

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA**

Izabella Thaís da Silva

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE
CÚCURBITACINAS NATURAIS E DERIVADOS
SEMISSINTÉTICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Izabella Thaís
Avaliação da ação citotóxica e antitumoral de
cucurbitacinas naturais e derivados semissintéticos /
Izabella Thaís da Silva ; orientadora, Cláudia Maria
Oliveira Simões - Florianópolis, SC, 2013.
229 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Cucurbitacinas. 3. Câncer. 4. Morte
celular. 5. Antitumoral. I. Simões, Cláudia Maria
Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

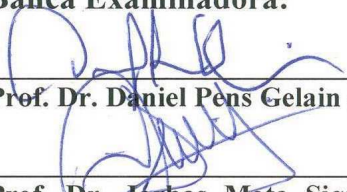
“Avaliação da Ação Citotóxica e Antitumoral de Cucurbitacinas Naturais e Derivados Semissintéticos”

POR


Izabella Thaís da Silva

Tese julgada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:


Banca Examinadora:



Prof. Dr. Daniel Pens Gelain (UFRGS – Membro Titular)



Prof. Dr. Jarbas Mota Siqueira Júnior (FUNDAÇÃO CERTI – Membro Titular)



Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC - Membro Titular)



Profa. Dra. Maria Cláudia Santos Silva (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Orientadora)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 15 de julho de 2013.

À minha família João Carlos, Silvana,
e Arthur pelo apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo e permitir que eu tenha forças para completar mais uma etapa importante em minha vida.

Aos meus pais João Carlos e Silvana e ao meu irmão Arthur, pela presença constante em minha vida e pensamento, pelo amor incondicional, por me ensinarem a lutar e a buscar, por sempre me acolherem e estarem comigo. Amo muito vocês!

Ao Bruno que, mesmo de longe, sempre me incentivou e apoiou com seu amor.

À Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, minha orientadora, por todos os anos de supervisão e, sobretudo, amizade e incentivo.

À minha querida IC, Marina Teixeira, pela imensa colaboração e aprendizado mútuo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, pela oportunidade, possibilitando minha capacitação.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada, por todos os momentos passados juntos, dentro e fora do laboratório.

To my supervisor Dr. Stephan Ludwig and to Dr. Viktor Wixler for being supportive during my internship in Münster. I am also thankful to all my friends from the Institute of Molecular Virology at University of Münster, especially Sabine Dudek, Dörthe and Katharina for their support and help. *Dankeschön!*

Aos amigos e funcionários do LAMEB, Bibiana e Denis, pelas infinitas análises.

À Profa. Dra. Karen Luise Lang e seus orientadores Prof. Dr. Miguel S. B. Caro, do Departamento de Química e Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, ambos da UFSC, e também ao Prof. Dr. Fernando Durán, da Universidade de Buenos Aires, Argentina, pela importantíssima colaboração, cedendo todas as amostras estudadas neste trabalho. Este agradecimento estende-se a todos os membros de suas equipes, que colaboraram para propiciar o fornecimento das substâncias.

A todos os meus amigos, de perto e de longe, pela amizade e companheirismo essenciais à minha vida.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESC/PRONEX pela concessão das bolsas e apoio financeiro à pesquisa, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

A todos os professores, técnicos, colegas e amigos, cujos nomes não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma estiveram ao meu lado e contribuíram enormemente para a realização deste trabalho.

Izabella Thaís da Silva

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutã

Esta tese foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, coordenado pela Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, e no Instituto de Virologia Molecular, da Universidade de Münster, Alemanha, coordenado pelo Prof. Dr. Stephan Ludwig, (estágio sanduíche em 2012), e foi apoiada financeiramente pelo CNPq (auxílios números 553683/2009-8 e 472979/2011-6), pela CAPES (bolsa PDSE) e pela FAPESC/PRONEX.

RESUMO

Mundialmente, o câncer de pulmão é um dos principais responsáveis pela alta taxa de mortalidade atribuída ao câncer, tornando necessária a busca por novos agentes no combate a esta malignidade. Cucurbitacinas (CUCs) são compostos triterpênicos tetracíclicos encontrados, principalmente, em espécies da família Cucurbitaceae, conhecidas por seu amargor e toxicidade. Nos últimos anos, vários estudos confirmaram a potencial atividade citotóxica e antitumoral de algumas cucurbitacinas. Neste trabalho, foi realizada a triagem citotóxica de uma série de 51 cucurbitacinas naturais e derivados semissintéticos, através do ensaio colorimétrico do MTT, seguida da elucidação do mecanismo de morte celular provocada pelas cucurbitacinas mais ativas, com destaque para as CUCs 18 e 37. A CUC 18, uma cucurbitacina natural inédita, isolada de *Wilbrandia ebracteata* (taiuiá), induziu apoptose em células A549, bloqueou-as na fase G2/M do ciclo celular, e provocou desestruturação do citoesqueleto. Esses efeitos foram atribuídos à inibição das vias de sinalização STAT3 e AKT, o que acarretou na baixa expressão de genes antiapoptóticos. A CUC 37, um novo derivado semissintético da cucurbitacina B, também induziu apoptose, bloqueio na fase G2/M do ciclo celular, e desestruturação do citoesqueleto de células A549, porém em concentrações 30 vezes mais baixas do que a CUC 18. A CUC 37 atuou diretamente sobre os receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR), causando a redução da expressão de vias de sinalização localizadas abaixo deste receptor (ERK, PI3K/AKT e STAT3) e, conseqüentemente, reduzindo a transcrição dos genes alvos das mesmas. Além disso, a CUC 37 apresentou seletividade em relação a linhagens oncogênicas (NIH3T3/v-RAF e NIH3T3/k-RAS), quando comparada aos fibroblastos saudáveis (NIH3T3). Finalmente, o efeito antitumoral da CUC 37 foi confirmado em um modelo animal de tumor de pulmão, utilizando-se camundongos geneticamente modificados (c-RAF-1-BxB). Em conjunto, estes resultados sugerem que a CUC 37 é um candidato promissor a ser desenvolvido como fármaco para o tratamento de câncer de pulmão.

Palavras-chave: cucurbitacinas, atividade citotóxica, apoptose, efeito antitumoral, câncer de pulmão.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the leading causes of death by cancer worldwide, which stimulates the search for new agents for the treatment of this malignancy. Cucurbitacins (CUCs) are a group of tetracyclic triterpenoid compounds found mainly in species of the Cucurbitaceae family, known for their bitterness and toxicity. In the past years, many reports confirmed the cytotoxic and antitumor activities of some cucurbitacins. In the present work a cytotoxic screening with 51 cucurbitacins and their semisynthetic derivatives was performed by MTT colorimetric assay, and then, the mechanism of cell death was investigated for the most active ones, with an emphasis on CUC 18 and CUC 37. The CUC 18, a novel cucurbitacin isolated from *Wilbrandia ebracteata* (taiuiá), induced apoptosis on A549 cells, arrested the cell cycle at G2/M phase and led to a disruption of the actin cytoskeleton. These effects were attributed to inhibition of STAT3 and AKT signaling pathways, which led to down regulation of antiapoptotic genes transcription. The CUC 37, a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B, also induced apoptosis, cell cycle arrest at G2/M phase, and actin cytoskeleton disruption, however with concentrations about 30 times lower than the CUC 18. The CUC 37 targeted directly the epidermal growth factor receptors (EGFR), leading to a down regulation of the downstream signaling pathways of this receptor (ERK, PI3K/AKT, and STAT3) and, consequently, their antiapoptotic target genes. Besides, the CUC 37 showed more selectivity towards NIH3T3/v-RAF and NIH3T3/k-RAS cells, when compared to non-transformed cells (NIH3T3 wild type cells). Finally, the antitumor effect of CUC 37 was confirmed in an *in vivo* lung tumor model, employing transgenic mice (c-RAF-1-BxB). Taken together, these findings strongly suggest that CUC 37 is a promising drug candidate for the treatment of lung cancer.

Keywords: cucurbitacins, cytotoxic activity, apoptosis, antitumor effect, lung cancer.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1: Esqueleto básico (cucurbitano) de uma curcubitacina..... | 29 |
| Figura 2: Tipos de tratamento, de acordo com as principais características biológicas do câncer..... | 41 |
| Figura 3: Características morfológicas da apoptose e da necrose..... | 49 |
| Figura 4: Apoptose extrínseca..... | 51 |
| Figura 5: Apoptose intrínseca dependente e independente da ativação de caspases..... | 52 |
| Figura 6: Vias de sinalização antiapoptóticas..... | 57 |
| Figura 7: Via PI3K/AKT..... | 59 |
| Figura 8: Representação esquemática das proteínas c-RAF-1 e c-RAF-1-BxB..... | 67 |
| Figura 9: Efeito das curcubitacinas 16, 19, 20 e 31 na distribuição das células A549, em diferentes fases do ciclo celular..... | 151 |
| Figura 10: População de células apoptóticas (%) tratadas por 12 h com as curcubitacinas 16, 19, 20 e 31 em relação ao controle de células não tratadas..... | 152 |
| Figura 11: Análise da ativação das caspases 3, 8 e 9, em células A549 tratadas por 12 h com as curcubitacinas 16, 19 e 20..... | 153 |
| Figura 12: Imagem do controle de células A549 não tratadas, obtida através de microscopia confocal..... | 154 |
| Figura 13: Imagem obtida por microscopia confocal das células A549 tratadas com a curcubitacina 16..... | 155 |
| Figura 14: Imagem obtida por microscopia confocal das células A549 tratadas com a curcubitacina 19..... | 155 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 15: Imagem obtida por microscopia confocal das células tratadas com a cucurbitacina 20..... | 156 |
| Figura 16: Análise da expressão das proteínas de citocromo <i>c</i> , caspase 3 (forma clivada), p-STAT3 e Bcl-2 por Western blotting em células A549..... | 158 |
| Figura 17: Efeito das cucurbitacinas na expressão de proteínas das vias AKT e ERK..... | 162 |
| Figura 18: Efeito das cucurbitacinas na fosforilação de intermediários da via de sinalização PI3K..... | 163 |
| Figura 19: Efeito das cucurbitacinas sobre os receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR) e as principais vias deflagradas por sua ativação (AKT e ERK)..... | 164 |
| Figura 20: Estruturas e valores de CC ₅₀ das oito cucurbitacinas selecionadas para avaliação do mecanismo de morte celular..... | 171 |
| Figura 21: Esquema de seleção dos compostos avaliados..... | 173 |
| Figura 22: Representação esquemática do mecanismo da ação citotóxica da CUC 37, em células A549..... | 178 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Quadro 1: Características das principais vias de morte celular e as formas de detecção..... | 46 |
| Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais..... | 73 |
| Quadro 3: Quadro comparativo das propriedades físico-químicas e biológicas das cucurbitacinas selecionadas..... | 174 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Triagem citotóxica do primeiro grupo de cucurbitacinas testadas frente a diferentes linhagens celulares tumorais, cujos resultados estão expressos em percentuais de viabilidade celular.....86
- Tabela 2: Determinação dos valores de CC_{50} das cucurbitacinas mais ativas na triagem anterior frente a diferentes linhagens celulares tumorais.....87
- Tabela 3: Determinação dos valores de CC_{50} do segundo grupo de cucurbitacinas frente às células A549.....89
- Tabela 4: Determinação dos valores de CC_{50} das cucurbitacinas mais ativas, do primeiro grupo avaliado, em diferentes tempos de tratamento 149
- Tabela 5: Perfis de transdução de sinais, em células A549, tratadas com cucurbitacinas, obtidos por Western blotting..... 160
- Tabela 6: Comparação de citotoxicidade das cucurbitacinas mais ativas frente a células saudáveis (fibroblastos) e tumorais (A549).....165
- Tabela 7: Comparação de citotoxicidade das cucurbitacinas mais ativas frente a células saudáveis (NIH3T3) e transfectadas com oncogenes (NIH3T3/k-RAS e NIH3T3/v-RAF)..... 166

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 25 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 29 |
| 2.1 Cucurbitacinas | 29 |
| 2.1.1 Potencial citotóxico e antitumoral de cucurbitacinas..... | 31 |
| 2.2 Câncer | 38 |
| 2.2.1 Câncer de pulmão | 42 |
| 2.3 Morte celular e alvos terapêuticos | 44 |
| 2.3.1 A via de sinalização PI3K/AKT | 58 |
| 2.3.2 As vias de sinalizações RAF/MEK/ERK e JAK/STAT..... | 60 |
| 2.4 Modelos <i>in vivo</i> para avaliação de potenciais compostos antitumorais | 62 |
| 2.4.1 Modelos xenográficos derivados de linhagens de células tumorais de pacientes..... | 63 |
| 2.4.2 Modelos de camundongos geneticamente planejados..... | 65 |
| 3 OBJETIVOS | 69 |
| 3.1 Objetivo geral | 69 |
| 3.2 Objetivos específicos | 69 |
| CAPÍTULO I: TRIAGEM <i>IN VITRO</i> DA AÇÃO CITOTÓXICA DE CUCURBITACINAS NATURAIS E DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS..... | 71 |
| 1. APRESENTAÇÃO..... | 73 |
| CAPÍTULO II: ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA DE UMA DAS CUCURBITACINAS NATURAIS INÉDITAS MAIS ATIVAS FRENTE À LINHAGEM CELULAR TUMORAL A549..... | 91 |
| 1. APRESENTAÇÃO..... | 93 |
| 2. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER RESEARCH | 95 |

CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA EM CÉLULAS A549 & DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DA CUCURBITACINA B (DeCUCB83), EM UM MODELO MURINO DE TUMOR DE PULMÃO. 111

1. APRESENTAÇÃO..... 113

2. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO AO PERIÓDICO *CANCER RESEARCH*. 115

CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA DE CUCURBITACINAS NATURAIS E DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS ATIVOS NÃO INCLUSOS NAS PUBLICAÇÕES PRÉVIAS..... 145

1. APRESENTAÇÃO..... 147

2. ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA DAS CUCURBITACINAS MAIS ATIVAS SELECIONADAS NA PRIMEIRA TRIAGEM, FRENTE À LINHAGEM CELULAR TUMORAL A549..... 149

3. RESULTADOS OBTIDOS DURANTE A REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO SANDUÍCHE NA UNIVERSIDADE DE MÜNSTER, ALEMANHA (2012-2013)..... 158

4. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DAS CUCURBITACINAS MAIS ATIVAS..... 165

4 DISCUSSÃO GERAL 169

5 CONCLUSÕES..... 179

REFERÊNCIAS..... 181

APÊNDICE 1 211

APÊNDICE 2 221

APÊNDICE 3 229

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células invasoras de tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. A cada ano, o câncer é diagnosticado em milhões de pessoas, sendo a segunda maior causa de mortes no mundo, após as doenças cardiovasculares (BRASIL/INCA, 2011), apesar de essas últimas estarem decaindo. Embora muitos medicamentos estejam disponíveis para o tratamento de vários tipos de cânceres, há ainda necessidade de se buscar novos fármacos mais eficazes e seletivos para aumentar o arsenal quimioterápico disponível (WILLIAM et al., 2009).

A pesquisa e o desenvolvimento (P&D) de novos fármacos têm passado por avanços significativos, principalmente após a introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, propiciando uma análise estatística consistente dos resultados. Os avanços tecnológicos que contribuíram para a busca de novos compostos referem-se à descoberta de novas ferramentas moleculares e à evolução das estratégias de síntese orgânica, resultando em substâncias ativas mais eficazes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como protótipos de fármacos com atividades farmacológicas semelhantes às das originais (KEEP et al., 2011; FOX; MYUNG, 2012).

O Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (www.lvapli.ufsc.br), sob a coordenação da Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, há vários anos avalia a citotoxicidade (frente a linhagens de células saudáveis e também linhagens celulares tumorais), genotoxicidade e potencial atividade antiviral de produtos naturais e de compostos sintéticos. A equipe do laboratório vem buscando constantemente a implementação de metodologias diferenciadas, a fim de complementar os estudos realizados no referido laboratório, propiciando a prática da multidisciplinaridade e uma formação mais completa dos recursos humanos envolvidos. Neste sentido, metodologias que objetivam avaliar a morte celular e elucidar o mecanismo de citotoxicidade envolvendo células tumorais estão sendo estabelecidas no laboratório, tendo em vista a importância, não somente de se detectar novos compostos citotóxicos, mas também de se definir o tipo e o perfil de morte envolvidos.

Conforme o projeto de tese apresentado inicialmente ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, o presente trabalho teve como **objetivo principal** ampliar o conhecimento científico disponível sobre cucurbitacinas, com potencial a ser desenvolvido no tratamento de tumores. Entre os fatores que estimularam a realização deste estudo, além de dados já relatados na literatura, estão os dados preliminares obtidos em nosso Laboratório, que indicaram a potencial ação citotóxica de algumas cucurbitacinas.

De acordo com os objetivos propostos, esta tese foi elaborada em capítulos, que constam de uma breve apresentação do tema abordado e os resultados na forma de manuscritos. O **Capítulo I** descreve os procedimentos e resultados obtidos na triagem citotóxica de cucurbitacinas, tanto de origem natural quanto de derivados semissintéticos (DeCUCs), os quais já foram publicados em dois periódicos da área (LANG et al., 2011; LANG et al., 2012). No **Capítulo II** estão descritos os resultados relativos à elucidação do mecanismo de indução de morte celular de uma cucurbitacina natural, inédita na literatura, frente a uma das linhagens celulares tumorais utilizadas na triagem citotóxica (células A549), apresentados na forma de um terceiro artigo já publicado. No **Capítulo III** estão expostos resultados referentes ao estudo do mecanismo da ação citotóxica, bem como à avaliação da atividade antitumoral de um DeCUC, em um modelo murino de tumor de pulmão *in vivo*, os quais fizeram parte dos estudos realizados durante o estágio sanduíche, no Instituto de Virologia Molecular da Universidade de Münster, na Alemanha. Estes resultados estão apresentados na forma de um manuscrito a ser enviado para avaliação. No **Capítulo IV** estão apresentados os resultados obtidos com as outras cucurbitacinas ativas, não inclusos nas quatro publicações citadas acima. Segue uma Discussão Geral sobre todos os resultados obtidos. Na forma de Apêndices 1, 2 e 3, são apresentados, respectivamente, os resultados referentes à avaliação da permeabilidade intestinal de duas cucurbitacinas ativas, empregando o modelo de células Caco-2; os resultados referentes à avaliação sinérgica de algumas cucurbitacinas ativas com fármacos quimioterápicos usados na clínica, e uma relação de publicações correspondentes a outras atividades realizadas no período do doutoramento.

É importante informar que, nesta tese, os termos citotóxico, antitumoral e anticâncer foram utilizados, segundo proposto pelo NCI (*National Cancer Institute*, EUA). O termo citotóxico se refere a

agentes tóxicos para células tumorais *in vitro*, os quais causam morte celular por diferentes mecanismos. A atividade antitumoral designa resultados obtidos *in vivo* em modelos animais, enquanto que o termo anticâncer é utilizado para agentes que apresentam atividade em humanos (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cucurbitacinas

As cucurbitacinas constituem um grupo de triterpenos tetracíclicos polihidroxilados, conhecidas por seu sabor amargo e toxicidade. Estruturalmente, estes compostos são caracterizados pelo seu esqueleto biogeneticamente incomum [19(10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanostano (cucurbitano)] (Figura 1), que pode ser encontrado na forma livre ou glicosilado (VALENTE, 2004; CHEN et al., 2005; RÍOS et al., 2005; 2012; LEE et al., 2010). Elas são reconhecidas principalmente como sendo os compostos tóxicos de plantas da família Cucurbitaceae, atuando como feromônios, que protegem as mesmas de insultos externos, tendo sido isoladas de algumas espécies dessa família botânica e usadas na medicina popular brasileira, tais como a “buchinha” (*Luffa operculata*) (MATOS; GOTTLIEB, 1967; KAWAHARA et al., 2001), “taiuíá” (*Wilbrandia ebracteata* e/ou *Cayaponia tayuya*) (SCHENKEL et al, 1992; FARIAS et al 1993) e “nhandiroba” (*Fevillea trilobata*) (VALENTE et al, 1993; 1994).

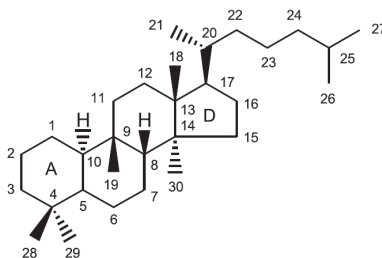


Figura 1: Esqueleto básico (cucurbitano) de uma cucurbitacina.

Fonte: Ríos et al. (2005).

A primeira cucurbitacina, chamada elaterina, foi isolada de *Ecballium elaterium* (Linn.) A. Rich, em 1831, e desde então diversas cucurbitacinas foram isoladas, não só da família Cucurbitaceae (REHM et al., 1957) como também de outras famílias botânicas, tais como Begoniaceae, Chrysobalanaceae, Cruciferae, Datisceae, Desfontaniaceae, Elaeocarpaceae, Flacourtiaceae, Lauraceae, Liliaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae,

Scrophulariaceae, Sterculiaceae e Thymelaeaceae (FULLER et al., 1994; MIRÓ, 1995; SARKER et al., 1999; DINAN et al., 2001), e de cogumelos do gênero *Hebeloma* (FUJIMOTO et al., 1987).

As cucurbitacinas foram arbitrariamente divididas em 12 categorias, e denominadas em ordem alfabética de A a T. Alguns estudos referentes aos metabólitos secundários destas plantas revelaram que as cucurbitacinas B e E são as cucurbitacinas originais. Outros tipos naturais de cucurbitacinas poderiam ser originárias de reações enzimáticas durante o crescimento da planta e, ainda, sob certas condições ambientais. Por exemplo, o metabolismo da cucurbitacina B gerou as cucurbitacinas A, C, D, F, G e H, enquanto que a partir do metabolismo da cucurbitacina E foram geradas as cucurbitacinas I, J, K e L. Adicionalmente, as cucurbitacinas B e D podem ser reduzidas a 23,24-diidrocurcubitacina B e 23,24-diidrocurcubitacina D, respectivamente. No reino vegetal, as cucurbitacinas B e D estão presentes em maior quantidade, seguidas pelas cucurbitacinas E, G, H e I (MIRÓ, 1995; CHEN et al., 2005).

Na medicina tradicional, plantas contendo cucurbitacinas são conhecidas por suas propriedades antipirética, analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, hepatoprotetora e antitumoral (GEISSMAN et al., 1964; RECIO et al., 2004; CHEN et al., 2005; ESCANDELL et al., 2006; CHEN et al., 2012; ALGHASHAM, 2013). A título de exemplo, nos anos 70 e 80, uma planta integrante da medicina herbária tradicional chinesa, conhecida como “GuaDi” (*Cucumis melo* L.), era prescrita para desordens hepáticas por médicos chineses, fazendo com que surgissem, na época, alguns estudos a respeito de suas propriedades anti-hepatite e também frente à carcinomas hepáticos (REN; HONG, 1986; XIANG et al., 1987). Hoje se sabe que esta planta é rica em cucurbitacinas B e D, e tais efeitos biológicos foram atribuídos à presença desses compostos (WANG et al., 2012). De fato, nos últimos anos, as cucurbitacinas B, D, E, I, assim como seus derivados, têm sido extensivamente estudados, principalmente, por suas promissoras atividades citotóxica e antitumoral (SU et al., 2008; YIN et al., 2008; WAKIMOTO et al., 2008; LUI et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2009; THOENNISSSEN et al., 2009; LEE et al., 2010; SUN et al., 2010; ZHANG et al., 2010; DING et al., 2011; HSU et al., 2011; ISHDORJ et al., 2011; ZHANG et al., 2011; CHEN et al., 2012; RÍOS et al., 2012;

ABBAS et al., 2013; ISHII et al., 2013; KAUSAR et al., 2013; PROMKAN et al., 2013).

2.1.1 Potencial citotóxico e antitumoral de cucurbitacinas

Os efeitos citotóxicos e antitumorais das cucurbitacinas foram descritos pela primeira vez há mais de 50 anos para a elatericina A (cucurbitacina D) e para a elatericina B (cucurbitacina E). Essas cucurbitacinas inibiram a proliferação de células *in vitro* e também o crescimento de tumores em camundongos (GITTER et al., 1961; GALLILY et al., 1962; SHOHAT et al., 1962; GEISSMAN et al., 1964). Surpreendentemente, poucos foram os estudos publicados neste tema nos 20 anos seguintes, possivelmente pela sua elevada toxicidade e inexistência de ensaios mais sofisticados para o estudo do seu mecanismo de ação. Além disso, o limitado conhecimento a respeito da biologia do câncer, atrelado a falta de um sistema de avaliação simples e efetivo para triagem de compostos, negligenciando ainda a importância dos produtos naturais como fonte de novos agentes citotóxicos, podem ter sido as razões para este limitado número de estudos (SHOHAT et al., 1965; DOSKOTCH et al., 1969; KUPCHAN et al., 1970; KONOPA et al., 1974; TESSIER; PARIS, 1978; ARISAWA et al., 1984).

No final dos anos 80, o estabelecimento de um protocolo pelo NCI, que preconizava a utilização de 60 linhagens de células tumorais para a triagem de novos compostos citotóxicos (SHOEMAKER, 2006), impulsionou a busca por novos compostos naturais com potencial a serem desenvolvidos como fármacos antitumorais, incluindo as cucurbitacinas. A partir desse programa, na década de 90, surgiu novamente o interesse na avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de cucurbitacinas, incluindo a análise do mecanismo molecular da sua ação citotóxica (LEE et al., 2010).

Mais recentemente, diversas revisões e trabalhos científicos relataram a promissora atividade antiproliferativa de cucurbitacinas, especialmente das cucurbitacinas B, D, E e I, frente a diferentes tipos de células de tumores, tais como:

- ✓ de mama (JAYAPRAKASAM et al., 2003; WAKIMOTO et al., 2008; KONGTUN et al., 2009; DUANGMANO et al., 2010; DAKENG et al., 2012; DUANGMANO et al.,

- 2012a,b; PROMKAN et al., 2013; LOPEZ-HABER; KAZANIETZ, 2013);
- ✓ de fígado (TAKAHASHI et al., 2009; ZHANG et al., 2009; CHAN et al., 2010a);
- ✓ de pâncreas (THOENNISSEN et al., 2009; SUN et al., 2010; ZHANG et al., 2010);
- ✓ de leucemias (HARITUNIANS et al., 2008; CHAN et al., 2010b; LI et al., 2010; LIU et al., 2010b; MATSUDA et al., 2010; NAKASHIMA et al., 2010; DING et al., 2011; ISHDORJ et al., 2010; 2011);
- ✓ de pulmão (JAYAPRAKASAM et al., 2003; HSU et al., 2011; LANG et et al., 2011, 2012; KAUSAR et al., 2013);
- ✓ de próstata (DUNCAN et al., 1996; REN et al., 2012);
- ✓ de ovário (SHAN et al., 2010; ISHII et al., 2013);
- ✓ de cólon (YASUDA et al., 2010; ABDELWAHAB et al., 2012),
- ✓ de bexiga (HUANG et al., 2012);
- ✓ de melanomas (ZHANG et al., 2011; AHMED; HALAWEISH, 2013);
- ✓ de laringe (LIU et al., 2008a,b; 2010);
- ✓ e de pele (VAN KESTER et al., 2008; CHEN et al., 2010).

