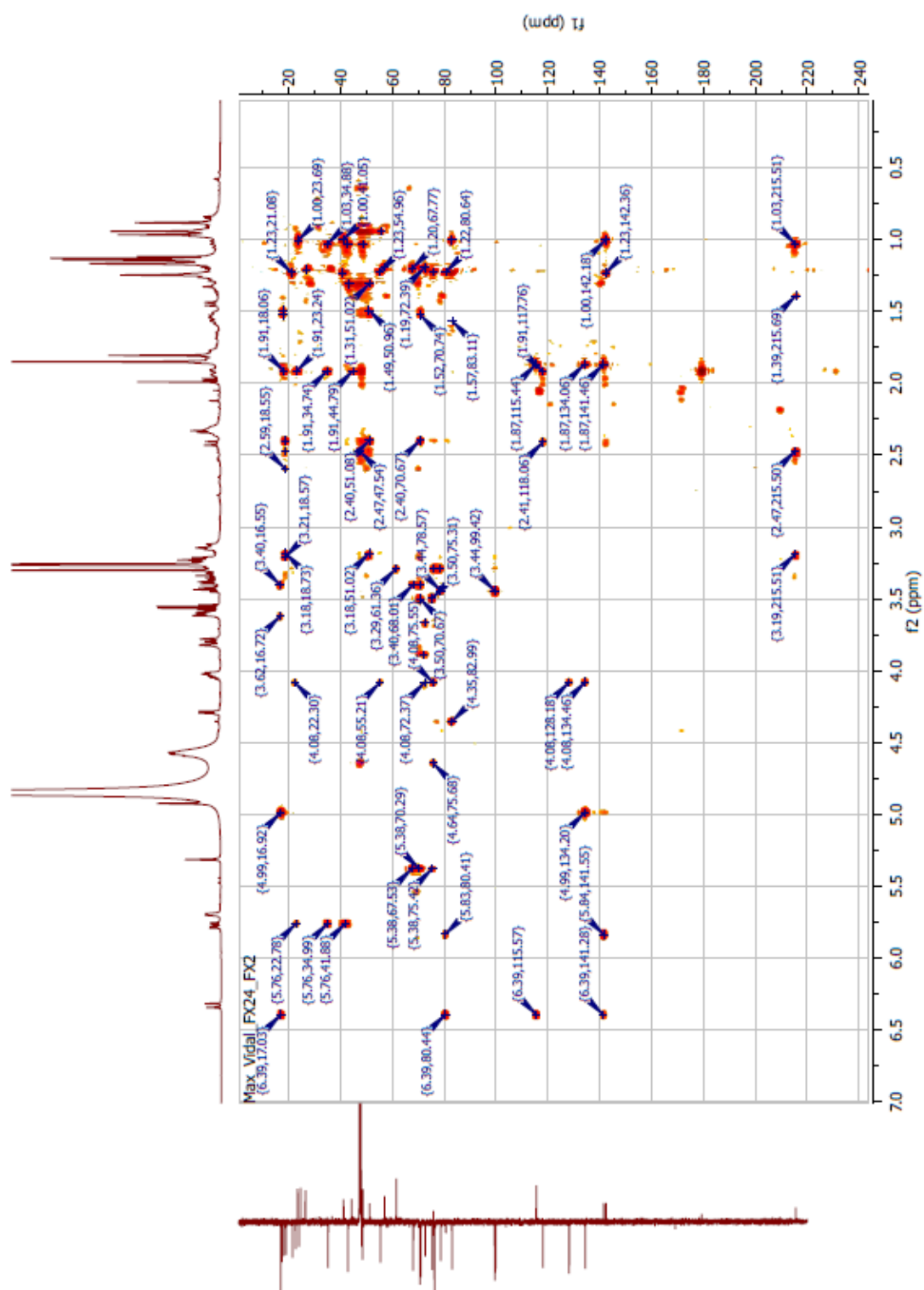
Experimento DEPTQ



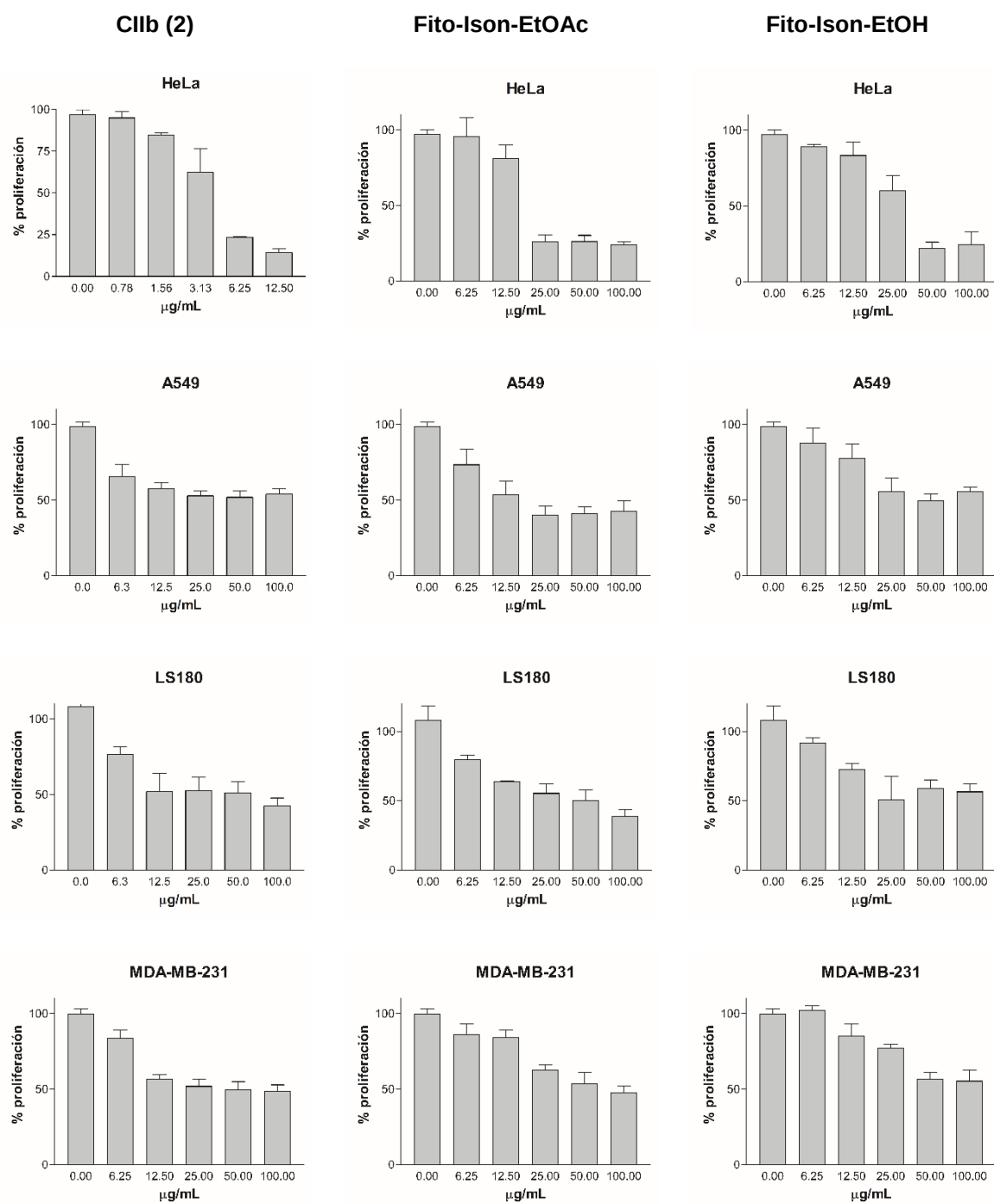
Experimento HSQC



Experimento HMBC



Anexo 4. Atividade antiproliferativa de fitopreparados e CIIb (2).



Gráficos de dose-atividade de CIIb (2), Fito-Ison-EtOAc e Fito-Ison-EtOH em linhas celulares de câncer após 48 h.

Anexo 5. Alterações morfológicas induzidas por tratamentos na linha celular HeLa e ARPE19.