Além disso, outras cucurbitacinas, tais como F, O, P, Q e R, além de misturas molares destes compostos (TANNIN-SPITZ et al., 2007) também inibiram significativamente a proliferação de células tumorais *in vitro* (CHEN et al., 2005; ESCANDELL ET AL., 2008).

A abrangência no conhecimento sobre cucurbitacinas, decorrente da implementação do protocolo de triagem pelo NCI, foi muito mais além do espectro de tipos celulares incluídos nos estudos. Na verdade, os achados forneceram informações de extrema importância para um entendimento mais aprofundado da atividade antitumoral de cucurbitacinas. O potencial antiproliferativo de diferentes cucurbitacinas pôde ser demonstrado através de diversas características. Primeiramente, ao serem comparadas a produtos naturais comumente reportados por suas propriedades citotóxicas (tais como berberina, resveratrol e curcumina), as cucurbitacinas demonstraram potente ação citotóxica com valores de CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células) inferiores a $1\mu\text{M}$, em muitas linhagens testadas, sendo que em alguns casos, os valores obtidos são na ordem de nanomolar (nM). Isto

pôde ser verificado, a título de exemplo, em células de leucemia linfocítica aguda (RCH), onde a cucurbitacina B demonstrou um valor de CI_{50} de 7 nM (HARITUNIANS et al., 2008). Além disso, o efeito de cucurbitacinas em algumas células foi comparável ao de quimioterápicos comumente empregados na clínica, não havendo, por exemplo, diferença entre os valores de CI_{50} da cucurbitacina B e da doxorubicina, em células de adenocarcinoma de cólon (células Caco-2) (KONGTUN et al., 2009).

Em geral, as cucurbitacinas são consideradas inibidores seletivos da via JAK/STAT; contudo, outros mecanismos podem estar envolvidos no processo de indução de morte celular, incluindo as vias do PI3K/AKT e RAF/MEK/ERK, as quais representam vias de sinalização de oncogenes comumente envolvidas na sobrevivência e na proliferação de células tumorais. Além disso, a clivagem de PARP, a expressão da caspase 3 em sua forma ativa, bem como a redução na expressão dos genes codificados pelos sinais transdutores e ativadores de transcrição, também representam mecanismos comuns de ação desta classe de compostos, objetivando a indução do processo apoptótico (LEE et al., 2010; RÍOS et al., 2012; ALGHASHAM, 2013).

A via JAK/STAT induz a sinalização das Janus-quinases (JAKs) e dos sinais transdutores e ativadores de transcrição (STAT) e regula citocinas e fatores de crescimento. Sob condições fisiológicas, a duração da atividade da proteína STAT3 é temporária e estritamente controlada. Contudo, sua ativação persistente e desregulada tem sido frequentemente observada em uma ampla variedade de tumores, sendo que a ativação constitutiva de STAT3 desempenha um papel importante na proliferação de células tumorais, diferenciação e regulação de genes, incluindo aqueles que codificam a expressão de proteínas anti-apoptóticas, tais como Mcl-1 e BCL-x_L e os reguladores do ciclo celular ciclina D1 e c-Myc. Desta maneira, considerando que a maioria das estratégias quimioterápicas objetiva a indução do processo apoptótico, novas moléculas capazes de interromper a atividade transcricional do STAT3, oferecem uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos fármacos quimioterápicos (BROMBERG, 2002; YU et al., 2004; 2007).

Após os primeiros relatos de que a cucurbitacina I, também conhecida como JSI-124, era um potente inibidor de ambas as vias, JAK2 e STAT3 (BLASKOVICH et al., 2003), muitos estudos confirmaram que a cucurbitacina I exerce seu efeito inibidor da via

JAK-STAT, através do bloqueio da fosforilação da tirosina do STAT3 e da JAK2, em várias linhagens tumorais (BLASKOVICH et al., 2003; SUN et al., 2005; SHI et al., 2006; SU et al., 2008; VAN KESTER et al., 2008; LUI et al., 2009; ISHDORJ et al., 2010). Neste mesmo sentido, alguns estudos vêm demonstrando que, ao inibir a fosforilação e conseqüentemente a ativação de STAT3, a cucurbitacina I foi capaz de aumentar a quimio- e/ou radiosensibilidade de cânceres altamente tumorigênicos contendo populações de células-tronco tumorais (CSC – *Cancer Stem Cells*, CD 133⁺), como ocorre em meduloblastomas (CHANG et al., 2012), tumores pulmonares de células não pequenas (HSU et al., 2011) e carcinomas anaplásicos de tireóide (TSENG et al., 2012).

Além disso, outros pesquisadores demonstraram que a cucurbitacina B inibiu a fosforilação da tirosina de STAT3, STAT5 e JAK2, em células tumorais pancreáticas e em modelos xenográficos *in vivo* (THOENNISSSEN et al., 2009). Outro estudo, que comparou a capacidade inibitória de diferentes cucurbitacinas sobre a via JAK/STAT3, demonstrou que ao substituir a carbonila no carbono 3 por uma hidroxila, como ocorre na cucurbitacina Q, houve perda da capacidade de inibição de JAK2, mas manteve o efeito inibitório sobre STAT3. Contudo, na cucurbitacina A, que difere da cucurbitacina B por seu grupo hidroxila no carbono 19, ocorreu a perda da capacidade de inibir o STAT3, porém manteve o seu efeito inibitório sobre JAK2 (SUN et al., 2005), demonstrando que a inibição de STAT3 e JAK2 pode ocorrer por diferentes mecanismos moleculares, dependendo das características estruturais das cucurbitacinas.

As cucurbitacinas induzem alterações, tanto morfológicas quanto bioquímicas em células tumorais (LEE et al., 2010). Mudanças drásticas no formato das células, tais como arredondamento, inchaço e inclusões submembranas, com conseqüente formação de prolongamentos, conhecidos como *blebs*, são observadas após poucas horas de exposição a tais compostos (MUSZA et al., 1994; DUNCAN et al., 1996; GRANESS et al., 2006; ESCANDELL et al., 2008; HARITUNIANS et al., 2008; MOMMA et al., 2008; YIN et al., 2008; WAKIMOTO et al., 2008; KNECHT et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2012a). Algumas destas alterações podem ser explicadas pela desregulação da homeostasia do citoesqueleto, induzindo a agregação dos filamentos de actina, ou ainda tendo como alvo algumas moléculas de sinalização envolvidas na dinâmica de montagem do citoesqueleto.

A título de exemplo, pode-se citar o trabalho de Kausar e colaboradores (2013), que demonstraram que as alterações morfológicas em células de tumor de pulmão, após exposição à cucurbitacina B, foram, em parte, decorrentes da ativação precoce da via de sinalização p38 MAPK, a qual ativa por fosforilação uma chaperona (HSP27), importante moduladora de polimerização dos filamentos de actina.

A formação de células multinucleadas é outra alteração morfológica comumente relatada em culturas de células tumorais humanas expostas às cucurbitacinas. De acordo com Ducan e colaboradores (1996), este processo está diretamente relacionado à capacidade destes compostos de bloquearem a citocinese, já que induzem a desagregação do citoesqueleto, mas não a cariocinese, fenômeno dependente da ação dos microtúbulos, que não são afetados pela ação das cucurbitacinas. Além disso, o processo de formação de células multinucleadas pode resultar da interrupção do ciclo celular. Muitos trabalhos mostraram que as cucurbitacinas induzem parada de ciclo celular, sobretudo na fase G2/M (SHI et al., 2006; TANNIN-SPITZ et al., 2007; YIN et al., 2008; THOENNISSSEN et al., 2009; CHAN et al., 2010a,b; DUANGMANO et al., 2010; LI et al., 2010; SHAN et al., 2010; YASUDA et al., 2010; BOYKIN et al., 2011), e também na fase S, em linhagens leucêmicas HL-60 e U937 (HARITUNIANS et al., 2008). A parada do ciclo celular na fase G2/M ocorre logo após a exposição às cucurbitacinas e resulta em morte por apoptose das células tumorais (LEE et al., 2010). Tannin-Spitz e colaboradores (2007) também observaram a interrupção do ciclo celular na fase G2/M e indução de morte celular por apoptose em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) expostas aos glicosídeos das cucurbitacinas B e E.

Em muitos tipos de cânceres, ocorre uma inflamação crônica e as cucurbitacinas parecem afetar tanto as células tumorais quanto os macrófagos, através de diferentes mecanismos. Considerando o importante papel do STAT3 no processo inflamatório (LIN et al., 2007), sabe-se que parte da atividade antitumoral das cucurbitacinas está, portanto, relacionada à sua atividade anti-inflamatória. Como mencionado anteriormente, em células tumorais, as cucurbitacinas atuam como inibidores da fosforilação do STAT3, tornando-as mais susceptíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio, durante o processo inflamatório (ESCANDELL et al., 2007a). Já nos macrófagos normais, as cucurbitacinas atuam como inibidores da via IKK-NFκB,

resultando na inibição de enzimas-chave do processo inflamatório, como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que ao serem superexpressas, contribuem efetivamente para a tumorigênese (JAYAPRAKASAM et al., 2003; PARK et al., 2004). Em contrapartida, estudos com algumas linhagens de células tumorais, mostraram que as cucurbitacinas foram capazes de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelularmente, e o pré-tratamento com antioxidantes suprimiu os efeitos citotóxicos de cucurbitacinas (YASUDA et al., 2010; KAUSAR et al., 2013).

Ainda considerando o efeito das cucurbitacinas na tumorigênese, alguns estudos têm apontado para a ação antiangiogênica destes compostos. A estratégia terapêutica do bloqueio de suprimento sanguíneo para células tumorais, suprimindo a angiogênese, é uma abordagem bastante interessante na P&D de novos fármacos para o tratamento de tumores. O STAT3 regula também a angiogênese de tumores, através da ativação transcricional do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (CHEN; HAN, 2008). Um estudo mostrou que a cucurbitacina E foi capaz de bloquear a ativação da via JAK/STAT3, através dos receptores VEGF-tipo 2, inibindo, consequentemente, a angiogênese em células endoteliais (DONG et al., 2010).

Além das atividades citotóxica e antitumoral, outros trabalhos mostraram, ainda, outras ações farmacológicas para as cucurbitacinas, tais como antifertilidade (ALMEIDA et al., 1992), hepatoprotetora (AGIL et al., 1999; CAO et al., 2005; YANG et al., 2005), antiplasmódica (GRAZIOSE et al., 2013) e anti-inflamatória (YESILADA et al., 1997; PETERS et al., 1997; 1999; 2003; UKIYA et al., 2002; RECIO et al., 2004; ESCANDELL et al., 2007a,b; SIQUEIRA et al., 2007; RÍOS et al., 2010; ABDELWAHAB et al., 2011; QIAO et al., 2013).

Apesar de sua promissora atividade citotóxica e antitumoral, o tratamento de cânceres por cucurbitacinas ainda não é uma realidade, em razão de sua elevada toxicidade, tendo sido encontrado na literatura consultada apenas um relato de avaliação clínica desta classe de compostos (LU et al., 2012). Neste estudo, pacientes portadores de câncer de pulmão avançado receberam 120 µg da cucurbitacina B oralmente, três vezes ao dia, durante sete dias, com o intuito de promover a diferenciação de células dendríticas imaturas melhorando, desta forma, a imunidade antitumoral. O tratamento com a

cucurbitacina B aumentou a frequência das células dendríticas maduras, através da inibição da via JAK2/STAT3, podendo ser considerado uma ferramenta complementar extremamente útil na imunoterapia do câncer, já que este composto foi capaz de aumentar a sensibilidade de células tumorais aos linfócitos T citotóxicos, aumentando clinicamente a imunidade antitumoral.

Considerando a elevada toxicidade das cucurbitacinas, uma alternativa interessante para este problema poderia ser o uso concomitante de cucurbitacinas com quimioterápicos comumente usados na oncologia. Na clínica, muitos quimioterápicos são usados em combinação, não só para aumentar a eficácia do tratamento, mas também para reduzir o surgimento de células tumorais multirresistentes. Algumas combinações de fármacos mostraram forte sinergismo, permitindo alcançar o mesmo efeito terapêutico com menor dose, e conseqüentemente, uma menor toxicidade sistêmica (CHEONG et al., 2005).

Com base nesta idéia, foi demonstrado que algumas cucurbitacinas atuam de forma sinérgica com quimioterápicos usados para o tratamento de alguns tumores humanos. Sadzuka e colaboradores (2008; 2010), por exemplo, demonstraram que a cucurbitacina E promoveu o acúmulo intracelular da doxorubicina, em células de sarcoma de ovário, por facilitar o influxo e prevenir o efluxo do quimioterápico das células tumorais, possibilitando a redução da dose necessária para o efeito terapêutico no tratamento de sarcomas de ovário. Em outro estudo, foi demonstrado o efeito sinérgico de derivados de cucurbitacinas, obtidos a partir de *Momordica balsamica*, com doxorubicina, em células de linfoma resistentes (RAMALHETE et al., 2009). Liu e colaboradores (2008b; 2010), demonstraram o efeito sinérgico *in vitro* e *in vivo* do docetaxel e cisplatina com a cucurbitacina B, em células de tumor de laringe (Hep-2). Neste mesmo sentido, Thoennissen e colaboradores (2009) demonstraram o efeito sinérgico *in vitro* da cucurbitacina B com a gencitabina. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou o efeito antitumoral *in vivo* desta combinação, em modelos xenográficos de câncer pancreático humano (IWANSKI et al., 2010), quando baixas doses destes compostos provocaram uma redução significativa dos tumores, com toxicidade sistêmica mínima. Um estudo mais recente demonstrou que um inibidor da enzima histona desacetilase, o ácido valpróico, sensibilizou células de melanoma murino para o tratamento com baixas concentrações da cucurbitacina B

(OUYANG et al., 2011). Esta mesma cucurbitacina apresentou potencial sinérgico com o metotrexato no tratamento de osteosarcoma humano (LEE et al., 2011).

Diante do exposto, e tendo em vista as comprovadas ações citotóxica, antitumoral e anti-inflamatória das cucurbitacinas, optou-se por realizar a triagem citotóxica de uma série de cucurbitacinas naturais e de derivados semissintéticos (DeCUCs), frente a diferentes linhagens de células tumorais, bem como avaliar a ação antitumoral (câncer de pulmão) de um derivado (DeCUCB83), além de propor o mecanismo de morte celular envolvido para os compostos mais ativos.

2.2 Câncer

A palavra câncer refere-se ao termo neoplasia, isto é, tumores malignos, caracterizados não somente pelo crescimento descontrolado de células transformadas, mas também pela capacidade de se diferenciarem e invadirem tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes, sendo esta capacidade invasiva denominada de metástase (DE ALMEIDA et al., 2005). Os tumores são classificados como benignos e malignos: os benignos são bem localizados, de crescimento lento e não são capazes de se distribuírem para outras partes do organismo, já os malignos crescem rapidamente, desenvolvem fatores de adesão e de migração, que lhes conferem um fenótipo invasivo (YAMAGUCHI et al., 2005), que é a principal característica de malignidade.

O padrão de divisão celular em organismos multicelulares é rigorosamente controlado por uma rede complexa de vias de sinalização, que asseguram que as células somente entrem em processo de proliferação quando for requerido pelo organismo, em situações como o desenvolvimento fisiológico ou os processos de cicatrização (DOWNWARD, 2003).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo de vários estágios, que pode ser desencadeado por múltiplos fatores genéticos e ambientais (PRASASYA et al., 2011). As células tumorais podem originar-se de uma mutação direta, com conseqüente ativação de oncogenes, ou pela inativação de genes supressores de tumores, o que resulta em proliferação descontrolada e deflagração do câncer (BENSON; LIAU, 2008; TAYLOR; LADANYI, 2011).

A hereditariedade é um fator importante para o desenvolvimento do câncer, mas a maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada a fatores externos ao organismo, tais como substâncias químicas presentes na alimentação, tabagismo, radiação e, também, a organismos infecciosos (oncovírus). No entanto, certos fatores internos como mutações, hormônios e condições do sistema imune também podem estar inter-relacionados, atuando em conjunto ou na sequência de iniciação e promoção da carcinogênese (DE ALMEIDA et al., 2005; ASHKENAZI, 2008; BENSON; LIAU, 2008).

O câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo e foi responsável por cerca de 13% do total de mortes registradas em 2008, com estimativas crescentes para os anos consecutivos. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, sendo estas válidas também para o ano de 2013, apontaram para a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, sendo os de maior incidência, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e colo do útero, no sexo feminino. A incidência estimada para a região sul do Brasil, neste mesmo período, é de mais de 90.000 casos e no Estado de Santa Catarina pouco mais de 19.000 casos (BRASIL/INCA, 2011).

Existem três abordagens para o tratamento do câncer: excisão cirúrgica, que remove os tumores com alta eficácia, se não houver metástase; radioterapia; e quimioterapia, sendo que o papel de cada uma delas irá depender do tipo de tumor e do estágio de seu desenvolvimento. Há ainda a fototerapia dinâmica e a imunoterapia, consideradas técnicas adjuvantes, mas que têm evoluído graças à compreensão da biologia da transformação maligna, e das diferenças no controle da proliferação das células normais e tumorais (DE ALMEIDA et al., 2005; BORGHAEI et al., 2009). Geralmente, um terço dos pacientes consegue ser curado através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), mas quando a neoplasia desenvolve metástases, torna-se necessário uma forma de tratamento sistêmico, tal como a quimioterapia, que emprega medicamentos aplicados, em sua maioria, via intravenosa ou, também, por via oral (DE ALMEIDA et al., 2005; BRASIL/INCA, 2011).

Os quimioterápicos disponíveis para o tratamento de cânceres são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Muitos fármacos exercem sua ação sobre células em processo de divisão, sendo denominados fármacos ciclo-celular específicos (ex. antimetabólitos,

alcaloides, hormônios), enquanto que outros fármacos são capazes de induzir a morte de células que não estejam em estado de proliferação, chamados então de fármacos ciclo-celular não específicos (antibióticos, complexos de platina, agentes alquilantes diversos) (DE ALMEIDA et al., 2005).

O tratamento do câncer hoje não é apenas uma questão de eliminar células tumorais por indução de morte celular. Novas estratégias terapêuticas incluem também o microambiente do tumor, inibindo a angiogênese, modulando a resposta imune ou a inflamação crônica frequentemente associada ao câncer (LASZCZYK, 2009).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), as principais características do câncer (em inglês, *hallmarks*) compreendem dez capacidades biológicas, sendo elas, (1) autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, (2) insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, (3) evasão à morte celular programada (apoptose), (4) potencial ilimitado de replicação, (5) angiogênese sustentada, (6) invasão tecidual e metástase, (7) mutação e instabilidade genômica, (8) inflamação induzida pelos tumores, e duas características ainda emergentes, que são (9) desregulação energética celular e (10) evasão à destruição imunológica, sendo essas adquiridas durante os múltiplos passos do desenvolvimento tumoral. Neste sentido, compostos que interfiram diretamente em alguma destas características necessárias para o crescimento e a progressão do tumor, são potenciais candidatos a fármacos, sendo que alguns deles já estão em fase de estudos clínicos ou foram aprovados para uso no tratamento de algumas formas de câncer humano (Figura 2).

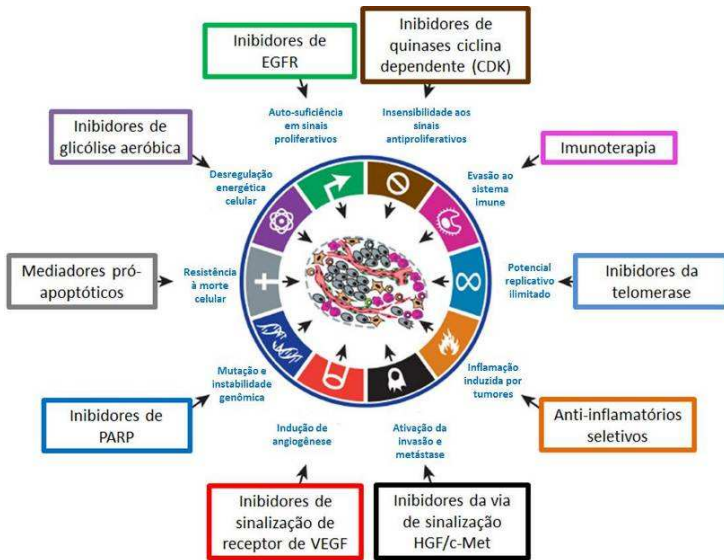


Figura 2: Tipos de tratamento, de acordo com as principais características biológicas do câncer.

Fonte: adaptado de Hanahan; Weinberg (2011).

Quando produtos naturais são empregados como estratégias quimioterápicas, alguns compostos inibirão diretamente as células tumorais, causando morte celular, retorno à homeostase ou simplesmente interrompendo a proliferação celular. Outros inibirão a progressão do câncer induzindo, indiretamente, alterações no ambiente local, as quais são desfavoráveis para a angiogênese, invasão ou metástase. Isto pode incluir, por exemplo, a inibição de enzimas produzidas pelas células tumorais, que permitem a invasão aos tecidos vizinhos. De uma maneira geral, os produtos naturais podem ser divididos em duas categorias: aqueles que atuam diretamente sobre as células tumorais inibindo a proliferação, e aqueles que inibem a progressão do câncer, por afetarem tecidos ou sítios localizados externamente às células-alvo. Há, ainda, uma terceira categoria que corresponde aos compostos que inibem o crescimento tumoral estimulando o sistema imune (BOIK, 2001; FULDA, 2010).

Neste panorama, os produtos naturais constituem a base de

muitos fármacos hoje disponíveis no mercado para o tratamento de várias doenças humanas. Por exemplo, para o tratamento das doenças infecciosas, de um total de 230 fármacos aprovados pelo FDA, entre os anos de 1950 e 2006, 137 foram obtidos de fontes naturais ou baseados nestes produtos (NEWMAN; CRAGG, 2007). Outros estudos realizados mais recentemente pelos mesmos pesquisadores reforçaram a importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos, principalmente fármacos anticâncer. De acordo com estes estudos, dos 172 fármacos antitumorais aprovados durante os anos de 1981 a 2010, 54% foram obtidos de fontes naturais ou desenvolvidos diretamente com base nestes compostos (NEWMAN; CRAGG, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013). A potencialidade dos produtos naturais como possíveis fontes de novos fármacos para o tratamento do câncer tem sido demonstrada, principalmente, pelo fornecimento de um número significativo de substâncias ativas que chegaram à fase de ensaios clínicos, sendo que alguns dos compostos testados são, atualmente, empregados na clínica, como é o caso dos alcaloides da vinca e seus derivados, da podofilotoxina, do etoposídeo, do teniposídeo, do topotecano, do irinotecano e do paclitaxel (SCHENKEL et al., 2007).

2.2.1 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é o mais comum no mundo, somando cerca de 1,2 milhões de novos casos anualmente, seguido pelo câncer de mama feminina, com aproximadamente um milhão de novos casos por ano. As maiores taxas de incidência de câncer de pulmão são encontradas nos países desenvolvidos (Estados Unidos, Itália, Austrália, Alemanha, Canadá e França), enquanto que nos em desenvolvimento, as taxas mais elevadas encontram-se nos países africanos e no leste asiático. No Brasil, foram estimados 17.210 novos casos de câncer de pulmão em homens e 10.110 em mulheres, para o ano de 2012. Esses valores correspondem a um risco estimado de 18 casos novos a cada 100 mil homens e 10 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele do tipo não melanoma, o câncer de pulmão corresponde ao segundo e ao terceiro mais frequente nas regiões sul do Brasil, em homens e mulheres, respectivamente (BRASIL/INCA, 2011). Tomando como exemplo a cidade de Florianópolis, no ano de 2007, o câncer de pulmão, depois das doenças do aparelho circulatório, foi a maior causa

de mortes entre idosos do sexo masculino no município (VIRTUOSO et al., 2010).

A maioria dos casos de câncer de pulmão está relacionada à exposição ao tabaco (cerca de 80%), seguido de outros carcinógenos, tais como, inseticidas, óxidos de nitrogênio, hidrocarbonetos policíclicos, além de um histórico familiar, sedentarismo e má alimentação. Sabe-se ainda que aproximadamente 70% dos casos de câncer apresentam-se localmente avançados ou com metástases no momento do diagnóstico (HAN; ROMAN, 2010), com uma razão mortalidade/incidência de, aproximadamente, 86% (BRASIL/INCA, 2011).

O câncer de pulmão é classificado em dois grandes grupos principais: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP, em português e SCLC, *small cell lung cancer*, em inglês) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP, em português e NSCLC, *non-small cell lung cancer*, em inglês), sendo que este último corresponde à aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão em humanos. Apenas 16% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados cedo o bastante para serem tratados apenas por incisão cirúrgica, sendo que, na maioria dos casos, é necessária a administração de quimioterapia, podendo ainda combiná-la a radioterapia. Os fármacos mais comumente utilizados na quimioterapia do CPCNP apresentam mecanismos de ação distintos e incluem os derivados da platina (cisplatina e carboplatina), paclitaxel, irinotecano, gemcitabina, vinorelbina e pemetrexed (HAN; ROMAN, 2010; KOH et al., 2012). Esta modalidade de tratamento tem resultado num aumento da sobrevida de pacientes, mas o câncer de pulmão no seu estágio avançado permanece uma doença incurável. Nos últimos anos, grandes esforços têm sido feitos na tentativa de caracterizar molecularmente o CPCNP, com o intuito de direcionar terapias às mutações comumente expressas nestes tumores (AYOOLA et al., 2012).

Independentemente do tipo de carcinógeno envolvido, o câncer de pulmão resulta de muitas anormalidades cromossômicas e citogenéticas, que levam ao processo de carcinogênese, sendo que o mecanismo molecular envolvido no desenvolvimento e progressão desta neoplasia é um processo complexo e multifacetado. Sabe-se que alterações genéticas e epigenéticas, após a exposição aos carcinógenos, levam a ativação de vias oncogênicas e inativação dos genes supressores de tumor e que, após seu aparecimento, o tumor é

sustentado por estímulos de crescimento resultantes da expressão diferencial de fatores de crescimento e peptídeos regulatórios provenientes do próprio tecido tumoral e de células adjacentes. A família de receptores do tipo tirosina quinase do fator de crescimento epidermal (EGFR) desempenha então, um papel importante em muitos tipos de cânceres, especialmente, no CPCNP, onde ocorrem em média 45 a 70% de superexpressão desses receptores (HAURA et al., 2004; AYOOLA et al., 2012).

Nesse contexto, a terapia direcionada aos EGFR está se tornando uma estratégia essencial no tratamento de CPCNP. Os dois fármacos anti-EGFR disponíveis para o tratamento oral de CPCNP no mercado farmacêutico são o gefitinibe e o erlotinibe, comercialmente chamados de Iressa® e Tarceva®, respectivamente. Estes fármacos bloqueiam competitivamente a ligação de ATP ao sítio ativo no domínio tirosina quinase do EGFR, inibindo sua auto-fosforilação e, conseqüentemente, as vias oncogênicas deflagradas por este receptor, tais como, PI3K/AKT, RAF/ERK e JAK/STAT3, as quais estão diretamente relacionadas à crescente resistência à morte celular das células tumorais (KOH et al., 2012; AYOOLA et al., 2012).

Portanto, a melhor compreensão das vias de sinalização oncogênicas e seus mecanismos moleculares podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas também aos intermediários destas vias envolvidas na proliferação e progressão dos tumores (HAN; ROMAN, 2010; CAO et al., 2011; KOH et al., 2012; CHO, 2013).

2.3 Morte celular e alvos terapêuticos

Em 2009, o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (*National Commite of Cell Death*, EUA) categorizou a morte celular através de seus aspectos morfológicos e enzimáticos, funcionais ou ainda aspectos imunológicos (KROEMER et al., 2009). Com o avanço das pesquisas e dos conhecimentos relacionados aos aspectos bioquímicos da morte celular, a classificação não se baseou mais exclusivamente nos parâmetros morfológicos das células, mas preferencialmente nos seus aspectos bioquímicos e moleculares. Por este motivo, este mesmo Comitê, em 2012, propôs uma nova categorização da morte celular, com o objetivo de estabelecer uma nomenclatura uniforme, mas ao mesmo tempo não rígida, facilitando a

entendimento entre os pesquisadores e acelerando o ritmo da aquisição de novos conhecimentos (GALLUZZI et al., 2012).

Alterações nos diferentes tipos de morte celular estão implicadas na carcinogênese, sendo que a resistência à apoptose é considerada a principal característica de uma célula tumoral (HANNAH; WEINBERG, 2011). Defeitos neste tipo de morte celular sustentam não apenas a tumorigênese, mas também a resistência ao tratamento quimioterápico convencional (OKADA; MAK, 2004; KREUZALER; WATSON, 2012). Vários são os fatores determinantes do tipo de morte celular induzida por um determinado agente. Estes fatores incluem o tipo celular, o genótipo da célula, o microambiente em que ela se encontra, o tipo de dano induzido pelo agente, bem como a dose de quimioterápico utilizada (TAN; WHITE, 2008). No decorrer da última década, através de extensivos estudos sobre apoptose, foram identificados diversos eventos de evasão à apoptose, o que acarretou na descoberta de outras vias de morte celular, independentes da apoptose (KREUZALER; WATSON, 2012). Neste sentido, abordagens genéticas, moleculares e bioquímicas são focadas como possíveis alvos terapêuticos de novos fármacos antitumorais. A maior parte das pesquisas aborda a indução da morte celular por apoptose como a ideal, por evitar o processo inflamatório, mas estudos apontam que as células tumorais podem ser induzidas à morte por vias não apoptóticas, tais como necrose, autofagia e catástrofe mitótica, em especial, as células neoplásicas resistentes à apoptose (OKADA; MAK, 2004). O Quadro 1 resume as principais características das principais vias de morte celular e suas formas de detecção.

Quadro 1: Características das principais vias de morte celular e as formas de detecção.

| Via de morte | Características morfológicas | Características bioquímicas | Métodos de detecção |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Apoptose | Condensação de cromatina; fragmentação nuclear; prolongamentos membranários; formação de corpos apoptóticos; arredondamento celular; retração de pseudópodos | Dependente da ação de caspases; fragmentação nuclear; exposição da fosfatidilserina | Dupla coloração com Anexina V/Iodeto de Propídeo; atividade de caspases, citometria de fluxo |
| Autofagia | Formação de vesículas autofágicas; não há fragmentação nuclear ou condensação de cromatina | Independente da ação de caspases e do gene p53; elevada atividade lisossomal; dissociação de Beclina-1 de BcL-2/X _L ; Dependência de produtos do genes Atg; conversão de LC3-I a LC3-II | Coloração com MDC (Monodansilcadaverina); ensaios de degradação protéica; estudos de imunoprecipitação; estudos genéticos, microscopia de imunofluorescência |

Quadro 1: Características das principais vias de morte celular e as formas de detecção. (continuação)

| Via de morte | Características morfológicas | Características bioquímicas | Métodos de detecção |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mitose catastrófica | Células gigantes; múltiplos micronúcleos; cromossomos não condensados | Independente da ação de caspases e do gene p53; ativação anormal do complexo CDK1/ciclina B1 | Marcadores mitóticos; microscopia para a detecção de micronúcleos e células multinucleadas |
| Necrose | Degradação do DNA; formato nuclear atípico com vacuolização; inchaço de organelas citoplasmática; rompimento de membrana celular | Ativação de calpaínas e catepsinas; ruptura da membrana plasmática | Ensaio baseado em substratos colorimétricos de lisados celulares; permeabilidade a corantes (azul de tripan e iodeto de propídeo); citometria de fluxo, determinação de enzimas citosólicas |
| Senescência | Tamanho celular aumentado; telômeros curtos | Superexpressão da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal); dependente da ação do gene p53 | Coloração para SA- β -gal |

Fonte: adaptado de Okada; Mak (2004); Kroemer et al. (2009).

Em organismos vivos, há um equilíbrio entre a sobrevivência e a morte celular. Este balanço é controlado por sinais do meio extracelular, onde um ambiente favorável promove a sobrevivência, e um ambiente inadequado resultará em morte celular. Isto assegura que células saudáveis sobrevivam em ambientes adequados e que células mutadas ou não funcionais sejam eliminadas por morte celular programada (HENSON; GIBSON, 2006). Além disso, para o seu desenvolvimento e manutenção, os organismos multicelulares dependem de interações entre as células que os constituem. No desenvolvimento embrionário, muitas células são levadas à morte, contribuindo assim para a formação dos órgãos e tecidos (TAN; WHITE, 2008; KREUZALER; WATSON, 2012).

A apoptose é um fenômeno de morte celular programada, altamente regulada, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto de morte, há mais de 30 anos por Kerr e colaboradores (1972), que ocorre de forma geneticamente controlada. O termo apoptose deriva do grego, fazendo alusão à queda das folhas das árvores no outono, já que este é um exemplo de morte programada fisiológica e adequada, que também implica em renovação (INDRAN et al., 2011).

A apoptose é considerada um componente vital de vários processos fisiológicos, incluindo a renovação de células normais, desenvolvimento adequado do organismo, funcionamento do sistema imunológico e desenvolvimento embrionário. O processo apoptótico quando ocorre em excesso ou de forma insuficiente é uma importante causa de doenças neurodegenerativas, de danos isquêmicos, de distúrbios autoimunes e de muitos tipos de cânceres. A habilidade de modular a vida e a morte de uma célula faz deste evento um valioso e potencial alvo na terapia antitumoral (ELMORE, 2007).

A partir do momento em que uma célula recebe o estímulo para que se inicie a apoptose, começam a ocorrer diversas alterações em sua morfologia, tais como o seu arredondamento, retração dos pseudópodos, redução do volume, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, pouca ou nenhuma modificação em suas organelas, e divisão em corpos apoptóticos. Esses últimos são rapidamente fagocitados e removidos pelos macrófagos, sendo que esta sinalização ocorre devido à translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana plasmática, “marcando” as células que deverão ser fagocitadas. Este evento evita a geração de processos inflamatórios aos tecidos vizinhos, diferente do que ocorre durante a necrose. Todas estas

alterações morfológicas são consideradas o **padrão ouro** para o reconhecimento deste tipo de morte celular (HENGARTNER, 2000; HAIL et al., 2006; INDRAN et al., 2011).

A maioria das alterações morfológicas durante o processo apoptótico é causada por uma série de cisteíno-proteases, chamadas caspases, que são ativadas especificamente em células em processo de apoptose. Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. A especificidade pelos seus respectivos substratos é determinada por quatro resíduos amino-terminais no sítio de clivagem. A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações celulares que caracterizam a apoptose, como desestruturação da membrana nuclear e do arcabouço de lâminas, hipercondensação de cromatina, e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. Estas alterações são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Isso significa que a ação destas caspases representa uma via final comum, que opera em todas as células programadas para morrer (BUDIARDJO et al., 1999; HENGARTNER, 2000; HAIL et al., 2006). As características morfológicas da apoptose e uma breve comparação a outro tipo de morte celular, a necrose, podem ser visualizadas na Figura 3.

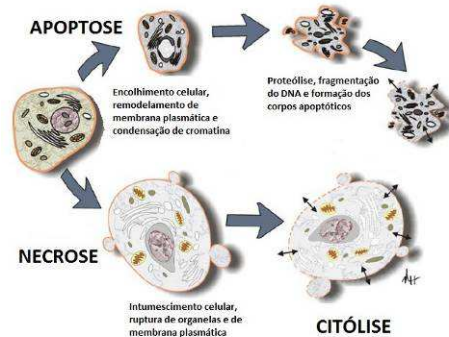


Figura 3: Características morfológicas da apoptose e da necrose.

Fonte: adaptado de Hail et al. (2006).

Este mecanismo de morte celular programada pode ser desencadeado por diversas maneiras, seja por um sinal externo através da via extrínseca ou citoplasmática, seja por um sinal interno através da via intrínseca ou mitocondrial (HENGARTNER, 2000).

A via extrínseca (Figura 4) é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de morte, sendo os mais estudados os receptores Fas (CD95 ou APO-1) e TNF α . Ao serem ativados, os receptores recrutam proteínas adaptadoras, como por exemplo, a proteína adaptadora associada a CD95, que apresenta um domínio de morte (FADD). Essas proteínas recrutam a pró-caspase-8 formando um complexo sinalizador iniciador da apoptose (DISC: complexo sinalizador indutor da morte). Como resultado, ocorre a ativação da cascata das caspases, onde a caspase-8 iniciadora do processo causa a ativação da caspase-3 efetora, desencadeando a morte celular (HENGARTNER, 2000; INDRAN et al., 2011). Ainda, em algumas células, a caspase 8 induz a clivagem proteolítica da BID (*BH3-interacting domain death agonist*), levando a geração de um fragmento chamado BID truncado (tBID), o qual leva ao aumento da permeabilidade mitocondrial, com conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas, conectando desta maneira, as duas vias de ativação do processo apoptótico. Alternativamente, a via extrínseca pode ser desencadeada pelos então chamados, “receptores de dependência”, tais como, o UNC5A-D e o DCC, os quais apenas exercem funções letais quando a concentração de seus ligantes específicos atingem níveis abaixo do considerado crítico. As rotas moleculares pelas quais os receptores de dependência estão conectados à rápida ativação das caspases executoras, em especial a caspase 3, foram descritas recentemente. Na ausência de seus ligantes específicos, o receptor DCC parece interagir com a proteína adaptadora citoplasmática DRAL para a montagem da plataforma ativadora de caspase 9 (MILLE et al., 2009). Outro receptor de dependência, UNC5B, na ausência de seu ligante neutrina-1, recruta o complexo de sinalização, o qual inclui a proteína fosfatase-2A (PP2A) e a proteína quinase associada à morte-1 (DAPK1) (GUENEBEAUD et al., 2010). Esta interação leva à desfosforilação de DAPK1, a qual pode mediar a ativação direta das caspases executoras ou favorecer a permeabilidade da membrana mitocondrial externa.

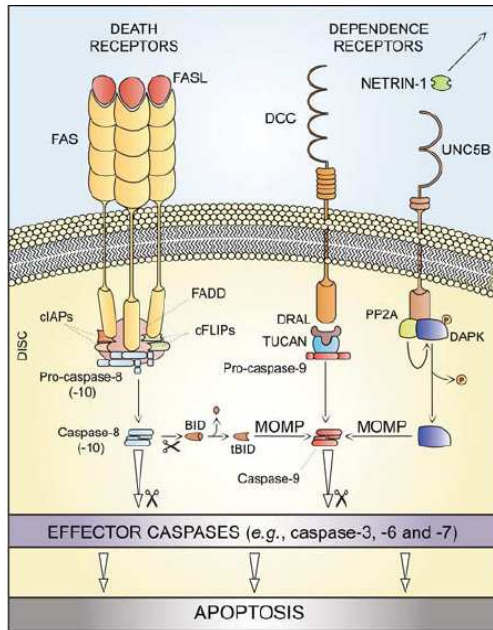


Figura 4: Apoptose extrínseca.
Fonte: Galluzzi et al.(2012).

Na via intrínseca (Figura 5), uma família de proteínas antiapoptóticas, a BcL-2, atua na inibição da apoptose, enquanto outras duas famílias, BAX e BH3, são pró-apoptóticas por sua capacidade de induzir poros na membrana mitocondrial externa, levando a um aumento de sua permeabilidade. Esta via é ativada por uma série de fatores independentes da ligação a receptores, tais como privação de nutrientes, danos ao DNA (via gene p53), ativação de oncogenes, radiação ultravioleta, e níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os sinais de estresse são enviados às mitocôndrias, que integram os estímulos de morte celular, induzindo seu desacoplamento, com consequente liberação para o citoplasma de proteínas pró-apoptóticas normalmente confinadas ao espaço intermembranário mitocondrial, com consequente interrupção da função bioenergética desta organela. As proteínas liberadas são classificadas em duas categorias. No primeiro grupo, encontram-se as proteínas que ativam a

via dependente de caspases, tais como citocromo *c*, DIABLO/Smac (*direct IAP-binding protein with low pI/second mitochondria-derived activator of caspases*) e HTRA2 (*high temperature requirement protein A2*). O citocromo *c* liberado liga-se à APAF-1 (fator-1 ativador de protease apoptótica), e esse complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9, que ativar, por sua vez, a caspase-3. Já a DIABLO/Smac e HTRA2 ligam-se às IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), desativando-as, prevenindo então o bloqueio do processo apoptótico. A protease HTRA2 também exerce seu efeito apoptótico independentemente da ação de caspases através da clivagem direta do citoesqueleto e outros substratos celulares. A segunda categoria inclui outras proteínas pró-apoptóticas, tais como AIF (fator indutor de apoptose) e endo G (endonuclease G), que após serem liberadas são translocadas ao núcleo, onde irão promover a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA, independentemente da ativação das caspases, culminando em morte celular apoptótica (BRÖKER et al., 2005, GALLUZZI et al., 2012).

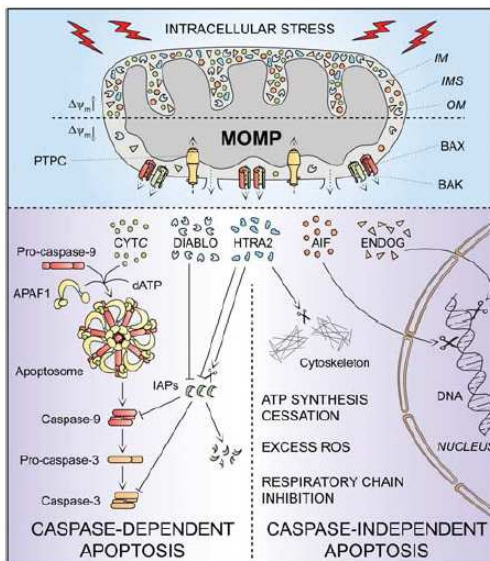


Figura 5: Apoptose intrínseca dependente e independente da ativação de caspases. Fonte: Galluzzi et al. (2012).

Importante destacar que, durante muitos anos, a apoptose foi considerada a única forma de morte celular programada, enquanto que a necrose era considerada um processo de destruição desregulada, resultado de uma catástrofe bioenergética, incompatível com a sobrevivência celular. Este tipo de morte é caracterizado pela presença de vacúolos no citoplasma, pela perda da integridade das membranas plasmáticas e das organelas, pelo aumento do volume celular e por indução de inflamação nos tecidos vizinhos, em decorrência da liberação do conteúdo celular e de moléculas inflamatórias, que culmina em injúria às células vizinhas (Figura 3) (OKADA; MAK, 2004).

No entanto, dados recentes da literatura indicam fortemente que a necrose, a qual tem sido vista tradicionalmente como uma forma de morte celular passiva, pode também ocorrer de maneira regulada, através de um mecanismo chamado “necroptose” ou necrose regulada. Este mecanismo é caracterizado por intumescimento celular e das organelas, formação extensiva de vacúolos intracelulares e ruptura rápida da membrana plasmática, com ausência de marcadores clássicos de apoptose, tais como, condensação de cromatina e fragmentação nucleossomal de DNA. É interessante observar que a necroptose pode ser ativada pelos mesmos ligantes que ativam a apoptose (TNF- α e Fas), com o envolvimento das quinases ativas das proteínas de interação com receptores (RIPK1 e RIPK3). Contudo, neste tipo de morte, não há ativação ou execução de morte pelas caspases, como ocorre durante o processo apoptótico. A necroptose está envolvida na patogênese de inúmeras doenças, tais como injúria isquêmica, neurodegeneração e algumas infecções virais, sendo que seus inibidores são alvos atrativos para o desenvolvimento de novos citoprotetores (CHRISTOFFERSON; YUAN, 2010; VANDENABEELE et al., 2010).

O organismo humano se depara com eventos mutacionais diários, que se não forem checados, podem levar ao desenvolvimento de câncer. Em resposta a várias formas de estresse, que podem resultar em danos ao DNA, a resposta celular primária é tentar reparar este dano, que, dependendo da sua severidade, pode ativar determinadas vias para eliminar as células danificadas, por indução do processo apoptótico. O fator central deste processo de controle é o gene supressor de tumor p53, conhecido também como “guardião” do genoma humano. Existem fortes evidências da participação desta proteína na supressão da tumorigênese, já que a maioria das neoplasias apresenta mutações no

gene p53, que codifica a proteína p53, ou defeitos na sua regulação (RYAN, 2011).

A família Bcl-2 possui cerca de vinte proteínas já identificadas, cada uma delas com duas ou mais isoformas. Elas exercem papel fundamental nos mecanismos de sobrevivência e morte celular, onde algumas atuam como proteínas antiapoptóticas e protegem as células da morte (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1), enquanto outras atuam como pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid). A expressão das proteínas pró-apoptóticas influencia a liberação de várias moléculas, que atuam efetivamente na indução de apoptose intrínseca, tais como citocromo *c*, fator de indução de apoptose (AIF), EndoG e proteínas Smac/DIABLO (LESSENE et al., 2008; WANG; YOULE, 2009). Segundo Okada e Mak (2004), a superexpressão de proteínas antiapoptóticas, tais como Bcl-2, Bcl-xL, fator nuclear κ B (NF- κ B), pode estar relacionada à resistência à apoptose, detectada em muitas células tumorais malignas.

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquirem a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal da célula transformada depende do descontrole da sua capacidade proliferativa e da crescente capacidade de evadir ao processo apoptótico. Portanto, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004).

Neste âmbito, a apoptose, na prática clínica, representa um potencial alvo terapêutico na indução de morte celular ou para a compreensão dos mecanismos de resistência à radioterapia e à quimioterapia. A elucidação de alguns dos mecanismos moleculares da apoptose abrem perspectivas de modulação direta deste processo, inclusive por produtos de origem natural. A terapia quimioterápica bem sucedida pode resultar na diferenciação de células reestabelecendo suas funções normais, bloqueando as células em alguma fase do ciclo celular, ou induzindo a morte celular, preferencialmente por apoptose, sendo que a indução deste processo é o objetivo principal de qualquer terapia. Este processo de morte é considerado ideal em termos de tratamento, pois é aplicável a todos os tipos de células cancerígenas, além de ser a forma natural do corpo de eliminar células mutadas geneticamente, sendo ainda possível de ser induzida por diversos mecanismos (BOIK, 2001).

A autofagia, também denominada macroautofagia, é uma via

de degradação, na qual componentes intracelulares são capturados em autofagossomos e liberados aos lisossomos onde eles são degradados e reciclados. Apesar de a autofagia ser fisiologicamente um mecanismo homeostático de reciclagem intracelular e de regulação metabólica, essencial à atividade normal das células, e de sobrevivência em condições de nutrição escassa, ela também responde a estímulos de estresse, nos quais ela é necessária para que as proteínas e organelas danificadas sejam removidas (TAN; WHITE, 2008; WHITE, 2012). Recentemente, a autofagia tem sido um alvo molecular abordado no câncer e, por ser um processo celular fundamental, é importante conhecer sua influência na tumorigênese e na resposta ao tratamento com determinados agentes (WHITE; DIPOLA, 2009). Sabe-se que, tanto a inibição quanto a ativação da autofagia podem ser benéficas, dependendo do tipo de tecido e estágio do tumor, além de outras características ainda não bem estabelecidas. A autofagia pode, portanto, ser promotora de tumor, por exercer função de reciclagem celular, fornecendo substratos para o metabolismo e a manutenção mitocondrial, como também ser supressora tumoral, através da eliminação de substratos de proteínas oncogênicas, organelas danificadas e proteínas tóxicas. Por tais razões, é necessário que se defina o papel específico da autofagia em cada contexto para que se possa selecionar a intervenção terapêutica adequada (WHITE; DIPOLA, 2009; KREUZALER; WATSON, 2012; WHITE, 2012). No caso de promoção da sobrevivência por autofagia, inibidores de autofagia podem ser úteis; todavia, se este mecanismo for eficaz em provocar eliminação das células, a ativação da autofagia pode ser vantajosa terapeuticamente (TAN; WHITE, 2008; GIULIANI; DASS, 2013).

Neste âmbito, apenas três estudos relacionaram as cucurbitacinas a outro tipo de mecanismo de ação diferente da indução do processo apoptótico. Recentemente dois grupos de pesquisadores (ZHANG et al., 2012b; ZHU et al., 2012) demonstraram que a cucurbitacina B foi capaz de provocar autofagia em linhagens celulares tumorais. O terceiro estudo relacionou o efeito anti-inflamatório de uma nova cucurbitacina natural (Cuc IIa) à sua capacidade de induzir, tanto o processo apoptótico quanto autofágico, em macrófagos (HE et al, 2013).

Outro conjunto de terapias visa inibir vias de sinalização de sobrevivência que são reguladas por citocinas, hormônios e fatores de crescimento nos mais variados tumores, especialmente nos casos

avançados de CPCNP. Em células tumorais, componentes chaves destas vias são alterados por ativação de oncogenes ou, ainda, pela perda de função de genes supressores de tumor, resultando em proliferação celular desregulada, inibição do processo apoptótico e aumento da angiogênese. Estratégias terapêuticas direcionadas a múltiplos elementos de uma cascata de sinalização, por exemplo, bem como quinases intracelulares, podem ser candidatos ideais como alvos para o bloqueio da sinalização celular. Nesse sentido, as vias de sinalização PI3K/AKT, RAF/MEK/ERK e STAT aparecem como candidatos para o bloqueio de crescimento tumoral e indução de apoptose de células tumorais (HAURA et al., 2004; TAN; WHITE, 2008; PRASASYA et al., 2011).

É bem conhecido que uma família de receptores EGFR do tipo tirosina quinase, os quais se encontram superexpressos em 45 a 70% dos casos de CPCNP, transmitem sinais através de diversas vias de sinalização celular, que acarretam alterações na expressão de genes importantes para a regulação da proliferação celular, sobrevivência e oncogênese. As cascatas de sinalização localizadas abaixo destes receptores incluem RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT e a via dos STAT. As proteínas tirosina quinases do tipo não receptores presentes no citoplasma, tais como Src e JAK, também são importantes na regulação de proliferação e sobrevivência celulares. (HENSON; GIBSON, 2006; PRASASYA et al., 2011).

A família de receptores de EGFR consiste de quatro receptores tirosina quinase transmembranários, extremamente parecidos (ErbB1, ErbB2, ErbB3 e ErbB4), os quais ligam-se a uma série de ligantes extracelulares (NORMANNO et al., 2005). Estes ligantes são classificados em dois grandes grupos, aqueles que se ligam predominantemente aos ErbB1, e aqueles que ligam-se aos ErbB3 e/ou ErbB4. O fator de crescimento epidermal (EGF) liga-se exclusivamente aos ErbB1, enquanto que outros ligantes, tais como a neuregulina, ligam-se aos receptores ErbB3 e ErbB4. Nenhum ligante direto do ErbB2 foi descrito até o momento, reforçando a hipótese que este atue como co-receptor. Após a ligação de um ligante (EGF, por exemplo), os receptores formam homo- ou heterodímeros, ativando as vias de sinalização celular, diretamente abaixo destes receptores (HAURA et al., 2004; AYOOLA et al., 2012).

Na Figura 6 estão demonstradas as vias antiapoptóticas ativadas pelos receptores de tirosina quinase ErbB. Neste caso, a ligação do fator

de crescimento epidermal (EGF) aos seus receptores ErbB leva à ativação de uma rede de vias de sinalização, PI3K/AKT (em verde), RAF/MEK/ERK (em vermelho) e JAK/STAT (em amarelo). Estas vias promovem a ativação de proteínas antiapoptóticas (em branco) e a inativação de proteínas pró-apoptóticas (em preto). O homodímero ErbB2 ativa as mesmas vias de sinalização, mas não requer EGF para sua ativação, e os receptores acoplados a proteína G ativam os receptores ErbB através de Src (HENSON; GIBSON, 2006).

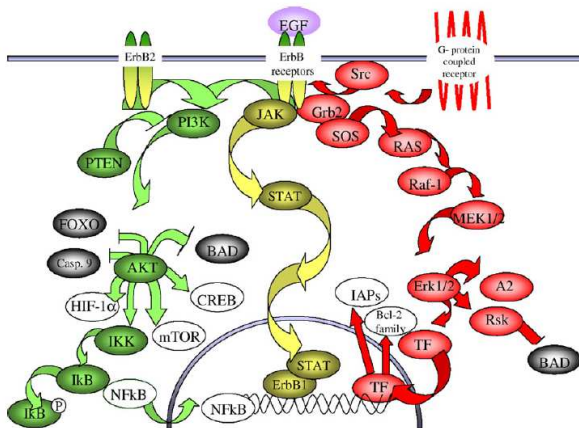


Figura 6: Vias de sinalização antiapoptóticas.

Fonte: Henson; Gibson (2006).

A seguir são descritas detalhadamente estas três vias de sinalização, com maior ênfase dada à via PI3K/AKT já que esta foi a principal via afetada pelo tratamento com algumas cucurbitacinas, conforme descrito no capítulo 3 desta tese.

2.3.1 A via de sinalização PI3K/AKT

Frequentemente, a resposta de sobrevivência celular a um fator de crescimento requer o envolvimento da via de sinalização PI3K/AKT. As fosfatidilinositol-3 quinases, PI3Ks, constituem uma família de quinases lipídicas caracterizadas por sua habilidade de fosforilar a hidroxila na posição três do anel inositol presente nos resíduos de fosfatidilinositol (FRUMAN et al., 1998). A classe 1 das PI3Ks são heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória/adaptadora (p85). Esta classe é ainda dividida em subclasse 1A, a qual é ativada pelos receptores de tirosina quinase, e subclasse 1B, a qual é ativada pelos receptores acoplados a proteína G. O substrato para a PI3K é o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), o qual gera o segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). A ligação do EGF aos seus receptores de tirosina quinase resulta na autofosforilação de seus resíduos de tirosina, levando ao recrutamento de PI3K para a membrana plasmática, através da ligação direta aos resíduos de fosfotirosina formados, ou através de seus domínios SH2 da subunidade adaptadora p85. Isto leva à ativação alostérica da subunidade catalítica (p110) e produção de PIP3. Este segundo mensageiro recruta, então, proteínas de sinalização contendo domínio homólogo ao da pleckstrina (PH) para a membrana, incluindo AKT, a qual será fosforilada pelas proteínas PDK1 e 2, tornando-se ativa. Uma vez ativada, AKT irá mediar a ativação e inibição de diversos alvos, resultando em sobrevivência celular, crescimento e proliferação através de diversos mecanismos (FRESNO VARA et al., 2004; HENSON; GIBSON, 2006) (Figura 7).

A via PI3K tem sinalização comumente alterada na ocorrência do câncer e a ativação pode se dar por mutações nos genes de seu regulador negativo PTEN, por mutações no próprio complexo PI3K, ou pela sinalização irregular do receptor de tirosina quinase. A quinase AKT, também conhecida como proteína quinase B (PKB), são as proteínas efetoras mais estudadas da via PI3K e regulam diversos processos celulares, tais como a proliferação e a sobrevivência celulares, tamanho celular e resposta à disponibilidade de nutrientes, invasão tecidual e angiogênese, e se encontram hiperativadas em tumores sólidos humanos, bem como nos cânceres hematológicos (BELLACOSA et al., 2005).

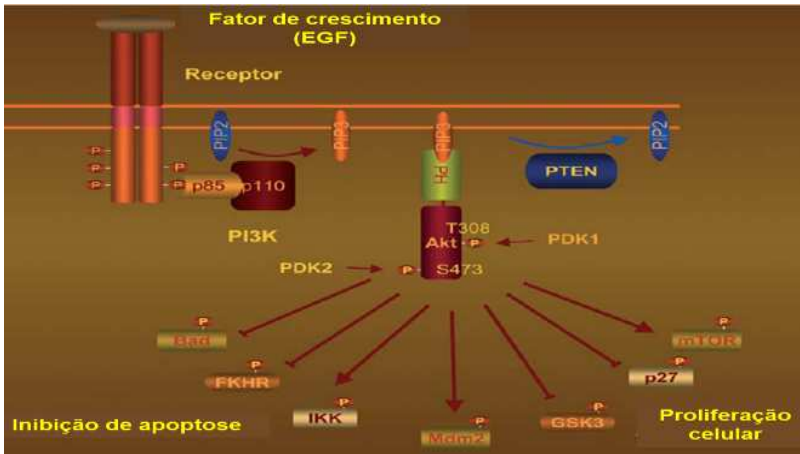


Figura 7: Via PI3K/AKT.

FONTE: adaptado de Fresno Vara (2004)

A fosforilação de múltiplos substratos resulta no efeito proliferativo de AKT. A fosforilação e consequente inibição da glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) previne a degradação da ciclina D1, um efeito acoplado à fosforilação da quinase AKT/mTOR, que resulta na translação aumentada das ciclinas D1 e D3 (LIANG; SLINGERLAND, 2003). Além disso, a AKT antagoniza diretamente a ação dos inibidores p21 e p27 do ciclo celular pela fosforilação de uma região próxima ao sinal de localização nuclear, induzindo a retenção citoplasmática destes inibidores (ALTOMARE; TESTA, 2005; BELLACOSA et al., 2005).

A proteína quinase AKT induz sinais de sobrevivência celular que previnem a morte celular programada por diversos mecanismos independentes entre si, que se refletem, tanto na inibição da cascata de caspases, quanto na transcrição de fatores reguladores do processo apoptótico. A AKT inativa diretamente o fator pró-apoptótico BAD, prevenindo a liberação do citocromo *c* das mitocôndrias. Em paralelo, a AKT inibe diretamente a cascata das caspases pela fosforilação e consequente inativação da pró-caspase-9 e pela fosforilação e estabilização do PED/PEA15, um inibidor citosólico da caspase-3, contribuindo desta maneira, para o desenvolvimento e progressão do câncer (TESTA; BELLACOSA, 2001; ALTOMARE; TESTA, 2005).

Além disso, a AKT fosforila a quinase reguladora do sinal apoptótico (ASK1) (ZHOU et al., 2001) e retém no citoplasma os fatores de transcrição da família Forkhead, prevenindo a transcrição de importantes genes pró-apoptóticos, tais como Fas ligante, Bim, Trail e Tradd. Outra ação indireta da AKT é a de antagonizar os pontos de checagem do ciclo celular mediados por p53, através da translocação e fosforilação de Mdm2 (um importante regulador negativo do gene supressor de tumor p53) (MAYO; DONNER, 2001). Além disso, a AKT ativa a quinase I κ B (IKK), um regulador positivo de NF- κ B, que resultará na transcrição de genes antiapoptóticos (POMMIER et al., 2004). Ela também participa do controle do crescimento celular, definido como o aumento no tamanho da célula, não no seu número. Neste caso, o crescimento celular é a resposta à elevada disponibilidade de nutrientes, mitógenos e energia, sendo modulado pela quinase mTOR, localizada logo abaixo da AKT nesta via de sinalização, a qual estimula a síntese protéica (BELLACOSA et al., 2005). A sinalização mediada pela AKT ainda coopera em outros processos celulares característicos do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011), como por exemplo, migração, invasão e metástase do tumor, através da promoção da secreção de metaloproteinases (THANT et al., 2000) e da fosforilação da telomerase humana, suportando a característica de replicação ilimitada das células tumorais (KANG et al., 1999).

2.3.2 As vias de sinalizações RAF/MEK/ERK e JAK/STAT

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) constituem uma superfamília de proteínas quinases do tipo serina/treonina, ativadas por diversos estímulos, incluindo EGF. Para serem ativadas, há necessidade de fosforilação por outras duas quinases localizadas acima na via, MAPKK e MAPKKK (JOHNSON et al., 2005). Entre os grupos caracterizados de MAPKs, destacam-se: quinase regulada extracelularmente (ERK), proteína quinases ativadas por estresse (SAPKs), também conhecida como quinase Jun N-terminal (JNK), e p38. As MAPKs podem se translocar ao núcleo e fosforilar fatores de transcrição tornando-os ativos e regulando a expressão gênica. O EGF ativa as ERKs, através da ligação da proteína adaptadora Grb2 e/ou SHC aos receptores ErbB, recrutando a proteína SOS (*son of sevenless*) para o receptor (WU et al., 1993; HENSON; GIBSON, 2006). A proteína SOS é um fator de troca de nucleotídeo guanina, que

após o recrutamento à membrana plasmática pelo receptor de superfície ativado, provoca uma troca de Ras-GDP por GTP na membrana plasmática, e a Ras-GTP interage com Raf-1 (uma MAPKKK), ligando-se ao domínio regulador N-terminal desta quinase, ativando-a. Esta por sua vez, irá fosforilar MEK1/2 (uma MAPKK), que culminará na ativação da ERK 1/2 (uma MAPK). Esta ativação resulta na fosforilação de uma variedade de substratos, incluindo a proteína quinase ribossomal S6 (Rsk), a fosfolipase citosólica A2 e os fatores de transcrição c-Myc, NF-IL6, Tal-1, Ets-2 e Elk. Esta elevada transcrição gênica aumenta os níveis dos membros antiapoptóticos da família Bcl-2 e proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). A ativação de Rsk também causa a fosforilação e inativação da BAD, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (LIN et al., 2002; HENSON; GIBSON, 2006; MCCUBREY et al., 2007; MCCUBREY et al., 2012).

A ativação dos receptores ErbB por fatores de crescimento também desencadeia a ativação da via de sinalização JAK/STAT. A Janus quinase (JAK) é uma família de proteínas tirosina quinase, que fosforilam STATs (sinais transdutores e ativadores de transcrição) localizados na membrana plasmática. Após fosforilação, os STATs são translocados ao núcleo onde ativam a transcrição gênica. A ativação por fatores de crescimento (EGF) de uma tirosina quinase intracelular (Src), também induz a fosforilação de STATs e, conseqüentemente, sua atividade transcricional. Sob ação do EGF, o receptor ErbB1 é translocado ao núcleo em algumas células tumorais, e lá liga-se ao DNA contribuindo para a ativação transcricional de genes. Entre os genes ativados por esta via destacam-se aqueles que codificam a expressão de proteínas anti-apoptóticas, tais como Mcl-1 e BCL-x_L, e os reguladores do ciclo celular ciclina D1 e c-Myc, desempenhando um papel importante na proliferação e sobrevivência de células tumorais (GARCIA et al., 2001; LIN et al. 2001).

Em razão destas vias de sinalizações se mostrarem alteradas nos mais diferentes tipos de câncer, elas são consideradas um alvo molecular promissor na prevenção e na terapia de cânceres, onde tais proteínas encontram-se superexpressas. Inibidores diretos de dois intermediários de uma mesma via, ou de duas vias de sinalização diferentes podem representar uma abordagem terapêutica bastante efetiva (MCCUBREY et al., 2012).

2.4 Modelos *in vivo* para avaliação de potenciais compostos antitumorais

O crescente conhecimento sobre os eventos moleculares do processo de oncogênese tem levado à identificação de novos alvos potenciais para a terapia quimioterápica e, conseqüentemente, abriu o caminho para a concepção de novos compostos-alvo, oferecendo possibilidades terapêuticas para melhorar a evolução clínica de pacientes com câncer. O processo de P&D de novos medicamentos inclui diversas etapas e requer um elevado investimento financeiro, assim como o recrutamento de pacientes que concordem em participar de ensaios clínicos. Tipicamente, o plano de P&D de um agente quimioterápico envolve etapas sequenciais, como os estudos *in vitro* para identificar as propriedades básicas do composto, estudos em roedores para avaliar a sua potencial atividade demonstrada previamente *in vitro*, estudos farmacocinéticos para definir suas propriedades ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção), além de estudos toxicológicos para definir as doses não tóxicas a serem testadas nos ensaios clínicos. Além disso, os ensaios clínicos requerem grande número de pacientes voluntários, expondo-os ainda a certos riscos, o que reforça a importância da investigação pré-clínica de compostos antitumorais durante este processo de P&D (DECAUDIN, 2011; MORO et al., 2012).

Diferentes ensaios *in vitro* têm sido utilizados para identificação de compostos potencialmente citotóxicos, como por exemplo, o protocolo estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA, no final dos anos 80, que preconizava a utilização de 60 linhagens de células tumorais para a triagem de novos compostos citotóxicos (SHOEMAKER, 2006). Contudo, a avaliação da eficácia subsequente em animais, desempenha um papel fundamental na identificação e seleção dos compostos que podem ser conduzidos às etapas posteriores de P&D, reiterando a necessidade de modelos animais que mimetizem adequadamente a patologia em questão para o adequado desenvolvimento do novo fármaco (DECAUDIN, 2011).

Basicamente, três categorias de modelos de câncer são utilizadas nas investigações pré-clínicas, sendo eles os modelos de camundongos geneticamente modificados, os modelos xenográficos derivados de linhagens de células tumorais humanas, e aqueles onde fragmentos de tumores de pacientes humanos são implantados diretamente em

camundongos imunodeficientes, conhecidos como modelo tumorgráfico ou xenográfico derivado de paciente (XDP). Em geral, os resultados obtidos nestes modelos, por exemplo, em camundongos, podem ser questionados por causa de sua correlação imperfeita com resultados obtidos em humanos (BURCHILL, 2006; DECAUDIN, 2011). Contudo, embora alguns compostos que se mostraram ativos em modelos xenográficos terem falhado em ensaios clínicos, muitos dos fármacos clinicamente aprovados para uso demonstraram e, continuam demonstrando, atividade frente a uma grande variedade de modelos pré-clínicos (JOHNSON et al., 2001; MORO et al., 2012). É importante ressaltar que os modelos em camundongos são ferramentas valiosas para a avaliação pré-clínica de novas estratégias terapêuticas contra o câncer, principalmente porque os seres humanos e os camundongos são geneticamente relacionados e, conseqüentemente, as principais vias de sinalização celular são conservadas entre as duas espécies. Além disso, a linha germinativa do camundongo pode ser modificada para gerar diferentes linhagens, modelando diferentes aspectos da carcinogênese. No início dos anos 80, os camundongos imunologicamente comprometidos, capazes de suportar o crescimento de tumores humanos, tornaram-se mais amplamente disponíveis (FOGH; GIOVANELLA, 1978), resultando no desenvolvimento de modelos xenográficos de tumores humanos, que representam, em conjunto com os modelos geneticamente planejados, as principais categorias de modelos *in vivo* de câncer, utilizados para os atuais estudos de eficácia pré-clínica.

2.4.1 Modelos xenográficos derivados de linhagens de células tumorais de pacientes

Xenotransplante é o nome dado a qualquer procedimento que envolva o transplante de células vivas, tecidos ou órgãos de uma espécie para outra. O crescimento de tumores humanos em uma espécie diferente como, por exemplo, em camundongos, requer que o animal hospedeiro seja imunodeficiente para prevenir a rejeição da amostra transplantada. Existem muitas linhagens de camundongos imunodeficientes, geneticamente determinados contendo mutações únicas (NUDE, SCID, BEIGE, XID, RAG-1 NULL, RAG-2 NULL) ou mutações combinadas (BG/NU, BG/NU/XID, NUDE/SCID, NOD/SCID) (PETERSON; HOUGHTON, 2004; FIRESTONE, 2010).

Estas espécies têm diferentes deficiências imunológicas e a disponibilidade de várias linhagens permissivas pode aumentar consideravelmente a eficiência da técnica de xenotransplante. No entanto, camundongos severamente imunocomprometidos têm também um alto custo e sua manipulação requer ambiente propício à criação e pessoal altamente treinado. A técnica de xenotransplantar tumores humanos em camundongos *nude* foi relatada, pela primeira vez, nos anos 60/70 (RYGAARD; POVLSEN, 1969; GIOVANELLA et al., 1972). Os modelos de camundongo *nude* são os mais utilizados no desenvolvimento de potenciais fármacos anticâncer e também em estudos da biologia dos tumores, e camundongos com imunodeficiências combinadas graves (por exemplo, SCID, BEGE, XID) têm ampliado a possibilidade de modelos e enxertos de tumores humanos, que antes eram difíceis de realizar (MORO et al., 2012).

Os tumores dos modelos xenográficos podem ser gerados a partir da injeção de linhagens de células tumorais humanas em camundongos imunocomprometidos, ou por transplante direto de fragmentos do tumor do paciente em tais camundongos. Este último é conhecido entre os pesquisadores como “tumorgráfico”, “xenográfico de tumor primário” ou “xenográfico derivado de paciente”, justamente para diferenciá-lo do modelo xenográfico convencional. Deve-se considerar que o cultivo prévio das células tumorais pode provocar mudanças na expressão gênica das mesmas (DANIEL et al., 2009), assim como na composição das populações celulares, que constituem o tumor humano original, resultando num xenotransplante de uma população de células que não é totalmente representativa da heterogeneidade do tumor original. Além disso, estudos envolvendo a resposta a fármacos citotóxicos, em modelos xenográficos de linhagens de células humanas, muitas vezes não correlaciona a atividade observada em pacientes (KERBEL et al., 2003), especialmente quando as células são injetadas subcutaneamente. Por outro lado, quando se usa o modelo ortotópico xenográfico, ou seja, quando as células são implantadas diretamente no local anatômico de origem (FIRESTONE, 2010), há uma melhor resposta preditiva, desenvolvendo, com maior frequência, a doença metastática, que não é normalmente observada nos modelos subcutâneos, mimetizando melhor a doença observada em pacientes (JOHNSON et al., 2001; KERBEL et al., 2003). Muitos grupos de pesquisa, no entanto, tem relatado o sucesso ao transplantarem fragmentos frescos de tumores derivados de humanos em camundongos imunocomprometidos (FIEBIG et al., 2007;

MORTON; HOUGHTON, 2007; FIRESTONE, 2010). Nestes casos, o transplante, tanto subcutâneo quando ortotópico preserva nas passagens iniciais o fenótipo histológico do tumor do doador, permitindo o estudo, ainda que momentâneo, do microambiente tumoral.

Neste âmbito, evidências sugerem que o microambiente tumoral, composto por componente do estroma e células imunes, desempenha importante papel na tumorigênese. Nos modelos xenográficos, no entanto, o estudo do material humano transplantado no camundongo tem certas limitações, incluindo o sistema imunológico comprometido, diferenças na especificidade das espécies, e impossibilidade de avaliar os eventos iniciais da tumorigênese. Embora os modelos xenográficos venham sendo utilizados historicamente no desenvolvimento de diversos agentes citotóxicos, o número limitado de modelos adequados de células, além do crescimento tumoral altamente agressivo no animal hospedeiro, têm limitado a sua utilidade (SAUSVILLE; BURGER, 2006).

2.4.2 Modelos de camundongos geneticamente planejados

Um camundongo geneticamente modificado é um camundongo cujo genoma foi alterado por técnicas de engenharia genética. O genoma destes camundongos sofre alterações em genes sabidamente envolvidos na transformação maligna, que podem ser mutados, deletados ou ainda super expressos. Consequentemente, o efeito da alteração destes genes é estudado ao longo do tempo para avaliar o seu efeito na tumorigênese e, além disso, respostas terapêuticas podem ser seguidas *in vivo* (CASTROP, 2010; MORO et al., 2012). O desenvolvimento de modelos mais complexos de camundongos geneticamente planejados tem permitido o estudo mais cuidadoso da iniciação do processo tumoral em um animal imunocompetente (FIRESTONE, 2010).

Há duas abordagens técnicas básicas para produzir um camundongo geneticamente modificado. A primeira envolve a injeção de uma solução de DNA, contendo o transgene de interesse no pronúcleo de um óvulo recém-fertilizado. Esta metodologia faz com que várias cópias do transgene injetado se integrem em um sítio aleatório no genoma e sejam transmitidas de forma mendeliana. O transgene deve conter todos os elementos de um gene (promotor, região codificante, sítio de adição de cauda poli-A), porém, deve ser

construído por técnicas de DNA recombinante, podendo ser utilizado para super expressar um gene de interesse em tecidos específicos do camundongo (GORDON et al., 1980; PEREIRA, 2008). A segunda abordagem envolve a alteração de DNA já existente no animal, através da recombinação homóloga em células-tronco embrionárias do gene alvo (THOMAS; CAPECCHI, 1987). Este método é empregado para manipular um gene único, na maioria dos casos eliminando o gene alvo. A capacidade de modificar regiões específicas do genoma do camundongo por recombinação homóloga permite a criação em potencial de camundongos com qualquer genótipo desejado. Estes animais são uma ferramenta importante para o estudo de função gênica através da observação das consequências fenotípicas da alteração do gene em questão (PEREIRA, 2008).

Dentre os modelos de camundongos geneticamente planejados, pode-se citar o modelo de tumor de pulmão obtido por direcionar c-RAF quinase constitutivamente ativada para o pulmão destes animais (camundongos c-RAF-1-BxB geneticamente modificados). Este modelo foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores alemães da Universidade de Würzburg (KERKHOFF et al., 2000) e foi empregado, nesta tese, para a avaliação antitumoral de um derivado de cucurbitacina (CUC 37, também chamada DECUCB83 no capítulo III), durante a realização do estágio sanduíche na Universidade de Münster, Alemanha (Capítulo III desta tese). Até o momento, não há relatos do emprego deste modelo para avaliação da potencial atividade antitumoral de cucurbitacinas, o que confere um caráter inovador à esta estratégia de estudo.

Sabe-se que a RAF quinase e seu ativador localizado acima nesta via de sinalização, o GTPase RAS, são altamente oncogênicos e suas formas ativas e mutadas são frequentemente encontradas em tumores de pulmão. A proteína c-RAF-1 consiste de um domínio regulatório NH₂-terminal, o qual medeia a interação com o RAS e um domínio de quinase COOH. A deleção do domínio regulatório NH₂-terminal leva a ativação constitutiva desta quinase, chamada então de c-RAF-1-BxB, a qual é altamente oncogênica em animais e também em culturas celulares (STANTON et al., 1989). A expressão da proteína oncogênica c-RAF-1-BxB quinase, direcionada ao pulmão, sob o controle do promotor humano SP-C, permite a expressão desta proteína em células epiteliais dos alvéolos pulmonares, resultando no rápido aparecimento de adenomas alveolares. Logo após um mês de vida, os camundongos

começam a desenvolver focos tumorais no tecido alveolar (KERKHOFF et al., 2000).

Na Figura 8 está demonstrada a estrutura das proteínas c-RAF-1 e c-RAF-1-BxB e a sequência de DNA recombinante direcionando a expressão de RAF sob o controle do promotor SP-C. Para a geração dos animais geneticamente alterados, os cassetes de expressão do vetor SP-C-c-RAF-1-BxB foram liberados pela digestão com endonucleases de restrição e, então, os fragmentos de DNA purificados foram injetados em ovos fertilizados de camundongos C75BL/6xDBA-2F₁. Ao contrário da sua forma não mutada, a c-RAF-1, que requer ativação por seus ativadores RAS, a proteína c-RAF-1-BxB é constitutivamente ativa (KERKHOFF et al., 2000).

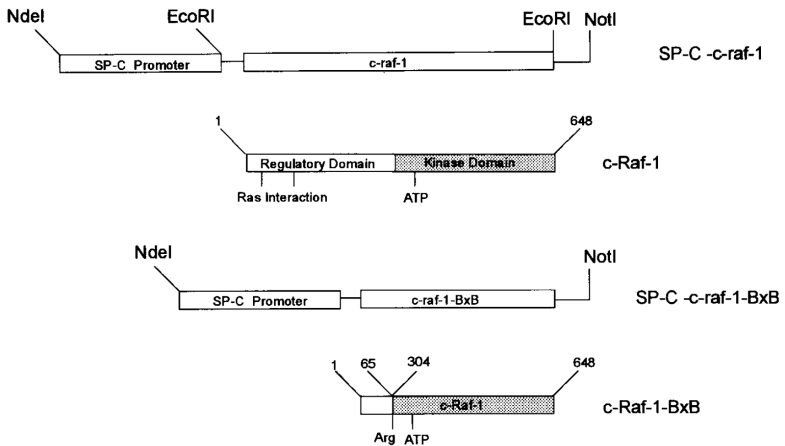


Figura 8: Representação esquemática das proteínas c-RAF-1 e c-RAF-1-BxB. Fonte: Kerkhoff et al. (2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação citotóxica de cucurbitacinas naturais e de derivados semissintéticos, propor o mecanismo de ação de morte celular *in vitro* para os compostos mais ativos, e avaliar a ação antitumoral do composto mais ativo, num modelo animal de tumor de pulmão.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a triagem citotóxica de uma série de cucurbitacinas naturais e derivados semissintéticos (DECUCs), frente a diferentes linhagens celulares tumorais, através do ensaio colorimétrico do MTT (Capítulo I);
- ✓ Elucidar o mecanismo de morte celular *in vitro* induzida pelos compostos mais ativos (Capítulos II, III e IV), através de metodologias específicas, em células A549;
- ✓ Determinar os perfis de transdução de sinais, em células A549, tratadas com os compostos mais ativos (Capítulos III e IV);
- ✓ Realizar uma análise comparativa dos efeitos citotóxicos dos compostos mais ativos, em células NIH3T3 *wild type* e NIH3T3 estavelmente transfectadas com oncogenes, tais como RAF and RAS (Capítulos III e IV).
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral da CUC 37, que se mostrou ativa *in vitro*, em um modelo animal de tumor de pulmão induzido pelo oncogene c-RAF (Capítulo III).

CAPÍTULO I:
TRIAGEM *IN VITRO* DA AÇÃO CITOTÓXICA DE
CUCURBITACINAS NATURAIS E DE DERIVADOS
SEMISSINTÉTICOS

1. APRESENTAÇÃO

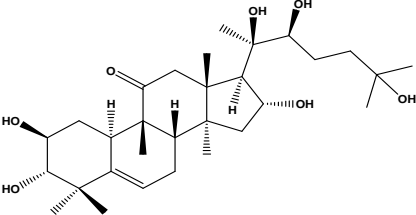
Este capítulo apresenta os resultados da triagem citotóxica de novas cucurbitacinas naturais e de derivados semissintéticos, frente a diferentes linhagens de células tumorais.

As cucurbitacinas naturais (CUCs), bem como seus derivados semissintéticos (DeCUCs), foram obtidos pela Profa. Dra. Karen Lang, através de parcerias com o Laboratório de Síntese, QMC/CFM/UFSC (Prof. Dr. Miguel S. B. Caro), o Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade de Buenos Aires (Prof. Dr. Fernando Javier Durán), e o Laboratório de Química Farmacêutica, CIF/CCS/UFSC (Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel), aos quais agradecemos esta frutuosa colaboração.

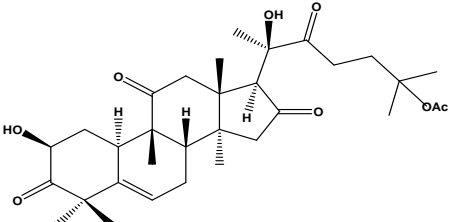
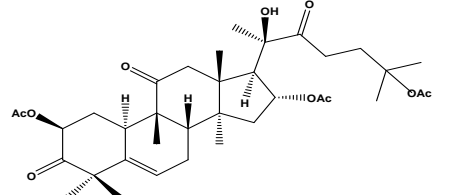
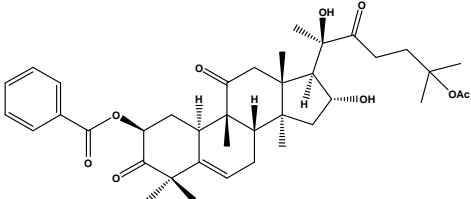
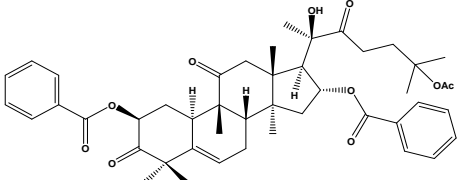
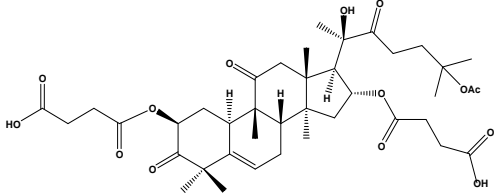
As soluções-estoques foram preparadas a partir das massas disponíveis de cada amostra, em concentrações variadas, através da solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). Para a realização dos ensaios, as soluções-estoques preparadas foram diluídas em meio de cultura ou em água ultra-pura, nas concentrações desejadas, não ultrapassando 1% de DMSO, que é a concentração já testada no Laboratório e que não se mostrou citotóxica (dados não mostrados).

Os 51 compostos avaliados estão apresentados no Quadro 2.

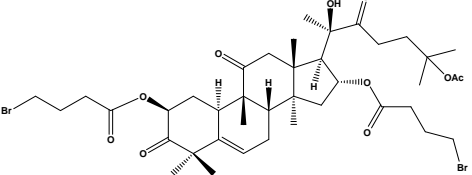
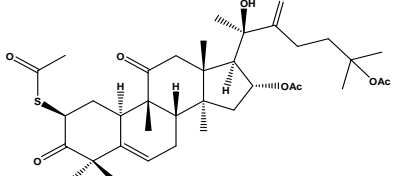
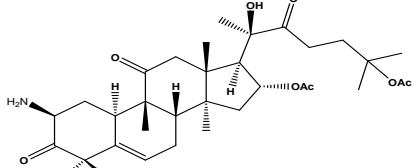
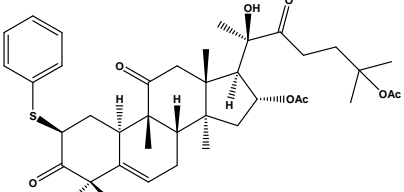
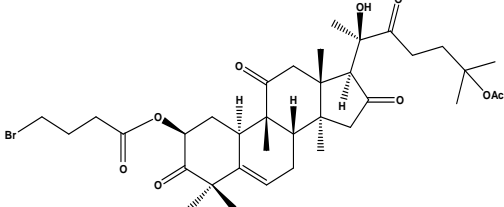
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais.

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1 |  | <p style="text-align: center;">KL-2 KL2-122 (1)</p> |

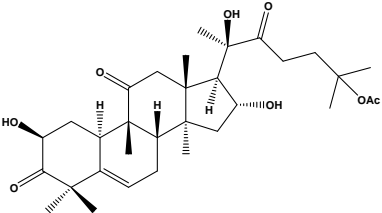
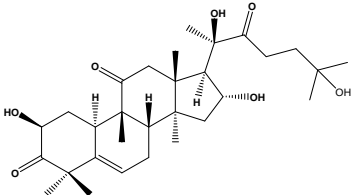
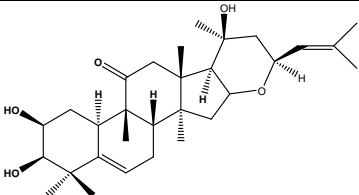
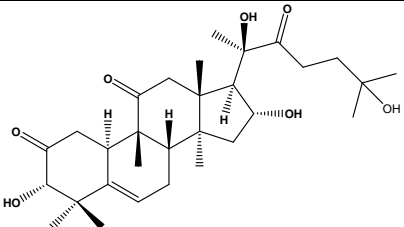
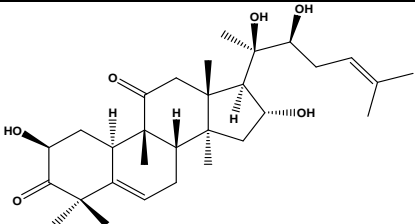
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 2 |  <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a hydroxyl group at C-1, a methyl group at C-2, and a trimethylacetate group at C-25. The C-26 position is a double bond.</p> | KL-7 (2) |
| 3 |  <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with an acetoxy group at C-1, a methyl group at C-2, and a trimethylacetate group at C-25. The C-26 position is a double bond.</p> | KL-10 (4) |
| 4 |  <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a benzoyloxy group at C-1, a methyl group at C-2, and a trimethylacetate group at C-25. The C-26 position is a double bond.</p> | KL-35A (9) |
| 5 |  <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a benzoyloxy group at C-1, a methyl group at C-2, and a benzoyloxy group at C-26. The C-25 position is a trimethylacetate group.</p> | KL-35B (10) |
| 6 |  <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a pivaloyloxy group at C-1, a methyl group at C-2, and a pivaloyloxy group at C-26. The C-25 position is a trimethylacetate group.</p> | KL-38 (11) |

Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 7 |  | <p>KL-49 (12)</p> |
| 8 |  | <p>KL-57 (16)</p> |
| 9 |  | <p>KL-65 (19)</p> |
| 10 |  | <p>KL-71/KL2-70 (20)</p> |
| 11 |  | <p>KL-73/KL2-80 (21)</p> |

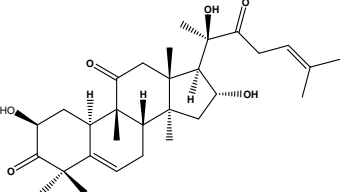
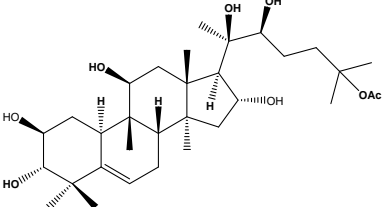
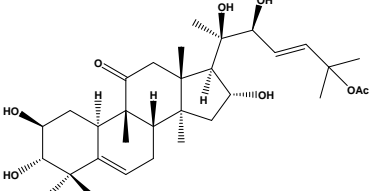
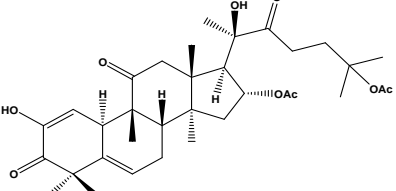
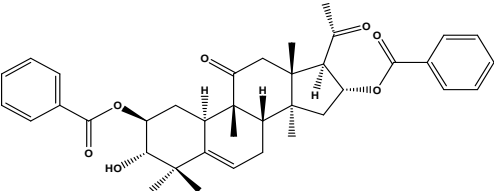
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 12 |  | DHB (22) |
| 13 |  | CUCR (23) |
| 14 |  | W6 (25) |
| 15 |  | KL-39 (26) |
| 16 |  | KL-83 (27) |

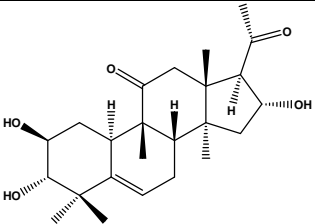
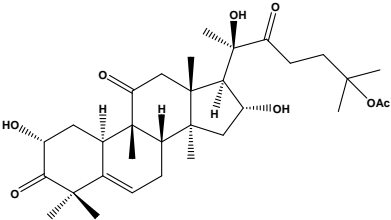
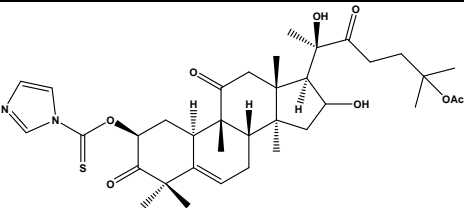
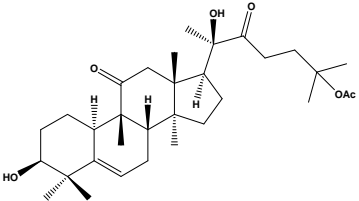
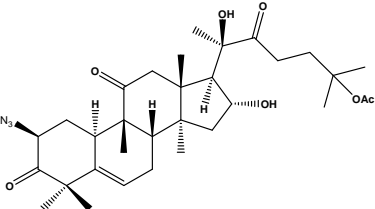
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 17 | <p>The structure shows a complex polycyclic cucurbitacin skeleton. It features a central ring system with multiple methyl groups and hydroxyl groups. A side chain is attached to the C-13 position, consisting of a carboxylic acid group and a branched alkyl chain. A glucose moiety is attached to the C-3 position via an ether linkage.</p> | Cayapeo C (35) |
| 18 | <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a side chain at C-13 that includes a carboxylic acid group and a branched alkyl chain. There are several hydroxyl groups and methyl groups on the polycyclic core.</p> | WT01 (39) |
| 19 | <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a side chain at C-13 that includes a carboxylic acid group and a branched alkyl chain. There are several hydroxyl groups and methyl groups on the polycyclic core. An acetate group is present at C-10.</p> | KL2-0 (50) |
| 20 | <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a side chain at C-13 that includes a carboxylic acid group and a branched alkyl chain. There are several hydroxyl groups and methyl groups on the polycyclic core. Acetate groups are present at C-3 and C-10.</p> | KL2-1 (51) |
| 21 | <p>The structure shows a cucurbitacin skeleton with a side chain at C-13 that includes a carboxylic acid group and a branched alkyl chain. There are several hydroxyl groups and methyl groups on the polycyclic core. Acetate groups are present at C-3 and C-10, and a trifluoroacetate (OTFA) group is present at C-13.</p> | KL2-19 (52) |

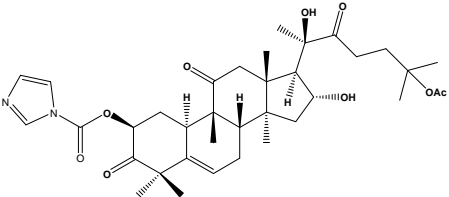
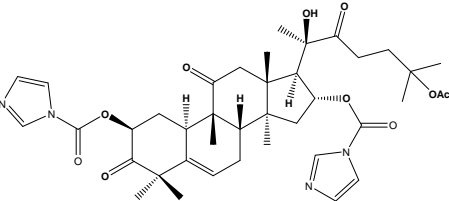
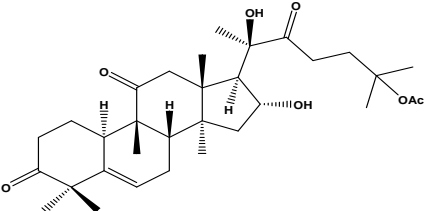
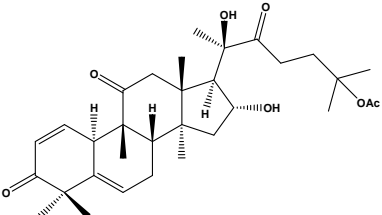
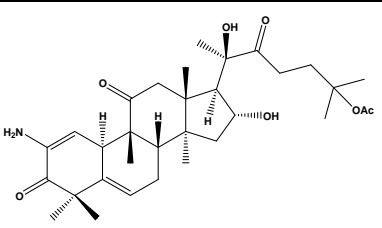
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 22 |  The structure shows a cucurbitacin skeleton with a hydroxyl group at C-1, a ketone at C-3, and a side chain at C-25 consisting of a hydroxyl group, a ketone, and a prenyl group. | KL2-39 (53) |
| 23 |  The structure shows a cucurbitacin skeleton with hydroxyl groups at C-1 and C-3, and a side chain at C-25 consisting of two hydroxyl groups and a tert-butyl group. | KL2-47 (54) |
| 24 |  The structure shows a cucurbitacin skeleton with hydroxyl groups at C-1 and C-3, and a side chain at C-25 consisting of two hydroxyl groups, a double bond, and a tert-butyl group. | KL2-48 (55) |
| 25 |  The structure shows a cucurbitacin skeleton with hydroxyl groups at C-1 and C-3, a ketone at C-3, and a side chain at C-25 consisting of two hydroxyl groups, a ketone, and a tert-butyl group. | KL2-66B (56) |
| 26 |  The structure shows a cucurbitacin skeleton with hydroxyl groups at C-1 and C-3, and two benzoyloxy groups at C-25 and C-26. | KL2-89B (57) |

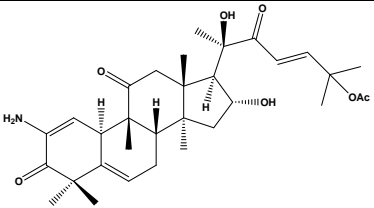
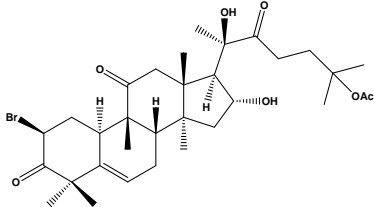
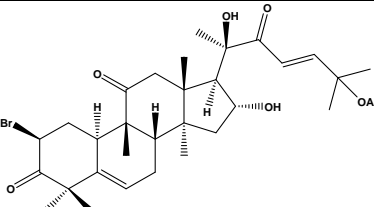
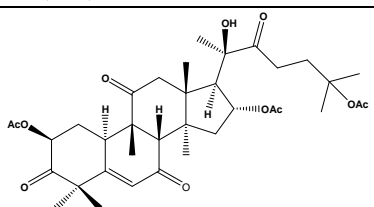
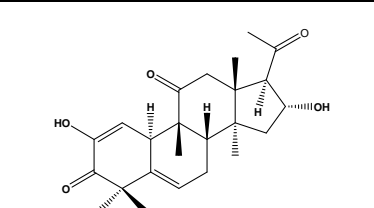
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 27 |  | KL2-110 (58) |
| 28 |  | KL2-117 (59) |
| 29 |  | KL2-129A (60) |
| 30 |  | KL2-133 (61) |
| 31 |  | KL2-134 (62) |

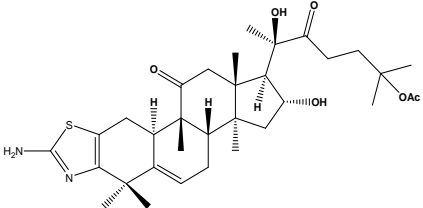
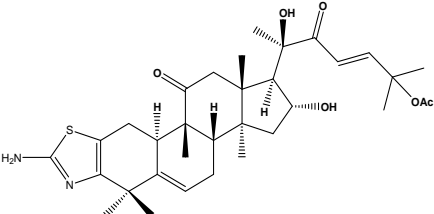
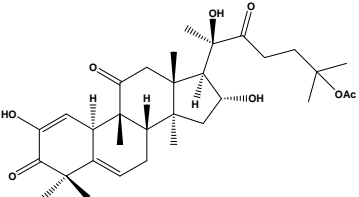
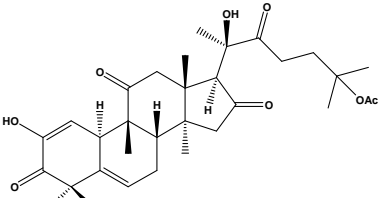
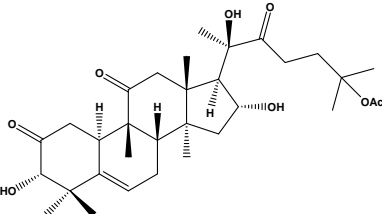
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 32 |  | KL2-136A (64) |
| 33 |  | KL2-136B (65) |
| 34 |  | KL3-25 (80) |
| 35 |  | KL3-29X (81) |
| 36 |  | KL3-5 (82) |

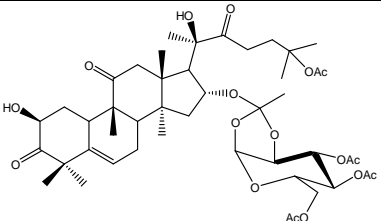
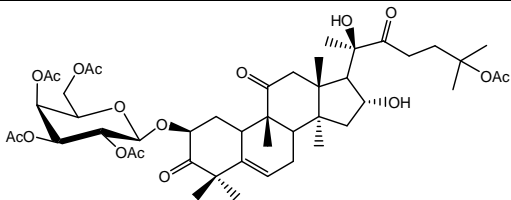
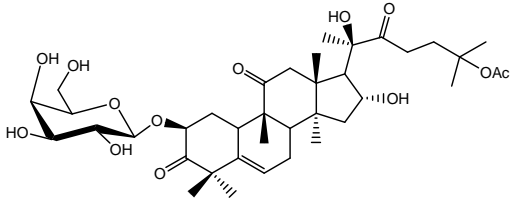
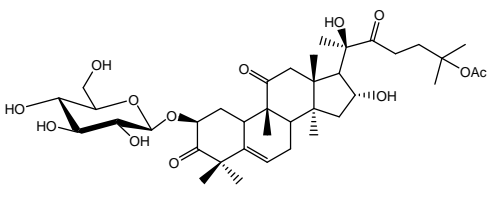
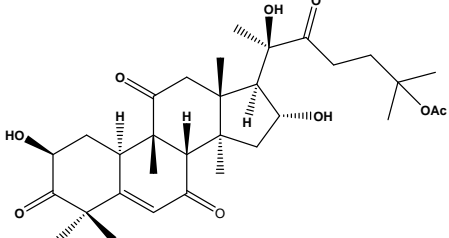
Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 37 |  <p>The structure of Cucurbitacin 37 is a complex pentacyclic triterpene. It features a tetracyclic core with a five-membered ring containing a ketone group and a methyl group. A side chain at C-13 includes a hydroxyl group, a ketone group, and a branched alkene chain ending in an acetate group. A primary amine group is attached to the C-22 position.</p> | KL3-5X (83) |
| 38 |  <p>The structure of Cucurbitacin 38 is a complex pentacyclic triterpene. It features a tetracyclic core with a five-membered ring containing a ketone group and a methyl group. A side chain at C-13 includes a hydroxyl group, a ketone group, and a branched alkane chain ending in an acetate group. A bromine atom is attached to the C-22 position.</p> | KL3-1 (84) |
| 39 |  <p>The structure of Cucurbitacin 39 is a complex pentacyclic triterpene. It features a tetracyclic core with a five-membered ring containing a ketone group and a methyl group. A side chain at C-13 includes a hydroxyl group, a ketone group, and a branched alkene chain ending in an acetate group. A bromine atom is attached to the C-22 position.</p> | KL3-3X (85) |
| 40 |  <p>The structure of Cucurbitacin 40 is a complex pentacyclic triterpene. It features a tetracyclic core with a five-membered ring containing a ketone group and a methyl group. A side chain at C-13 includes a hydroxyl group, a ketone group, and a branched alkane chain ending in an acetate group. An acetate group is attached to the C-22 position.</p> | KL3-20X (86) |
| 41 |  <p>The structure of Cucurbitacin 41 is a complex pentacyclic triterpene. It features a tetracyclic core with a five-membered ring containing a ketone group and a methyl group. A side chain at C-13 includes a hydroxyl group, a ketone group, and a branched alkane chain ending in an acetate group. A hydroxyl group is attached to the C-22 position.</p> | KL3-31X (87) |

Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 42 |  The chemical structure of Cucurbitacin 42 features a complex pentacyclic core. It has a 2-aminothiazole ring fused to the C-10 and C-11 positions. The C-15 position is substituted with a 3-hydroxy-4-(tert-butylacetoxy)butanoyl group. The C-16 position has a hydroxyl group, and the C-17 position has a hydroxyl group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes. | KL3-29 (88) |
| 43 |  The chemical structure of Cucurbitacin 43 is similar to 42, but the side chain at C-15 is an unsaturated 3-hydroxy-4-(tert-butylacetoxy)but-2-enoyl group. The rest of the structure, including the 2-aminothiazole ring and the hydroxyl groups at C-16 and C-17, is identical to compound 42. | KL3-30 (89) |
| 44 |  The chemical structure of Cucurbitacin 44 has a 2-hydroxy-6-oxo-1,4-dihydropyridin-3-yl ring fused to the C-10 and C-11 positions. The C-15 position is substituted with a 3-hydroxy-4-(tert-butylacetoxy)butanoyl group. The C-16 position has a hydroxyl group, and the C-17 position has a hydroxyl group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes. | KL3-8A (90) |
| 45 |  The chemical structure of Cucurbitacin 45 has a 2-hydroxy-6-oxo-1,4-dihydropyridin-3-yl ring fused to the C-10 and C-11 positions. The C-15 position is substituted with a 3-hydroxy-4-(tert-butylacetoxy)butanoyl group. The C-16 position has a hydroxyl group, and the C-17 position has a ketone group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes. | KL3-18X (91) |
| 46 |  The chemical structure of Cucurbitacin 46 has a 2-hydroxy-6-oxo-1,4-dihydropyridin-3-yl ring fused to the C-10 and C-11 positions. The C-15 position is substituted with a 3-hydroxy-4-(tert-butylacetoxy)butanoyl group. The C-16 position has a hydroxyl group, and the C-17 position has a hydroxyl group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes. | DHisoB (92) |

Quadro 2: Cucurbitacinas utilizadas para a triagem citotóxica em linhagens tumorais. (continuação)

| Número | Composto | Código (Origem) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 47 |  <p>The structure shows a cucurbitacin core with a hydroxyl group at C-13, a trimethylacetate ester at C-27, and a trimethylacetate ester at C-29. It is linked via a glycosidic bond to a disaccharide consisting of a glucose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6) and a galactose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6).</p> | VR64A (93) |
| 48 |  <p>The structure shows a cucurbitacin core with a hydroxyl group at C-13, a trimethylacetate ester at C-27, and a trimethylacetate ester at C-29. It is linked via a glycosidic bond to a disaccharide consisting of a glucose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6) and a galactose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6).</p> | VR65C (94) |
| 49 |  <p>The structure shows a cucurbitacin core with a hydroxyl group at C-13, a trimethylacetate ester at C-27, and a trimethylacetate ester at C-29. It is linked via a glycosidic bond to a disaccharide consisting of a glucose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6) and a galactose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6).</p> | VR148D (95) |
| 50 |  <p>The structure shows a cucurbitacin core with a hydroxyl group at C-13, a trimethylacetate ester at C-27, and a trimethylacetate ester at C-29. It is linked via a glycosidic bond to a disaccharide consisting of a glucose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6) and a galactose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6).</p> | VR42A2 (96) |
| 51 |  <p>The structure shows a cucurbitacin core with a hydroxyl group at C-13, a trimethylacetate ester at C-27, and a trimethylacetate ester at C-29. It is linked via a glycosidic bond to a disaccharide consisting of a glucose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6) and a galactose unit (with hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-6).</p> | KL3-32 (97) |

As linhagens tumorais humanas utilizadas neste trabalho foram as seguintes: A549 (adenocarcinoma de pulmão) cedidas pela Universidade de Barcelona, *European Collection of Cell Cultures* (ECACC); RD e KB (rabdmiocarcinoma e carcinoma nasofaríngeo, respectivamente) adquiridas do Instituto Aldolfo Lutz, São Paulo, SP; e HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) obtidas de Texas A&M University System, EUA. As células de neuroblastoma murino, N2A, foram cedidas pelo Professor Carlos Roberto Zanetti, do Laboratório de Imunologia Aplicada, MIP/CCB/UFSC.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em Meio MEM (Minimal Essential Medium, Cultilab®), com exceção da HCT-8, que foi cultivada em Meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementadas com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco®), e mantidas em frascos de cultura estéreis de 75cm² a 37°C, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂.

Para avaliação da citotoxicidade em células tumorais, o método utilizado foi o ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), proposto por Mosmann (1983). O MTT é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que o reduzem em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto conhecido por formazana de coloração roxa, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT é um método sensível e quantitativo, que mede a quantidade de formazana formada por espectrofotometria, onde o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Para a realização do ensaio, suspensões de cada uma das linhagens tumorais usadas neste estudo, contendo aproximadamente 1,0 x 10⁵ células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foram distribuídas em placas de 96 cavidades (10⁴ células/cavidade). As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C, em estufa de CO₂. Após 24 h, o meio MEM foi substituído pelos compostos, em diferentes concentrações, através de diluições sucessivas na razão 1:2, e as placas foram incubadas, por diferentes períodos de tempo previamente definidos (48 e 72 h). Após, o meio de cada

cavidade foi substituído por 50 µL de uma solução de MTT¹ (1mg/mL), e as placas foram novamente incubadas por 4 h. A solução de MTT foi então removida e substituída por 100 µL de DMSO/cavidade (Nuclear[®]) para dissolver os cristais de formazana. As placas foram agitadas por 10 min à temperatura ambiente, e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Tecan[®], modelo Infinite 200 PRO), a 540 nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada material-teste foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação aos controles celulares, considerados 100% viáveis, através da seguinte fórmula, onde DO= Densidade Óptica:

$$X \% = \frac{DO_{\text{material-teste}} \times 100}{DO_{\text{controle celular}}}$$

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico, e através de análise de regressão linear, foi possível calcular a CC₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC₅₀ calculados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

Como controles positivos, durante a avaliação da ação citotóxica foram utilizados paclitaxel (Sigma[®]) e doxorubicina (Zodiac[®]).

Os compostos foram fornecidos para avaliação em dois momentos distintos. Primeiramente, foram obtidos e avaliados 33 compostos e, após o término da primeira triagem, foram fornecidos mais 18 compostos. Com o primeiro grupo de compostos (de números 1 a 33), foi realizada uma triagem numa única concentração molar (50 µM), por 72 h, por nós definida como *cut-off* para a ação citotóxica (Tabela 1).

A partir dos resultados obtidos nesta triagem, para a determinação dos valores de CC₅₀ das amostras, foram selecionados os compostos que apresentaram viabilidade celular menor do que 50%, em, pelo menos, duas das linhagens celulares avaliadas. Os valores expressos como CC₅₀ podem ser visualizados na Tabela 2.

¹ **Preparo da solução-estoque de MTT:** foram utilizados 5 mg de MTT (Sigma[®]) para cada mL de PBS (p/v). Para uso, foi feita a diluição em meio MEM (1mg/mL).

Tabela 1: Triagem citotóxica do primeiro grupo de cucurbitacinas testadas frente a diferentes linhagens celulares tumorais, cujos resultados estão expressos em percentuais de viabilidade celular.

| CUC | Linhagens celulares tumorais | | | | |
|-----|------------------------------|-------|-------|--------|-------|
| | A549 | KB | RD | HCT-8 | N2A |
| 1 | 76,59 | 77,16 | 83,21 | 101,00 | 67,46 |
| 2 | 20,00 | 2,02 | 51,87 | 28,23 | 20,84 |
| 3 | 48,09 | 45,59 | 65,20 | 62,77 | 25,91 |
| 4 | 76,59 | 91,27 | 76,64 | 120,18 | 53,02 |
| 5 | 52,66 | 70,94 | 53,18 | 80,05 | 19,09 |
| 6 | 84,70 | 78,45 | 67,16 | 96,11 | 40,67 |
| 7 | 69,33 | 29,07 | 61,35 | 80,83 | 34,54 |
| 8 | 67,52 | 60,92 | 76,51 | 76,95 | 30,84 |
| 9 | 29,99 | 32,48 | 35,48 | 16,10 | 5,32 |
| 10 | 69,04 | 74,38 | 69,92 | 77,14 | 24,00 |
| 11 | 54,12 | 37,08 | 56,47 | 42,50 | 36,62 |
| 12 | 13,57 | 1,37 | 12,29 | 21,62 | 10,50 |
| 13 | 13,06 | 1,08 | 5,19 | 19,73 | 12,19 |
| 14 | 72,94 | 90,96 | 86,48 | 50,78 | 50,78 |
| 15 | 18,04 | 1,89 | 13,69 | 19,59 | 13,25 |
| 16 | 10,19 | 1,49 | 2,94 | 10,59 | 9,31 |
| 17 | 77,64 | 85,81 | 41,83 | 69,78 | 55,64 |
| 18 | 10,41 | 1,30 | 4,31 | 21,50 | 10,58 |
| 19 | 3,50 | 0,82 | 1,62 | 1,85 | 20,45 |
| 20 | 4,64 | 1,37 | 2,15 | 11,95 | 3,32 |
| 21 | 77,64 | 80,50 | 85,87 | 55,95 | 25,93 |
| 22 | 48,61 | 24,46 | 20,21 | 62,92 | 26,37 |
| 23 | 74,66 | 84,96 | 79,53 | 77,54 | 60,02 |
| 24 | 66,63 | 78,27 | 80,03 | 62,27 | 39,43 |
| 25 | 55,75 | 45,04 | 37,94 | 49,88 | 55,04 |
| 26 | 69,01 | 89,05 | 87,61 | 72,43 | 48,71 |

Tabela 1: Triagem citotóxica do primeiro grupo de cucurbitacinas frente a diferentes linhagens celulares tumorais, cujos resultados estão expressos em percentuais de viabilidade celular. (continuação)

| CUC | Linhagens celulares tumorais | | | | |
|-----|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | A549 | KB | RD | HCT-8 | N2A |
| 27 | 81,03 | 80,27 | 65,07 | 69,77 | 41,61 |
| 28 | 34,94 | 1,30 | 1,67 | 26,63 | 3,70 |
| 29 | 7,61 | 2,18 | 1,22 | 3,83 | 38,70 |
| 30 | 36,19 | 2,93 | 3,23 | 17,09 | 23,17 |
| 31 | 12,84 | 1,95 | 1,21 | 1,69 | 7,06 |
| 32 | 82,07 | 84,28 | 53,24 | 62,26 | 45,19 |
| 33 | 66,16 | 53,00 | 10,21 | 54,61 | 33,11 |

Tabela 2: Determinação dos valores de CC₅₀ das cucurbitacinas mais ativas na triagem anterior frente a diferentes linhagens celulares tumorais.

| CUC | Linhagens celulares tumorais | | | | |
|-----|------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | A549 | KB | RD | HCT-8 | N2A |
| 2 | 30,945 ± 2,652 | 23,977 ± 2,089 | 29,830 ± 2,489 | 30,783 ± 2,644 | 45,235 ± 6,485 |
| 3 | 62,735 ± 2,680 | 34,210 ± 2,008 | 45,059 ± 11,822 | >50 | 35,379 ± 6,998 |
| 9 | 41,425 ± 3,090 | 44,768 ± 2,563 | 32,018 ± 2,798 | 25,733 ± 0,801 | 24,258 ± 3,052 |
| 11 | >50 | 16,688 ± 1,476 | 23,545 ± 0,445 | 17,151 ± 2,490 | 39,835 ± 1,435 |
| 12 | 12,837 ± 0,585 | 14,722 ± 0,356 | 12,735 ± 3,755 | 10,566 ± 0,846 | 33,444 ± 10,746 |
| 13 | 1,445 ± 0,106 | 1,575 ± 0,209 | 1,075 ± 0,078 | 3,318 ± 0,018 | 7,222 ± 0,801 |
| 15 | 19,512 ± 1,921 | 16,272 ± 0,693 | 13,500 ± 1,089 | 12,798 ± 1,559 | 15,210 ± 5,402 |
| 16 | 4,808 ± 0,018 | 2,794 ± 0,856 | 2,153 ± 0,044 | 2,057 ± 0,640 | 6,346 ± 0,973 |
| 18 | 3,825 ± 0,460 | 2,376 ± 0,295 | 2,060 ± 0,069 | 5,087 ± 0,324 | 3,883 ± 3,730 |

Tabela 2: Determinação dos valores de CC_{50} das cucurbitacinas mais ativas na triagem anterior frente a diferentes linhagens celulares tumorais. (continuação)

| | | | | | |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 19 | 0,031 ± 0,007 | 0,032 ± 0,005 | 0,013 ± 0,001 | 0,022 ± 0,005 | 0,117 ± 0,106 |
| 20 | 2,540 ± 0,622 | 2,653 ± 0,834 | 4,236 ± 0,657 | 3,132 ± 0,192 | 5,457 ± 1,977 |
| 22 | 41,285 ± 1,393 | 21,719 ± 4,825 | 30,890 ± 0,311 | >50 | 37,726 ± 0,964 |
| 25 | 45,085 ± 0,926 | >50 | 40,635 ± 1,704 | 46,838 ± 4,472 | 13,078 ± 9,419 |
| 28 | 32,446 ± 2,885 | 14,367 ± 1,382 | 20,385 ± 1,690 | 34,290 ± 1,323 | 11,691 ± 4,630 |
| 29 | 9,500 ± 0,099 | 3,149 ± 0,207 | 1,400 ± 0,113 | 5,155 ± 1,026 | 7,044 ± 4,820 |
| 30 | 22,190 ± 4,045 | 22,864 ± 0,196 | 11,110 ± 0,693 | 20,389 ± 0,529 | 30,139 ± 8,554 |
| 31 | 9,454 ± 1,157 | 10,499 ± 0,843 | 6,320 ± 0,428 | 7,232 ± 0,913 | 11,454 ± 4,305 |
| 33 | >50 | >50 | 30,609 ± 6,210 | >50 | 35,744 ± 5,184 |
| Pac | 0,054 ± 0,011 | 0,006 ± 0,001 | 0,024 ± 0,003 | 0,017 ± 0,0001 | 0,170 ± 0,055 |
| Dox | 1,459 ± 0,159 | 0,335 ± 0,005 | 0,788 ± 0,089 | 1,726 ± 0,131 | N.D. |

CC_{50} = Concentração tóxica a 50% das células (μ M), cujos valores representam a média \pm D.P. de três experimentos independentes. Estes valores foram calculados por análise de regressão linear. N.D.= Não determinado.

Entre as cucurbitacinas testadas, as sete mais citotóxicas frente às cinco linhagens celulares tumorais foram as de números 13, 16, 18, 19, 20, 29 e 31, com valores de CC_{50} variando de 0,013 a 11,454 μ M.

Os compostos 16 e 18 são cucurbitacinas naturais inéditas, isoladas das raízes de *Wilbrandia ebracteata* (taiuíá), e seu isolamento, caracterização estrutural e determinação de sua ação citotóxica foram recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa no periódico *Planta Medica* (LANG et al., 2011). Neste artigo foi relatada apenas a ação citotóxica das cucurbitacinas naturais 12, 13, 15, 16, 18 e 19, as quais correspondem aos compostos 5, 6, 3, 2, 1 e 4 da publicação, respectivamente, em quatro das cinco linhagens celulares tumorais descritas anteriormente (A549, KB, RD e HCT-8).

Num segundo momento da realização desta tese (dois anos após o início da primeira triagem), foram fornecidos para avaliação mais 18 compostos (números 34 a 51), que são derivados semissintéticos da cucurbitacina B e da dihidrocucurbitacina B, e também alguns glicosídeos (compostos de números 47 a 50). Por questões práticas, estes compostos foram avaliados somente em células A549, uma vez que essa linhagem já havia sido eleita para a avaliação de mecanismo de ação de morte celular de outros compostos. Os valores expressos como CC_{50} , juntamente com o intervalo de confiança para cada dado, foram obtidos em dois tempos de tratamento (48 e 72 horas) e podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3: Determinação dos valores de CC_{50} do segundo grupo de cucurbitacinas frente às células A549.

| CUC | 48 horas | | 72 horas | |
|-----|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| | CC_{50} (μ M) | Intervalo de confiança 95% | CC_{50} (μ M) | Intervalo de confiança 95% |
| 34 | >100 | - | 66,74 | 51,56 – 86,39 |
| 35 | 87,77 | 75,08 – 102,62 | 77,74 | 62,83 – 96,18 |
| 36 | >100 | - | >100 | - |
| 37 | 0,42 | 0,16 – 1,13 | 0,12 | 0,06 – 0,23 |
| 38 | 34,93 | 31,40 – 38,85 | 29,09 | 25,21 – 33,58 |
| 39 | 1,33 | 0,452 – 3,94 | 0,12 | 0,07 – 0,20 |
| 40 | >100 | - | >100 | - |
| 41 | >100 | - | >100 | - |
| 42 | >100 | - | >100 | - |
| 43 | 28,8 | 18,98 – 43,71 | 11,52 | 6,80 – 19,52 |
| 44 | >100 | - | >100 | - |
| 45 | >100 | - | >100 | - |
| 46 | 37,99 | 30,88 – 46,75 | 48,55 | 36,12 – 65,28 |
| 47 | 49,32 | 38,45 – 63,27 | 31,27 | 27,63 – 35,37 |
| 48 | 76,34 | 57,61 – 101,14 | 53,60 | 45,77 – 62,76 |
| 49 | >100 | - | >100 | - |
| 50 | >100 | - | >100 | - |

Tabela 3: Determinação dos valores de CC_{50} do segundo grupo de cucurbitacinas frente às células A549. (continuação)

| CUC | 48 horas | | 72 horas | |
|------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | CC_{50} (μM) | Intervalo de confiança 95% | CC_{50} (μM) | Intervalo de confiança 95% |
| 51 | >100 | - | >100 | - |
| DOX | 3,69 | 2,34 – 5,82 | 1,18 | 0,89 – 1,55 |
| PAC | 1,16 | 0,73 – 1,84 | 0,19 | 0,11 – 0,32 |

CC_{50} = Concentração tóxica a 50% das células (μM); os dados experimentais de citotoxicidade foram analisados por regressão não linear e calculados utilizando log (composto) comparado com a resposta normalizada (*slope* variável), através do software GraphPad Prism.

No segundo artigo, que foi publicado no periódico *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (LANG et al., 2012), foram descritos os resultados referentes à ação citotóxica dos precursores cucurbitacina B (cuc 19) e dihidrocucurbitacina B (cuc 12), e de seus 29 derivados semissintéticos. Para facilitar a leitura, os números referente a cada composto citado no

CAPÍTULO II:
ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA DE
UMA DAS CUCURBITACINAS NATURAIS INÉDITAS MAIS
ATIVAS FRENTE À LINHAGEM CELULAR TUMORAL A549

1. APRESENTAÇÃO

Os estudos que demonstraram o efeito indutor de morte celular programada pelas cucurbitacinas (os quais foram apresentados na revisão bibliográfica desta tese) impulsionaram a realização da segunda etapa deste estudo, que consistiu em avaliar o mecanismo da morte celular induzida por uma das cucurbitacinas naturais mais citotóxicas (n.º 18 do Quadro 2 desta tese) do primeiro grupo avaliado, a qual é inédita e foi nomeada “Cuc 1” nesta publicação, em células de câncer de pulmão. Os resultados obtidos foram compilados na forma de um artigo, o qual foi aceito para publicação no periódico *International Journal of Cancer Research*, cujo manuscrito encontra-se a seguir.

2.ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER RESEARCH

International Journal of Cancer Research, 2013

ISSN 1811-9727 / DOI: 10.3923/ijcr.2013.

© 2013 Academic Journals Inc.

Proliferative Inhibition and Apoptotic Mechanism on Human Non-small-cell Lung Cancer (A549 Cells) of a Novel Cucurbitacin from *Wilbrandia ebracteata* Cogn

¹I.T. Silva, ¹Marina R. Teixeira, ²Karen L. Lang, ¹Tatiana da R. Guimarães, ⁴Sabine E. Dudek, ³Fernando J. Durán, ⁴Stephan Ludwig, ²Miguel S.B. Caro, ¹Eloir P. Schenkel and ¹Cláudia M.O. Simões

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

²Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³UMYMFOR-Department of Organic Chemistry, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

⁴Institute of Molecular Virology (IMV), Center of Molecular Biology of Inflammation (ZMBE), University of Muenster, D-48149 Muenster, Germany

Corresponding Author: Cláudia M.O. Simões, Laboratório de Virologia, Aplicada da UFSC, Departamento de Ciências, Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitario, Trindade, Florianópolis, 88040-900, SC, Brasil Tel: +55-48-3721-5207 Fax: +55-48-3721-9258

ABSTRACT

Cancer represents a major public health problem from all over the world and the lung carcinoma is the leading cause of cancer death. In this sense, the aim of the present study was to examine the cytotoxic effects of a novel Cucurbitacin (Cuc1) isolated from *Wilbrandia ebracteata* on human non-small-cell lung cancer (A549). In order to achieve this aim, the cell proliferation was measured by MTT assay and actin cytoskeleton was stained by rhodamine-phalloidin, whereas, the cell cycle distribution and apoptosis induction were quantified using flow cytometry. The signal transduction profiling of Cuc1 treated cells, as well as the levels of apoptotic proteins were analyzed by Western blotting. Cuc1 significantly inhibited cell growth showing IC₅₀ values of 13.5±1.8 and 3.8±0.4 µM for 48 and 72 h of treatment, respectively. Additionally, Cuc1 arrested cell cycle at G2/M phase, disrupted the actin dynamics and induced apoptosis since the amount of apoptotic cells increased from 5.18±0.585% in the untreated cells to 73.82±0.545% in the treated cells. Detailed analysis on the mechanism of action revealed that Cuc1 inhibited the phosphorylation of Protein Kinase B (PKB/AKT) and Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) signaling pathways, down-regulating the expression of Bcl-2 and consequently inducing cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol. These results suggest that the Cuc1 could be a potential candidate for cancer chemotherapy agent.

Key words: Cucurbitacins, lung cancer, apoptosis, cell cycle arrest, signaling pathways

INTRODUCTION

Cancer can be considered a major public health problem all around the world. In the United States, 25% of all deaths are related to cancer. Only in 2011, were estimated 221,130 new cases and 156,940 deaths related to lung cancer specifically. Worldwide, the non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) is the leading cause of cancer death in both men and women (Han and Roman, 2010;

Siegel *et al.*, 2011). In spite of quick advances in diagnostic and surgical techniques, lung cancer remains one of the hardest treatable human cancers. Until today treatment modalities are ineffective and new therapies are necessary to reduce the effects of the increasing incidence in this type of cancer (Kim *et al.*, 2003).

Apoptosis is a form of programmed cell death that permits to eliminate unwanted, redundant, or mutated cells from organisms, without causing damage to the cellular microenvironment (Russo *et al.*, 2006). In cancer cells, multiple genetic mutations and the overall cellular stresses of malignant transformation are associated with substantial pro-apoptotic activity (Call *et al.*, 2008). However, cancer can persist and dysregulation of apoptosis might be essential for the survival of many cancers providing inherent resistance to chemotherapeutic agents (Tan and White, 2008; Sayers, 2011). Thus, a rational approach for treating cancer is the modulation of apoptosis pathway by targeting components of the apoptotic mechanism and its regulators in order to reestablish the apoptotic function (Nicholson, 2000; Call *et al.*, 2008; Indran *et al.*, 2011).

Plants synthesize a wide variety of biologically active compounds and for that reason there is a growing interest in their use as a source of new anticancer drugs (Lee *et al.*, 2011). Cucurbitacins, for instance, are a group of diverse tetracyclic triterpenoid molecules, predominantly found in different species of the Cucurbitaceae family that are highly bitter and toxic. Their structural configuration comprises tetracyclic cucurbitane nucleus skeleton, with a variety of oxygenation functionalities at different positions (Chen *et al.*, 2005). Plants containing cucurbitacins have been used for centuries with ethnomedical purposes (Lee *et al.*, 2010) and several compounds of this group have shown antitumor, anti-inflammatory and hepatoprotective effects (Jayaprakasam *et al.*, 2003; Rios *et al.*, 2012). They have also shown strong activity against tumor expansion (Sun *et al.*, 2010; Yasuda *et al.*, 2010) as demonstrated for cucurbitacins B, D, E and I that inhibited the growth of several cancer cell lines in *in vitro* and *in vivo* models (Su *et al.*, 2008; Wakimoto *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Yasuda *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2011; Ishdorj *et al.*, 2011).

Recently, novel cucurbitacins obtained from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Cucurbitaceae) have been described (Lang *et al.*, 2011) as well as some semi-synthetic derivatives (Lang *et al.*, 2012) that exhibited promising cytotoxic activity against different human cancer cell lines. The present study examined the impact of one of these new cucurbitacins (2 β , 16 α , 2R-trihydroxy-10 α , 17 α -cucurbit-5, 25-dien-3, 11, 22-trione, Cuc 1) (Fig. 1) on non-small-cell lung cancer (A549 cells), including the evaluation of its effects on cell growth, cell cycle distribution, apoptosis, morphological changes and expression of regulatory proteins involved in such processes.

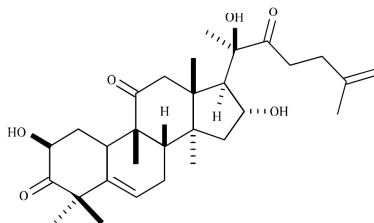


Fig. 1: Structure of a novel cucurbitacin (Cuc 1) isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of Cuc 1: Roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. were purchased from Lohmann Company Ltd. and authenticated by Prof. Dr. Sergio A.L. Bordignon (Unilassale, Canoas, RS, Brazil). Dried and powdered roots (1.5 kg) were extracted with dichloromethane (DCM) at room temperature for 72 h. The DCM extract (9 g) was subjected to vacuum liquid column chromatography on silica gel using hexane with increasing amounts of ethyl acetate (20-100%) to afford eight fractions (F1 to F8). The fractions F3 and F4 (500 mg) were combined and subjected to column chromatography using silica gel as adsorbent and hexane/ethyl acetate 40% as mobile phase providing Cuc 1 (10 mg) which was identified by spectroscopic methods as described previously (Lang *et al.*, 2011).

Cell line: The human non-small-cell lung cancer (A549 cells) was kindly provided by Dr. Rosina Gironès from Microbiology Department of University of Barcelona, Spain. A549 cells (ATCC-CCL185) were grown in Minimal Essential Medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U mL⁻¹ penicillin G and 100 µg mL⁻¹ streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Cell viability assay: The effect of Cuc 1 treatment on the viability of A549 cells was determined by MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma, MO, USA) based on the ability of live cells to cleave the tetrazolium ring to a molecule that absorb at 540 nm (Mosmann, 1983). Briefly, cells were plated in 96-well culture plates (1·10⁴ cells/well). After 24 h, seeding cells were treated with different concentrations of Cuc 1. After 48 and 72 h of treatment at 37°C, the medium was replaced by 50 µL of MTT reagent (1 mg mL⁻¹) and cells were further incubated at 37°C for 4 h. The MTT solution was removed, 100 µL of dimethyl sulfoxide was added to each well, followed by reading on a scanning multiwell spectrophotometer (Infinite 1200 TECAN, Grödje, Austria). The 50% inhibition concentration (IC₅₀) was defined as the concentration that inhibited cell proliferation by 50% when compared to untreated controls (=untreated cells). Paclitaxel (Sigma, MO, USA) (at 0 to 10 µM) was used as positive control. Final solvent concentration showed no interference with cell growth.

Cell cycle analysis by flow cytometry: A549 cells (5×10⁵/six-well) were treated with Cuc 1 for 24 h and harvested by 0.25% trypsin. Then cells were washed twice with Phosphate-buffered Saline (PBS), centrifuged at 500x g for 5 min, fixed in 70% ethanol at -4°C. After fixation, the cells were treated with 50 µg mL⁻¹ RNase and stained with 100 µg mL⁻¹ Propidium Iodide (PI) in the dark. Flow cytometry analyses were carried out on a FACS CAnto II instrument (Becton Dickinson, USA). The population of cells in each cell-cycle phase was determined using FlowJo 8.6.3 software (Tree Star, Inc., Ashland, USA).

Apoptosis analysis by flow cytometry: Phosphatidylserine (PS) exposed on the outside of apoptotic cells was detected by Annexin V-FITC and PI double-staining by using a detection kit purchased from Sigma (MO, USA). Briefly, adherent A549 cells (5×10⁵/six-well) were treated with Cuc 1 for 12 h. Cells were harvested and rinsed twice with PBS (pH 7.4) followed by Annexin V-FITC and PI labeling according to the manufacturer's instructions. The stained apoptotic cells were analyzed by flow cytometer (FACS CAnto II, Becton Dickinson, USA).

Cytoskeletal and nuclei staining: F-actin detection was performed on A549 cells grown on coverslips placed into a six-well plate. Cells were treated with Cuc 1 for 12 h and fixed by 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature, washed in PBS and permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100 for 30 min at RT. After three-times washing, cells were incubated with TRITC-labeled-phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) for 40 min in the dark. Preparations were washed and stained with Hoechst (Invitrogen, Carlsbad, USA) for 5 min to detect nuclei, washed and finally mounted in mounting medium (80% glycerol in PBS). Confocal images were collected on a Leica DMI6000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Caspase assay: Caspases -3, -8 and -9 protease activity was determined by using commercially available kits (Millipore, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The tests are based on the spectrophotometric detection of the chromophore p-nitroaniline (pNA) after cleavage from the caspase substrate (a caspase-specific peptide conjugated to pNA). Briefly, adherent A549 cells (5×10^6 /six-well) were treated with Cuc 1 for 12 h and harvested by 0.25% trypsin. The cells were resuspended in 50 μ L of chilled cell lysis buffer, centrifuged for 1 min ($10,000 \times g$) and then the supernatants were transferred (cytosolic extract) to a fresh tube and put on ice for immediate assay. The cell lysates were tested for protease activity by the addition of a labelled caspase substrate (DEVD-pNA for caspase-3 activity, IETD-pNA for caspase-8 activity and LEHD-pNA for caspase-9) and incubated at 37°C for 2 h. pNA absorbance was quantified using a spectrophotometer (Infinite 1200 TECAN, Grödje, Austria) at a wavelength of 405 nm. Fold-increase in caspase-activity can be determined by comparing the OD reading from the induced apoptotic sample with the level of the uninduced control.

Western blotting analysis: Adherent A549 cells (1×10^6 /six-well) were treated with Cuc 1 for 12, 24 or 48 h. To evaluate the influence of Cuc 1 on Akt-, MAPKs- and NF κ B- signaling pathways, TNF α stimulation (30 ng mL⁻¹, 20 min) was used as a pathway inducer. Whole cell lysates were harvested after lysis with RIPA buffer containing proteases and phosphatases inhibitors and then centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C. The supernatants were collected and the protein concentrations were determined using the Bradford assay. Equivalent amounts of protein were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by electrotransfer to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). After blocking, membranes were incubated overnight with appropriate primary antibodies. After incubation with the corresponding secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, protein bands were revealed by using Pierce ECL substrate (Thermo Scientific, MA, USA), according to the manufacturer's protocol.

Cytosolic fraction was prepared for detecting cytochrome *c* release. For this, treated and untreated A549 cells were washed twice with cold PBS and lysed with 200 μ L of extraction buffer, containing proteases inhibitors, for 10 min on ice. Next, cells were homogenized by 10 passages through a 26-gauge needle. Homogenates were centrifuged at $1,000 \times g$ for 5 min to remove unbroken cells and nuclei. The supernatant fraction was centrifuged at $12,000 \times g$ for 30 min at 4°C. The resulting supernatant containing the cytosolic fraction was collected and the protein concentrations were determined using the Bradford assay. Then equivalent amounts of protein were analyzed by Western/ECL analyses as described above. Protein bands were quantified using the Advanced Image Data Analyzer Software (AIDA, Raytest, GmbH, Straubenhardt, Germany). The total band densities were measured against the local background. Results were presented as normalized fold changes in relation to control.

The antibodies against cleaved caspase-3, Akt, phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7), phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), phospho-NF κ B p65 (Ser536)(93H1) and NF κ B p65 were all purchased from Cell Signaling Technology, MA, USA. The phospho-STAT3 and Bcl-2 antibodies were obtained from Millipore, MA, USA whereas anti-cytochrome *c* and anti-JNK/SAPK (pT183/pY185) were purchased from Becton Dickinson, NJ, USA. The anti-p38 α , I κ B α and JNK 1/3 were obtained from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA and the phospho-Akt/PKB [pS473] antibody was acquired from Invitrogen, CA, USA. Antibodies against β -actin (Millipore, MA, USA) and α -tubulin (Sigma-Aldrich, MO, USA) served as controls for equal loading.

Statistical analysis: The results were expressed as the Mean \pm SD of three independent experiments, unless otherwise stated. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). Calculations were performed with GraphPad Prism software 5.1 version (GraphPad, USA).

RESULTS

Cuc 1 inhibits A549 cells growth *in vitro*: To evaluate the cytotoxicity of Cuc 1 on human non-small lung cancer cells, A549 cells were initially treated with different concentrations of Cuc 1 at different time points and cellular proliferation was evaluated using the MTT assay. Treatment with this compound inhibited cellular proliferation in a concentration and time-dependent manner (Fig. 2). Their IC₆₀ values were 13.5 \pm 1.8 and 3.8 \pm 0.4 μ M for 48 and 72 h, respectively.

Cuc 1 induces cell cycle arrest at G2/M phase: Most anticancer agents exhibit their effects on tumor cell growth by inducing cell cycle arrest and apoptosis. To gain insights into the mechanism by which cell proliferation is reduced, the effects of Cuc 1 on distribution of cell cycle phases in a cell population was investigated by Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) analysis (Fig. 3a). The untreated control cells showed a typical distribution in G0/G1, G2/M and S phase, but a 24 h exposure of A549 cells to 15 and 30 μ M of Cuc 1 caused a significant enrichment of cells in G2/M phase in a concentration-dependent manner. An increase from 17.06-32.42 and 37.72% cells in G2/M phase was detected after the treatment with 15 and 30 μ M of Cuc 1, respectively

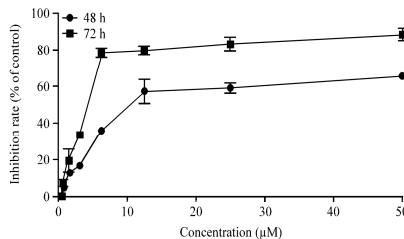


Fig. 2: Cell growth inhibition by Cuc 1. Human non-small cell lung cancer cells (A549 cells) were treated with different concentrations of the Cuc 1 for 48 and 72 h. The growth inhibition effects were determined by MTT assay and the IC₆₀ was calculated by Graph Pad Prism 5.1. Values were averaged expressed as a percentage relative to the untreated controls. Values indicate the Mean \pm SD in triplicate tests

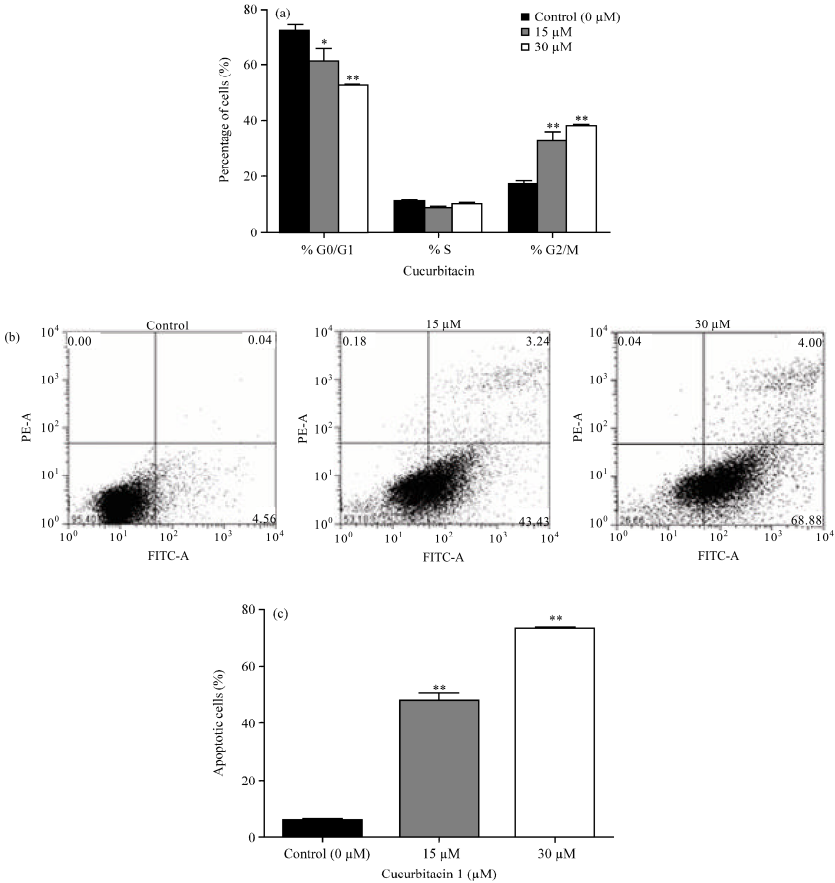


Fig. 3(a-c): Effects of Cuc 1 on cell cycle distribution and apoptosis of A549 cells. (a) A549 cells (5×10^5) were treated with 15 and 30 μM and analyzed after 24 h by DNA flow cytometry. The values indicate the percentage of A549 cells in the indicated phases of the cell cycle (G0/G1, S and G2/M). * $p < 0.01$ and ** $p < 0.0001$ as compared with control, (b) The cells were treated with 15 and 30 μM for 12 h, stained with Annexin V/PI and submitted to flow cytometry for the analysis of apoptotic cells proportion. The horizontal (FITC-A) and the vertical (PE-A) axes represent labeling with Annexin V and PI staining assay. ** $p < 0.0001$ as compared with control. The values represented means of three independent experiments and SD. The most representative results of three independent experiments are shown here

($p < 0.0001$ vs. control). This was followed by a reduction in G0/G1 phase cells (72.14% cells in the controls, decreasing to 61.77 and 52.48% cells after the treatment with 15 and 30 μM of Cuc 1, respectively). These results indicated that the compound induces in vitro growth inhibition of A549 cells by causing G2/M cell cycle arrest.

Cuc 1 induces apoptosis: As the treatment of A549 cells with Cuc 1 inhibited the cell growth it was further analyzed whether this effect might be related to apoptosis induction. One of the earliest events of apoptosis is the loss of plasma membrane polarity accompanied by translocation of Phosphatidylserine (PS) from the inner to outer membrane leaflets, thereby exposing PS to the external environment. The phospholipids-binding protein Annexin V has a high affinity to PS thereby labeling cells with externally exposed PS which correlates with loss of membrane polarity during apoptosis, but precedes the complete loss of membrane integrity that accompanies later stages of cell death resulting either in apoptosis or necrosis (Van Genderen *et al.*, 2006). In contrast, PI can only enter into cells after complete loss of membrane integrity. Thus, dual staining with Annexin V and PI allows clear discrimination between healthy cells (low FITC fluorescence and low PI fluorescence, LL), early apoptotic cells (high FITC fluorescence and low PI fluorescence, LR), late apoptotic cells (high FITC fluorescence and high PI fluorescence, UR) and necrotic cells (low FITC fluorescence and high PI fluorescence, UL). A 12 h exposure of A549 cells to 15 and 30 μM of Cuc 1 increased the percentage of apoptotic cells from 5.18% (LR+UR) in the controls to 47.96 and 73.82% in treated cells, respectively ($p < 0.0001$ vs. control) (Fig. 3b and c). Thus, treatment of A549 cells with Cuc 1 induces apoptosis.

Cuc 1 alters cell morphology and actin organization: Under light microscopy, A549 cells showed drastic alterations in their overall morphology after exposure to Cuc 1 including reduced cytoplasmatic volume and cell rounding (data not shown). Some of these morphological changes could be explained by the disruption of actin cytoskeleton homeostasis by cucurbitacins, as it has been previously described (Tannin-Spitz *et al.*, 2007; Wakimoto *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Therefore, the effects of Cuc 1 treatment on the cytoskeletal network were assessed. For this purpose, untreated and treated A549 cells were stained with TRITC-labeled-phalloidin which binds selectively to F-actin. As shown in Fig. 4a, the untreated cells did not show a prominent polymerized, filamentous actin. However, 12 h exposure to 15 and 30 μM of Cuc 1 induced accumulation of F-actin into globular aggregates in the cytoplasm near to the nuclei as it was demonstrated by the intense fluorescent accumulation of rhodamine-phalloidin staining (Fig. 4b and c). In addition, when cell nuclei were visualized with Hoechst staining, further morphological alterations in Cuc 1 treated A549 cells were observed such as chromatin condensation, nuclear fragmentation and appearance of multinucleated cells. These observations further underline the potential of Cuc 1 to induce cell death by apoptosis.

Cuc 1 induces apoptosis via activated caspases-dependent pathway: Caspases are well known executors of the apoptotic process through their ability to cleave several cellular substrates. To evaluate the effects of Cuc 1 on the activation of the caspase-3, -8 and -9 in A549 cells, the cytosolic extracts of treated or untreated control cells were incubated with different caspase-specific substrates. As shown in Fig. 5, Cuc 1 caused a significant increase in the proteolytic activity of caspases -3 and -9 after 12 h of treatment with the higher concentration (30 μM) compared to untreated control cells. Thus the morphological apoptosis induction observed correlates well with caspase activation.

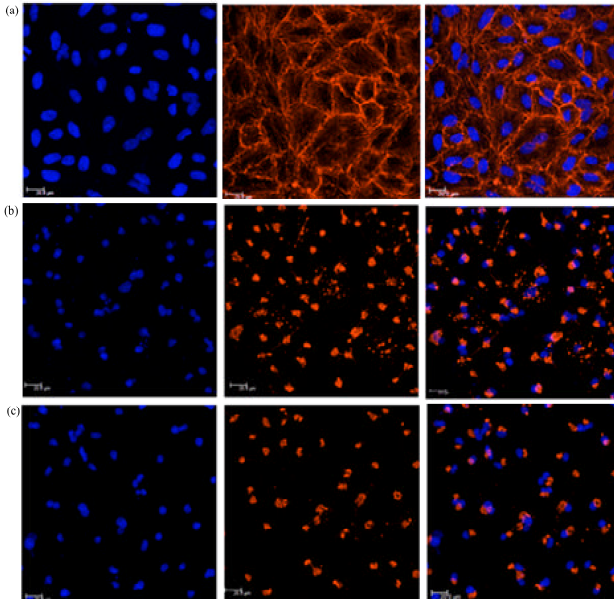


Fig. 4(a-c): Effects of Cuc 1 on F-actin organization and nuclear fragmentation by confocal microscopic analysis. A549 cells were either untreated (a) or treated with 15 μM (b) and 30 μM (c) of Cuc 1 for 12 h, fixed and stained with Hoechst (left panels) and TRITC-labeled-phalloidin (middle panels). Overlay images are shown on the right side

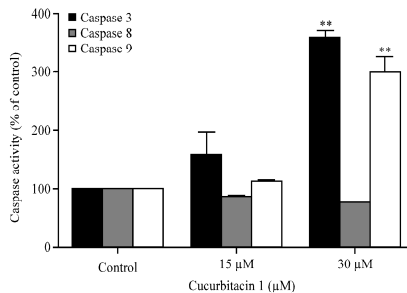


Fig. 5: Activation of various caspases in A549 cells treated with Cuc 1. A549 cells were incubated with 15 and 30 μM for 12 h. Cytosolic fraction of cells was analyzed for changes in the activity of caspase-3, caspase-8 and caspase-9. The data represent Means \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.0001$ as compared with control

Cuc 1 suppresses STAT3 activation: Persistent STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) activation in cancer cells seems to confer their normal physiological function in controlling cell growth, survival, angiogenesis and immune responses. Conversely, the blockage of STAT3 signaling pathway in cancer cells has been shown to induce apoptosis, inhibit cell proliferation, suppress angiogenesis and stimulate immune responses and for these reasons the STAT proteins are emerging as ideal targets for cancer therapy (Yu and Jove, 2004). Previous studies have shown that cucurbitacins suppress tumor growth and induce apoptosis in A549 cells by inhibiting STAT3 signaling (Sun *et al.*, 2005). To determine the relationship between the cytotoxic activity of Cuc 1 and STAT3 phosphorylation, the p-STAT3 expression in A549 cells treated with Cuc 1 was investigated by Western blotting analysis. It was shown that 30 μM of Cuc 1 reduced the STAT3 phosphorylation almost completely after 12 h of treatment compared to the untreated control cells (Fig. 6a).

Cuc 1 alters the expression of apoptosis-related proteins: In order to confirm the ability of Cuc 1 to activate caspase-3, as previously demonstrated by the cleavage of a caspase-3-specific substrate, the accumulation of the active cleaved form in A549 cells was investigated by Western blotting analysis. As shown in Fig. 6b, the treatment of A549 cells with both concentrations of Cuc 1 for 12 h increased the amount of active caspase-3 compared to untreated control cells. The active caspase-3 proteolytically cleaves and activates other caspases, as well as relevant targets in the apoptotic cells. Taken together, these results confirm the involvement of this enzyme in the mechanism of cell death mediated by Cuc 1.

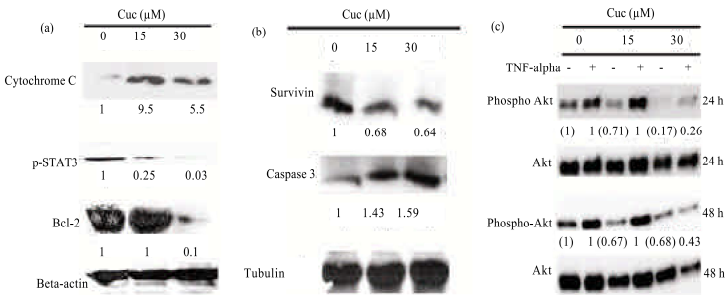


Fig. 6: Expression of apoptosis-related proteins and down-regulation of the Akt signaling pathway in unstimulated (TNF α -) and stimulated (TNF α +) A549 cells. (a and b) Western blotting analysis of cytochrome C, p-STAT3, Bcl-2, caspase 3 (cleaved form) and survivin in A549 cells untreated (lane 1) or treated with 15 μM (lane 2) and 30 μM (lane 3) of Cuc 1 for 12 h. β -actin or α -tubulin was used as the loading control. (c) Western blotting analysis of phospho-Akt in A549 cells untreated (lanes 1 and 2) or treated with 15 μM (lanes 3 and 4) and 30 μM (lanes 5 and 6) of Cuc 1 for 24 and 48 h. Total amount of Akt was used as the loading control. Data were representative of three independent experiments

Cytochrome c release is one of the limiting factors in caspase-9 activation and represents a coordinating control step in the apoptotic process. Since Cuc 1 induced caspase-9 activity (Fig. 5), its ability to trigger cytochrome c release in A549 cells was analyzed. Indeed, after 12 h of treatment with Cuc 1, release of mitochondrial cytochrome c into the cytosol of A549 cells was detected (Fig. 6a). In addition, the treatment with 30 μM of Cuc 1 reduced the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in A549 cells (Fig. 6a).

Akt, also known as Protein Kinase B (PKB), is a key player in regulating cellular growth and survival. In the past decade the role of Akt in cancer has increased enormously and it is now evident that activation of Akt is one of the most common molecular alterations in human malignancy. Therefore, Akt has become an increasingly important target of drug development efforts and several inhibitors are now entering clinical trials (Altomare and Testa, 2005; Radisavljevic, 2008). It has been known that disruption of actin cytoskeleton network reduces Akt signaling, leading to a reduced expression of anti-apoptotic proteins such as survivin which ends up in both G2/M arrest and apoptosis (Mosmann, 1983; Liang *et al.*, 2003). Since cell transition to a round shape morphology and disorganization of actin filamentous was observed after Cuc 1 treatment (Fig. 4), the activation state or expression of Akt and survivin was analyzed. Indeed, Cuc 1 treatment for 24 and 48 h caused a significant reduction in Akt activation detected by its phosphorylation on Ser273 in both pre-activated (stimulated) and unstimulated cells, whereas the total amount of Akt remained unaffected (Fig. 6b). In addition, a 24 h treatment with Cuc 1 also led to a reduced survivin expression (Fig. 6c). However, when analyzing the activation state of proteins of other signaling pathways such as ERK, p38, JNK, p65 as well as the degradation of I κ B α , no significant changes were observed after treatment with Cuc 1 (data not shown). Taken together, these data demonstrate that Cuc 1 induces apoptosis in A549 cells via a reduced activation of Akt signaling pathway.

DISCUSSION

Natural products provide a rich source of chemopreventive and chemotherapeutic agents (Shukla and Singh, 2011). Cucurbitacins refer to a group of tetracyclic triterpenoids initially identified in the plant family of Cucurbitaceae. In traditional medicine cucurbitacin-containing plants have been used against skin affections, as purgative and emetic and to treat inflammatory conditions (Lewis and Elvin-Lewis, 1977).

This study evaluated a new cytotoxic cucurbitacin named Cuc 1 (Fig. 1), isolated for the first time by Lang *et al.* (2011) from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. roots. Therefore, the antiproliferative effects of Cuc 1 on human non-small-cell lung cancer cells (A549 cells) as well as the molecular mechanism of its cytotoxic properties were investigated.

MTT analysis showed significant inhibition of A549 cells viability *in vitro* in a concentration and time-dependent manner (Fig. 2). Cuc 1 treatment inhibited cell growth showing IC₅₀ values of 13.5 \pm 1.8 and 3.8 \pm 0.4 μM for 48 and 72 h, respectively. In addition, this compound showed higher selectivity towards A549 cells, when compared to healthy cells (human gingival fibroblasts) presenting an IC₅₀ value of 132.95 \pm 24.11 μM after 48 h exposure to these cells (data not shown). It is well known that most anticancer agents exhibit their inhibitory effects on tumor cell growth by inducing cell cycle arrest and apoptosis. In order to better characterize the mechanism underlying the observed inhibitory activity of Cuc 1 on A549 cells, a set of experiments on cell cycle distribution and apoptosis detection by flow cytometry was performed. Here A549 cells treated with Cuc 1 were arrested at the G2/M phase of cell cycle with decreased cell population in G0/G1

(Fig. 3a), suggesting that this new compound inhibits cell growth via blocking the division cell cycle at the G2/M phase. The results of the present study are in agreement with recent reports which have demonstrated that this group of natural compounds induces G2/M arrest and apoptosis in other human cancer cell lines *in vitro* (Tannin-Spitz *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Yasuda *et al.*, 2010).

Phosphatidylserine externalization is a hallmark of early steps in apoptosis. As Cuc 1 was shown to induce cell death it was further analyzed whether this special event is induced upon Cuc 1 treatment. By flow cytometry analysis with Annexin V/PI staining was confirmed that it induced apoptosis in a concentration-dependent manner (Fig. 3b and 3c).

Confocal microscopy analyses with rhodamine-phalloidin and Hoechst fluorescent staining revealed that Cuc 1 exposure led to the development of morphologically altered and multinucleated A549 cells at both tested concentrations (Fig. 4). These morphological changes are typical for apoptosis. One of the most obvious morphological effects of Cuc 1 on A549 cells was the disruption of F-actin cytoskeleton as showed by the altered appearance of rhodamine-phalloidin stainable material. This is in complete consistence with the current knowledge of cucurbitacins. Some scholars have reported that cucurbitacins can directly modulate the actin cytoskeleton. Duncan *et al.* (1996) demonstrated that cucurbitacin E acts as a potent disruptor of cytoskeletal integrity by increasing the filamentous or polymerized actin fraction in prostate carcinoma cells. Other studies carried out with cucurbitacin B also showed the aggregation of F-actin in various human cancer cell lines (Haritunians *et al.*, 2008; Wakimoto *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008).

Multinucleation is a consistently reported morphological alteration in cancer cell cultures that are treated with cucurbitacins (Siqueira *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). The final step in cell division, in which the cytoplasm is divided to form two daughter cells, is known as cytokinesis. Since cytokinesis involves the assembly and disassembly of actin filaments, compounds that interfere with actin polymerization or its spatial organization will block this process and generate multinucleated cells by uncoupling nuclear and cytoplasmic division. Therefore, molecules acting on the actin cytoskeleton of tumor cells and thus inhibiting cell division and cell proliferation, may be of high therapeutic value. Currently, growing evidence indicates that cytoskeletal components are involved in the apoptotic cascade thereby regulating cell survival (Cabado *et al.*, 2004). In a previous study, it was found that cytochalasin B which causes cytoskeletal disruption, also inhibited cell proliferation, leading to arrest in G2/M phase and finally apoptosis induction (Liang *et al.*, 2003). These effects are similar to those observed in this study for Cuc 1. Thus, one can propose that the observed effects are mediated, at least partially, by a modification of the cytoskeleton network causing changes in cell morphology, leading to reduction of Akt phosphorylation, G2/M arrest and apoptosis induction.

In the regulation of apoptosis, several caspases play important roles (Hengartner, 2000). They are organized into initiator or effector caspases, due to the role they play in apoptosis induction. It is important to state that activation of caspases is a hallmark of promoting apoptosis in response to death inducing signals originated mainly from cell surface receptors or mitochondria. It has also been shown that caspase-3 activation, the major effector caspase, requires the activation of initiator caspases such as caspase-8 or -9 in response to the different pro-apoptotic signals (Budihardjo *et al.*, 1999). Herein, the activation of the effector caspases-3 was observed in response to the initiator caspase-9 in A549 cells treated with Cuc 1. This suggests that the intrinsic pathway might be involved in apoptosis induced by this novel compound.

Signal transducer and activator of transcription protein 3 (STAT3) is a latent cytosolic transcription factor that transfers signals from the cell membrane directly to the nucleus. STAT3 is constitutively activated in multiple human cancers including ovarian, breast, prostate and lung cancer. It plays a key transcriptional role in cancer cell progression, differentiation and survival by up-regulating several genes, including those that encode for anti-apoptotic proteins and some cell cycle regulators (Yu and Jove, 2004; Fletcher *et al.*, 2009). Thus, since most of the chemotherapeutic strategies aim to initiate apoptosis, it is now generally accepted that STAT3 represents a valid target for novel anticancer drug design (Al Zaid Siddiquee and Turkson, 2008). Although initial interest in cucurbitacins as potential anticancer drugs declined for decades, recent discoveries showing that they are strong STAT3 inhibitors have regained the attention of the pharmaceutical industry one more time. Several studies have suggested that cucurbitacins exert inhibitory effects against many human cancer cell lines via suppression of STAT3 phosphorylation (Sun *et al.*, 2005; Thoennissen *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). In this study, the evaluation of the phosphorylation state of STAT3 in A549 cells by using Western blotting analysis demonstrated the anti-STAT3 activity of Cuc 1 (15 and 30 μM), as shown in Fig. 6a. These findings suggest that the inhibition of STAT3 phosphorylation may be associated to the induction of apoptosis by Cuc 1.

To determine the expression changes of STAT3 target genes involved in cell apoptosis, the expression of Bcl-2 was analyzed showing that Cuc 1 treatment decreased Bcl-2 expression in a concentration-dependent manner (Fig. 6a).

The Bcl-2 family members also play a critical role in the regulation of apoptosis, comprising both pro-apoptotic molecules (Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik) and anti-apoptotic molecules (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1). These molecules control the release of mitochondrial cytochrome *c* by modulating the permeability of the outer mitochondrial membrane (Lessene *et al.*, 2008). Herein, Cuc 1 treatment induced cytochrome *c* release from mitochondria to the cytosol (Fig. 6a) and it is well known that cytochrome *c* release is necessary for the activation of caspase-9 that initiates the caspases cascade. These results also suggest that the mitochondrial pathway plays an important role in the apoptosis of A549 cells induced by Cuc 1. In addition, activated Akt is a well-established survival factor exerting anti-apoptotic activity, in part by preventing the release of cytochrome *c* from the mitochondria and inactivating pro-apoptotic factors such as Bad and procaspase-9 by phosphorylating them (Cardone *et al.*, 1998; Altomare and Testa, 2005). Indeed, after the treatment with Cuc 1, Akt phosphorylation was down regulated in A549 cells indicating an inhibition of this signaling pathway by Cuc 1 (Fig. 6c). This effect might contribute to apoptosis induction.

CONCLUSION

In conclusion, it can be postulated that Cuc 1 induces apoptosis in A549 cells. This is mediated by G2/M phase cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption. Furthermore, Cuc 1 inhibits the activation of STAT-3 and Akt signaling pathways to down-regulate the expression of Bcl-2. This prompts cytochrome *c* to be released from the mitochondria to the cytosol which is an essential step for caspases -9 and -3 activation. Therefore, Cuc 1 can be taken to mean a new potent compound with a high anticancer potential due to its cytotoxic and apoptosis inducing effects on malignant lung cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support received from Brazilian funding agencies: CNPq/MCTI (grant number 472979/2011-6) and PRONEX/FAPESC (grant number 2671/2012-9) as well as the first one for their research fellowships. The study sponsors had no involvement in the design, collection, analysis and interpretation of the data and the decision to submit the manuscript for publication in International Journal of Cancer Research. We also would like to thank Rafael Matielo, Jadel Kratz and Annelise de Carvalho for their proficient editorial assistance.

REFERENCES

- Al Zaid Siddiquee, K. and J. Turkson, 2008. Stat3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res.*, 18: 254-267.
- Altomare, D.A. and J.R. Testa, 2005. Perturbations of the akt signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, 24: 7455-7464.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo and X. Wang, 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15: 269-290.
- Cabado, A.G., F. Leira, M.R. Vieytes, J.M. Vieites and L.M. Botana, 2004. Cytoskeletal disruption is the key factor that triggers apoptosis in okadaic acid-treated neuroblastoma cells. *Arch. Toxicol.*, 78: 74-85.
- Call, J.A., S.G. Eckhardt and D.R. Camidge, 2008. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol.*, 9: 1002-1011.
- Cardone, M.H., N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen and T.F. Franke *et al.*, 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282: 1318-1321.
- Chan, K.T., K. Li, S.L. Liu, K.H. Chu, M. Toh and W.D. Xie, 2010. Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer Lett.*, 289: 46-52.
- Chen, J.C., M.H. Chiu, R.L. Nie, G.A. Cordell and S.X. Qiu, 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: Structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.*, 22: 386-399.
- Chen, W., A. Leiter, D. Yin, M. Meiring, V.J. Louw and H.P. Koeffler, 2010. Cucurbitacin B inhibits growth, arrests the cell cycle and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.*, 37: 737-743.
- Dong, Y., B. Lu, X. Zhang, J. Zhang and L. Lai *et al.*, 2010. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis*, 31: 2097-2104.
- Duncan, K.L., M.D. Duncan, M.C. Alley and E.A. Sausville, 1996. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 52: 1553-1560.
- Fletcher, S., J.A. Drewry, V.M. Shahani, B.D.G. Page and P.T. Gunning, 2009. Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. *Biochem. Cell Biol.*, 87: 825-833.
- Han, S.W. and J. Roman, 2010. Targeting apoptotic signaling pathways in human lung cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*, 10: 566-574.
- Haritunians, T., S. Gueller, L. Zhang, R. Badr and D. Yin *et al.*, 2008. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.*, 32: 1366-1373.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776.

- Hsu, H.S., P.I. Huang, Y.L. Chang, C. Tzao and Y.W. Chen *et al.*, 2011. Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in nonsmall cell lung cancer-derived CD133-positive cells. *Cancer*, 117: 2970-2985.
- Indran, I.R., G. Tufo, S. Pervaiz and C. Brenner, 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica Biophysica Acta*, 1807: 735-745.
- Ishdorj, G., J.B. Johnston and S.B. Gibson, 2011. Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B Leukemic Cells. *BMC Cancer*, Vol. 11 10.1186/1471-2407-11-268
- Jayaprakasam, B., N.P. Seeram and M.G. Nair, 2003. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett.*, 10: 11-16.
- Kim, P.K., S.Y. Park, P.P. Koty, Y. Hua, J.D. Luketich and T.R. Billiar, 2003. Fas associating death domain protein over expression induces apoptosis in lung cancer cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 125: 1336-1342.
- Lang, K.L., I.T. Silva, L.A. Zimmermann, V.R. Machado and M.R. Teixeira *et al.*, 2012. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 20: 3016-3030.
- Lang, K.L., T. da Rosa Guimaraes, V. Rocha Machado, L.A. Zimmermann and I.T. Silva *et al.*, 2011. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Planta Medica*, 77: 1648-1651.
- Lee, D.H., G.B. Iwanski and N.H. Thoennissen, 2010. Cucurbitacin: Ancient compound shedding new light on cancer treatment. *ScientificWorldJournal*, 10: 413-418.
- Lee, K.W., A.M. Bode and Z. Dong, 2011. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat. Rev. Cancer*, 11: 211-218.
- Lessene, G., P.E. Czabotar and P.M. Colman, 2008. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7: 989-1000.
- Lewis, W.H. and M.P.F. Elvin-Lewis, 1977. *Medical Botany: Plants Affecting Man's Health*. John Wiley and Sons, New York, Pages: 515.
- Li, Y., R. Wang, E. Ma, Y. Deng, X. Wang, J. Xiao and Y. Jing, 2010. The induction of g2/m cell-cycle arrest and apoptosis by cucurbitacin e is associated with increased phosphorylation of eif2alpha in leukemia cells. *Anticancer Drugs*, 21: 389-400.
- Liang, Y.L., L.Y. Wang, H. Wu, D.Z. Ma, Z. Xu and X.L. Zha, 2003. PKB phosphorylation and survivin expression are cooperatively regulated by disruption of microfilament cytoskeleton. *Mol. Cell. Biochem.*, 254: 257-263.
- Liu, T., H. Peng, M. Zhang, Y. Deng and Z. Wu, 2010. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *Eur. J. Pharmacol.*, 641: 15-22.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
- Nicholson, D.W., 2000. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407: 810-816.
- Radisavljevic, Z., 2008. AKT as locus of fragility in robust cancer system. *J. Cell. Biochem.*, 104: 2071-2077.
- Rios, J.L., I. Andujar, J.M. Escandell, R.M. Giner and M.C. Recio, 2012. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. *Curr. Pharm. Des.*, 18: 1663-1676.

- Russo, A., M. Terrasi, V. Agnese, D. Santini and V. Bazan, 2006. Apoptosis: A relevant tool for anticancer therapy. *Ann. Oncol.*, 17: viii115-viii123.
- Sayers, T.J., 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 60: 1173-1180.
- Shukla, Y. and R. Singh, 2011. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1215: 1-8.
- Siegel, R., E. Ward, O. Brawley and A. Jemal, 2011. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J. Clin.*, 61: 212-236.
- Siqueira, J.M., A.C. Gazola, M.R. Farias, L. Volkov, N. Rivard, A.J. de Brum-Fernandes and R.M. Ribeiro-do-Valle, 2009. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both *in vitro* and *in vivo* models. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 64: 529-538.
- Su, Y., G. Li, X. Zhang, J. Gu, C. Zhang, Z. Tian and J. Zhang, 2008. Jsi-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through g(2)/m cell cycle arrest and apoptosis augment. *Cancer Biol. Ther.*, 7: 1243-1249.
- Sun, C., M. Zhang, X. Shan, X. Zhou and J. Yang *et al.*, 2010. Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 136: 603-610.
- Sun, J., M.A. Blaskovich, R. Jove, S.K. Livingston, D. Coppola and S.M. Sebti, 2005. Cucurbitacin Q: A selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene*, 24: 3236-3245.
- Tan, T.T. and E. White, 2008. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: Mechanisms for activating cell death in cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 615: 81-104.
- Tannin-Spitz, T., S. Grossman, S. Dovrat, H.E. Gottlieb and M. Bergman, 2007. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, 73: 56-67.
- Thoenissen, N.H., G.B. Iwanski, N.B. Doan, R. Okamoto and P. Lin *et al.*, 2009. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 69: 5876-5884.
- Van Genderen, H., H. Kenis, P. Lux, L. Ungeth and C. Maassen *et al.*, 2006. *In vitro* measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nat. Protoc.*, 1: 363-367.
- Wakimoto, N., D. Yin, J. O'Kelly, T. Haritunians and B. Karlan *et al.*, 2008. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.*, 99: 1793-1797.
- Yasuda, S., S. Yogosawa, Y. Izutani, Y. Nakamura, H. Watanabe and T. Sakai, 2010. Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54: 559-565.
- Yin, D., N. Wakimoto, H. Xing, D. Lu and T. Huynh *et al.*, 2008. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. *Int. J. Cancer*, 123: 1364-1375.
- Yu, H. and R. Jove, 2004. The STATs of cancer: New molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 97-105.
- Zhang, M., C. Sun, X. Shan, X. Yang, J. Li-Ling and Y. Deng, 2010. Inhibition of pancreatic cancer cell growth by cucurbitacin B through modulation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Pancreas*, 39: 923-929.

CAPITULO III:
AVALIAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA EM
CÉLULAS A549 & DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM
DERIVADO SEMISSINTÉTICO DA CUCURBITACINA B
(DeCUCB83), EM UM MODELO MURINO DE TUMOR DE
PULMÃO.

1. APRESENTAÇÃO

Neste Capítulo estão expostos, na forma de um manuscrito a ser submetido para avaliação ao periódico *Cancer Research*, os resultados referentes à avaliação do mecanismo da ação citotóxica em células A549 do composto mais citotóxico do segundo grupo avaliado, o DeCUCB83 (nº 37 do Quadro 2 desta tese), bem como à sua potencial atividade antitumoral, em um modelo murino de tumor de pulmão, os quais foram obtidos durante o período de estágio sanduíche, no Instituto de Virologia Molecular da Universidade de Münster, na Alemanha.

2. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO AO PERIÓDICO *CANCER RESEARCH*.

***In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B**

Izabella T. Silva¹, Annelise Carvalho¹, Karen L. Lang², Sabine E. Dudek³, Fernando J. Durán⁴, Miguel S. B. Caro², Ulf R.Rapp⁵, Viktor Wixler³, Eloir P. Schenkel¹, Cláudia M. O. Simões¹ and Stephan Ludwig^{3,*}

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

² Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³ Institute of Molecular Virology (IMV), Center of Molecular Biology of Inflammation (ZMBE), University of Muenster, D-48149 Muenster, Germany

⁴ UMYMFOR – Department of Organic Chemistry, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

⁵ Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Parkstr. 1, 61231 Bad Nauheim, Germany

***Corresponding author:** Stephan Ludwig. Mailing address: Institute of Molecular Virology, Center of Molecular Biology of Inflammation (ZMBE), University of Muenster, Von-Esmarch-Str. 56, D-48149 Muenster, Germany. Phone: +49 251 83 57791. Fax: +49 251 83 57793. E-mail: ludwigs@uni-muenster.de.

1. Introduction

Lung cancer is the most deadly type of cancer in human beings causing approximately 1.38 million deaths every year worldwide (1). Only in the United States, the American Cancer Society estimates about 228,190 new cases and 159,480 deaths in 2013 accounting for about 27% of all cancer deaths (2). The most common form of lung cancer is the non-small-cell lung cancer (NSCLC), and the adenocarcinoma is the most prevalent histology present in 50% of all NSCLCs (3). There is an unquestionable urge to study new and effective drug treatments in order to develop novel therapeutical strategies for the management of this cancer.

Many anti-cancer agents induce cytotoxicity against susceptible cancer cells by promoting the apoptotic process, (4) which is a sort of programmed cell death that can play a crucial role in the control of the growth of tumor cells (5). Several promising targets for intervention in cancer therapy have been identified by studying the molecular abnormalities that underlie tumorigenesis, such as the signal transduction pathways that regulate apoptosis. One of these targets is the epidermal growth factor receptor (EGFR), which is a member of ErbB family with signal-transducing tyrosine kinase activity, located in or at the cell membrane (6, 7). The epidermal growth factor binds to its receptors, triggering an extensive network of signal transduction pathways that include activation of the PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK and JAK/STAT signaling pathways. These pathways frequently lead to stimulation or inhibition of transcription factors that regulate expression of both pro- and anti-apoptotic genes effectively disturbing the apoptotic machinery (7, 8). The EGFR has been implicated in regulating growth and survival of NSCLC, with an overexpression occurring in 45 to 70% of the cases that is also accompanied by a constitutive activation of the major downstream EGFR effector proteins, such as PI3K (9), AKT (10), ERK(11) and STAT3(12), contributing to NSCLCs cell death resistance.

Natural products and herbs have been traditionally used very early and world-wide for preventing and treating several diseases, including cancer in the long history of medicine (13). Also currently several studies have defined the role of natural products as an important source of chemotherapeutic drugs (14, 15). In addition, it has been shown that approximately 59% of the commercially available

anticancer drugs were directly or indirectly originated from natural products (16).

In this perspective, the cucurbitacins and their derivatives have become a focus of research because of their strong capability to inhibit several types of cancers (17-21). Cucurbitacins are a group of diverse highly oxygenated triterpenoid molecules predominantly found in different species of the Cucurbitaceae family. They are derived from cucurbitane skeleton [19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ene], which is known for some biological activities, including anti-inflammatory, antipyretic, analgesic and hepatoprotective actions (17, 22), but the most relevant effects of these molecules are, without a doubt, their cytotoxic effects toward a huge number of human cancer cell lines such as breast (23-25), lung (26-29), prostate (30, 31), human colon (32).

Recently, we have described novel cytotoxic cucurbitacins isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Cucurbitaceae) (28) and the molecular mechanism leading to apoptosis of non-small-cell lung cancer (A549 cells) by the most active of them (33). We also have described new semisynthetic derivatives of cucurbitacin B that are highly cytotoxic against A549 cells (29). In the present study, we elucidated the *in vitro* mechanism of cell death induced by a new semisynthetic derivative of cucurbitacin B (named here as DeCUCB83) on A549 cells, including the evaluation of its effects on cell growth, cell cycle distribution, apoptosis, morphological changes and expression of regulatory proteins as well as signaling pathways involved in such processes. Besides, this potent derivative was *in vivo* evaluated in a transgenic mouse lung cancer model expressing a mutated and constitutively active c-RAF kinase (c-RAF-1-BxB) under the control of the human surfactant protein C (SP-C) promoter in type II alveolar pneumocytes (34).

2. Material and Methods

2.1 Semisynthesis of DeCUCB83

The natural precursor cucurbitacin B (200 mg, 0.358 mmol) was firstly converted in a tosylated intermediate by reaction with *p*-toluenesulfonyl chloride (340 mg, 1.432 mmol) and DABCO (200 mg, 1.79 mmol) in dichloromethane (2 mL). The next step was the nucleophilic substitution of the intermediate (200 mg, 0,28 mmol) using NaN₃ (182 mg, 2,8 mmol) in DMF (2.5 mL), to afford DeCUCB83 (29) (Fig.1).

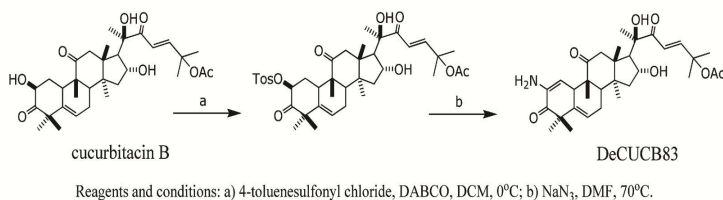


Fig.1 Scheme for preparation of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B (DeCUCB83).

2.2 Cell lines

A549 (human non-small-cell lung cancer), NIH3T3 (immortalized mouse embryo fibroblasts) and NIH3T3 sublines stably transfected with RAF or RAS oncogenes (NIH3T3/v-RAF and NIH3T3/k-RAS, respectively) (35) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and maintained at 37°C with 5% CO₂.

2.3 Transient transfections and plasmids

A549 cells were transfected with Lipofectamine 2000® (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequence encoding human EGFR, fused to cyan-fluorescent protein in p-ECFP-C1, was kindly provided by Dr. N. Zobiack (Institute for Medical Biochemistry, ZMBE, Münster, Germany). Expression constructs for a wild-type form of AKT in pCMV5 were kindly provided by Dr. Jakob Troppmair (Daniel Swarovski Research Laboratory, University of Innsbruck, Austria), and have been described before (36). Corresponding empty vectors served as controls. After 24 h incubation at 37°C with 5% CO₂, cells were treated with DeCUCB83 during 24h and analyzed by Western blotting as described below.

2.4 Cell viability assay

The cell viability was measured using MTT reduction assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma, MO, USA) (37). Briefly, the cells were plated in 96-well culture plates (1x10⁴ cells/well). After 24 h, cells were treated with different concentrations of DeCUCB83 and 48h or 72h later the medium was replaced by 50 µL of MTT reagent (1mg/mL), and the cell incubation at

37°C was continued for further 4 h. The MTT solution was removed, 100 µL of dimethyl sulfoxide was added to each well, followed by reading on a scanning multiwell spectrophotometer (Infinite 1200 TECAN, Grödje, Austria). The 50% inhibition concentration (IC₅₀) was defined as the concentration that inhibited cell proliferation by 50% when compared to untreated controls (=untreated cells). Paclitaxel (Sigma, MO, USA) (at 0 to 10 µM) was used as positive control. Final solvent concentration showed no interference with cell growth (data not shown).

2.5 Mechanism of cell death *in vitro*

2.5.1 Cell cycle and apoptosis analysis by flow cytometry

To determine cell cycle progression, A549 cells (5×10^5) were exposed to DeCUCB83 in 6-well flat-bottomed plates for 24 h. Cells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), centrifuged at 500 X *g* for 5 min, and fixed with 70% ice-cold ethanol at 4°C for 30 min. After fixation, cells were treated with 50 µg/ml RNase, and stained with 100 µg/ml propidium iodide (PI) for 30 min at room temperature in the dark. Analysis was performed immediately after staining using FACS Calibur instrument (Becton Dickinson, USA). The percentages of cells in each phase of the cell cycle (G1, S, and G2/M) were determined using the CellQuest Pro software (Becton Dickinson). Mean values and standard errors were determined for each phase.

Apoptotic populations of vehicle- or 12 h DeCUCB83-treated cells were quantified using the dual staining Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit (Sigma, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Subsequent analysis was performed with CellQuest Pro software (Becton Dickinson).

2.5.2 Caspase assay

Caspase-3 protease activity was determined by using a commercially available kit (Millipore, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, A549 cells (5×10^5 / six-well) were treated with DeCUCB83 for 12 h. Cells were harvested and resuspended in 150 µl of chilled cell lysis buffer, incubated on ice for 10 min and centrifuged for 5 min (10,000 X *g*). Then the supernatants were transferred (cytosolic extract) to fresh tubes and put on ice for immediate processing. The cell lysates were tested for protease activity by the addition of a labelled caspase substrate (DEVD-pNA), and incubated at

37°C for 2 h. pNA absorbance was quantified using a spectrophotometer (Infinite 1200 TECAN, Grödje, Austria) at a wavelength of 405 nm. Fold-increase in caspase-3 activity was determined as a relation of the OD reading from the sample in which apoptosis was induced to that of the uninduced control.

2.5.3 Confocal laser scanning microscopy for filamentous actin and nuclei staining

A549 cells grown on coverslips placed into six-well plates were treated with vehicle or DeCUCB83 for 12 h and then fixed in 4 % (w/v) paraformaldehyde at 37°C. Following permeabilization in 0.5% (v/v) Triton X-100, the cells were incubated with TRITC-labeled-phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, USA) for F-actin staining, and with Hoechst (Invitrogen, Carlsbad, USA) to detect nuclei. The coverslips were mounted on slides using mounting medium (80% glycerol in PBS). Confocal images were collected on a Leica DMI6000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.5.4 Western blotting analysis

After treatment, cells were lysed on ice with RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% NP40, 2 mM EDTA pH 8.0, 5 mg/mL leupeptin, 5 mg/mL aprotinin, 0.2 mM pefablock, 1 mM sodium vanadate and 5 mM benzamidine) for 30 min. Cell lysates were cleared from debris by centrifugation and protein concentrations were determined by the Bradford method. Equal amounts of total protein lysates were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). PI3K activity was monitored by detection of PI3K, PTEN, PDK1, and AKT phosphorylation, with specific anti - PI3Kinase p85[Tyr458]/p55[Tyr199] (Cell Signaling Technology, Danvers, USA), -PTEN [Ser380/Thr382/383] (Cell Signaling Technology), -PDK1[Ser241] (Cell Signaling Technology), and -AKT[Ser473] (Invitrogen) antibodies, respectively. Phosphorylated forms of ERK, STAT3 and EGFR were detected with phosphospecific ERK1/2[Thr202/Tyr204] (Cell Signaling Technology), phosphospecific STAT3[Tyr 705] (Millipore), and EGFR[Tyr 1068] (Cell Signaling Technology) antibodies, respectively. Endogenous and over-expressed EGFR or AKT were detected by an EGFR or AKT specific rabbit

antiserum, respectively (Cell Signaling Technology). Other antibodies used were: cleaved caspase-3, phospho-p38 MAPK [Thr180/Tyr182], phospho-NFκB p65[Ser536], cyclin B1, survivin and NFκB p65, all purchased from Cell Signaling Technology. The anti-JNK/SAPK [Thr183/Tyr185] was purchased from Becton Dickinson, and the anti-p38α, IκBα and JNK 1/3 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). In some of the assays, loading controls were performed with an anti-ERK2 (C-14) (Santa Cruz Biotechnology), an anti-AKT (Cell Signaling Technology), an anti-β-actin (Millipore) or an anti-α-tubulin (Sigma). After incubation with the corresponding secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, protein bands were revealed by using Pierce ECL substrate (Thermo Scientific, MA, USA), according to the manufacturer's protocol.

2.6 *In vivo* experiments

2.6.1 Animals

The antitumor activity of DeCUCB83 was evaluated in a transgenic mouse model of c-RAF induced lung adenoma (c-RAF-1-BxB mice). In these mice, the lung-targeted expression of the NH2-terminal deleted c-RAF-1-BxB oncogenic mutant was achieved by the use of a human SP-C promoter, allowing selective expression in type II epithelial cells lining the lung alveoli. Consequently, in the lungs of c-RAF-1-BxB mice, single tumor foci are detectable in the alveolar area already at the age of 8 weeks, which develop to solid tumors (34). Broods of 4 months old homozygous transgenic mice (male) were randomly assigned to the control group ($n=4$) and to the study group ($n=4$). The DeCUCB83 was administered daily by intraperitoneal injections at a dose of 1 mg/kg during 21 days. Lungs were isolated and analyzed at the end of the treatment period by immunohistochemistry, Western blotting and quantitative real-time PCR for measuring the tumor tissue, c-RAF-1-BxB expression, and c-RAF-1-BxB mRNA expression, respectively.

2.6.2 Histology and immunohistochemistry

For lung analysis, animals were euthanized and the right lungs fixed with 4 % paraformaldehyde for histological studies. The left lungs were minced and one half homogenized in RIPA buffer for protein analysis and the other half in RNAlater solution for qRT-PCR studies. Paraffin sections (4 μm) of lung specimens were deparaffinized and stained according to standard protocols with haematoxylin and eosin. For

immunohistochemistry, paraffin sections were dewaxed, rehydrated, and boiled in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) for antigen retrieval, blocked with 5% FBS and incubated with rabbit-anti-human-RAF antibodies (34) for 1 h at room temperature. A Vectastain ABC-AP Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) was used to detect the stained protein. To visualize cell nuclei, sections were counterstained with hematoxylin. Usually, 4 different sections per mouse sample and 4 mice per experimental setting were quantified. The square of the RAF-positive tumor foci were measured and taken in relation to the total evaluated randomly chosen section area. All analyses were performed in a blinded fashion.

2.6.3 Western blotting analysis

RIPA lung tissue lysates were cleared by centrifugation, the samples were analyzed by Western blotting as described in 2.5.4. The relative expression of c-RAF-1-BxB was quantified using the Advanced Image Data Analyzer Software (AIDA, Raytest, GmbH, Straubenhardt, Germany). The total band densities were measured against the local background and normalized to the density of appropriate beta-actin loading control bands. The relative values of untreated control samples were taken as unity.

2.6.4 mRNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR

Total RNA was isolated from homogenized mouse lung tissue using Trizol® reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) according to the protocol of the manufacturer. The mRNA levels were determined by TaqMan qRT-PCR using the LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Each cDNA probe was analysed in triplicate and specific signals were scored in relation to the signals of two housekeeping gene transcripts, cytochrome *c* and GAPDH. The results from different experiments were normalized to the expression of a calibrator probe, which was applied as a positive control in each experiment. An intron region of the IL-2 gene was always amplified, to ascertain that the probes were not contaminated with genomic DNA. The primers used were assigned using the Universal ProbeLibrary Assay Design Centre at www.roche-applied-science.com/sis and were: (5'-GCTACCCATGGTCTCATCGT-3' and

5'-GAAACCCCTCCGAATGCT-3' for cytochrome *c*); (5'-TCACATCCAGTTCTATGCTGGT-3' and 5'-CAAGGAAACTGGGAACATGAA-3' for IL-2); (5'-GAGGATATGCCTCCCCAGA-3' and 5'-TTTCTTCACACAGTCAGTACCA-3' for c-RAF-1-BxB); (5'-TGTCGTCGTGGATCTGAC-3' and 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3' for GAPDH). The changes in gene transcription were ascertained as differences between the transcription of the housekeeping genes and the gene of interest using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (38).

2.7 Statistical analysis

GraphPad Prism 5 Software (San Diego, CA) was used to calculate IC_{50} values and their 95% confidence intervals through a nonlinear fit-curve (log of compound concentration *versus* normalized response – variable slope). To determine differences, data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett test. P-values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1 DeCUCB83 inhibits the growth of A549 cells *in vitro*

Initially, we explored in MTT assays whether DeCUCB83 affects the proliferation of A549 cells. Results of Fig.2 show that DeCUCB83 potently inhibited cellular proliferation in a concentration and time-dependent manner. The calculated IC_{50} values for 48 h and 72 h were 0.42 μ M (equivalent to log value of 2.62) and 0.12 μ M (equivalent to log value of 2.075), respectively.

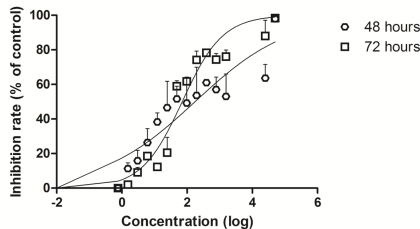


Fig.2 Cell growth inhibition effect by DeCUCB83. Human non-small cell lung cancer cells (A549 cells) were treated with different concentrations of the DeCUC83 for 48 and 72 h. The growth inhibition effects were determined by MTT assay and the IC_{50} was calculated by Graph Pad Prism 5 Software through a nonlinear fit-curve (log of compound concentration *versus* normalized response - variable slope).

3.2 DeCUCB83 leads to cell cycle arrest and increases apoptosis in A549 cells

To better understand the mechanism by which cell proliferation was suppressed by DeCUCB83, we investigated the distribution of cell cycle phases of A549 cells following treatment with DeCUCB83 by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. The ability of a compound to affect specific phases of the cell cycle may provide insights in its mechanism of action. The untreated control cells showed a typical distribution of G0/G1, G2/M and S phases, but a 24 h exposure of A549 cells to DeCUCB83 caused a significant enrichment of cells in G2/M phase in a concentration-dependent manner (Fig.3A). An increase from 10.97 ± 3.04 % to 41.92 ± 0.20 % and 46.56 ± 6.01 % cells in G2/M phase was detected after the treatment with 0.5 and 1 μ M of DeCUCB83, respectively ($p < 0.0001$ vs. control). This was followed by a reduction in G0/G1 phase cells (79.75 ± 5.58 % cells in the controls, decreasing to 46.23 ± 4.03 % and 30.88 ± 3.18 % cells after the treatment with 0.5 and 1 μ M of DeCUCB83, respectively) ($p < 0.0001$ vs. control). These results indicated that the compound inhibits the growth of A549 cells by arresting them in the G2/M cell cycle phase.

Interestingly, the FACS analysis of cell cycle distribution with propidium iodide (PI) staining showed that the treatment of A549 cells with DeCUCB83 results in a significant increase of the sub-G0/G1 peak, suggesting that DeCUCB83 might induce cell apoptosis. The percentage of G0/G1 cells heightened from 4.02 ± 0.33 % for control group to 15.90 ± 2.80 % after 24h of treatment with 1 μ M of DeCUCB83 ($p < 0.001$ vs. control). To investigate if the observed sub-G0/G1 peak was due to induction of apoptosis, the cells were double stained with PI (which intercalates in DNA of necrotic and late apoptotic cells) and Annexin V conjugated-FITC (which only binds early apoptotic cells). As it can be seen in Fig.3B, a 12 h exposure of A549 cells to 1.0 μ M of DeCUCB83 indeed increased the percentage of apoptotic cells from 6.50 ± 2.41 % in the untreated controls to 18.83 ± 4.30 % in treated cells ($p < 0.05$ vs. control). Thus, the treatment of A549 cells with DeCUCB83 not only arrests cell division but also triggers the cells into apoptosis.

3.3 DeCUCB83 induces intense cytoskeleton changes and caspase-3 activation

A prominent feature of DeCUCB83 was the induction of rapid morphological alterations of A549 cells. Appearance of plasma membrane protrusions, called blebs, were observed within minutes after DeCUCB83 treatment, which is a typical feature of apoptosis (data not shown). Since a correlation between surface bleb formation and perturbation of normal actin cytoskeletal organization has been reported (39), we analyzed whether DeCUCB83 affects the F-actin microfilament structures. As shown in Fig.3C, the untreated cells display a regularly organized actin cytoskeleton, as typical for epithelial cells, which are prominently expressed at cell-cell contacts. However, 12 h exposure to 0.5 or 1.0 μM of DeCUCB83 triggered a collapse of microfilaments, resulting in the formation of irregular and globular aggregates of F-actin in the cytoplasm near to the nuclei (Fig.3C). This observation further emphasizes the pro-apoptotic potential of the DeCUCB83. It is well known that caspases are executors of the apoptotic process through their ability to cleave several cellular substrates and that caspases themselves are also activated by proteolytic cleavage of pro-caspase forms (40). To evaluate the effects of DeCUCB83 on the activation of caspase-3 in A549 cells, the cytosolic extracts of treated or untreated control cells were incubated with a caspase-3-specific substrate. As shown in Fig.3D, a 12 h treatment of A549 cells with 1 μM of DeCUCB83 caused a significant increase in the proteolytic activity of caspase-3, when compared to untreated control cells. Thus the morphological signs of apoptosis induction correlate well with caspase-3 activation.

3.4 DeCUCB83 suppresses STAT3 activation and apoptotic-related proteins

In order to understand the mechanism involved in the DeCUCB83 action on cell cycle and apoptosis, we investigated its effect on the levels of cyclin-B1, phospho-STAT3, survivin and caspase 3 (in its cleaved form). As shown in Fig.3E, the phosphorylation of STAT3 was reduced upon treatment with 0.5 and 1.0 μM of DeCUCB83 during 12 h, when compared to untreated controls. In addition, both concentrations led to reduced survivin expression, a very well-known anti-apoptotic protein (41). Also the expression of cyclin-B1, an important cell cycle regulator (42), was reduced, especially when A549

cells were exposed to 1.0 μM of DeCUCB83. The ability of DeCUCB83 to activate caspase-3, as previously demonstrated by the cleavage of a caspase-3-specific substrate, was confirmed by Western blotting analysis, since the treatment of A549 cells with both concentrations of DeCUCB83 for 12 h increased the amount of active caspase-3, when compared to untreated control cells. Taken together, these results showed that the DeCUC83 induced cell cycle arrest and apoptosis by affecting key kinases and other enzymes that regulate these physiological processes.

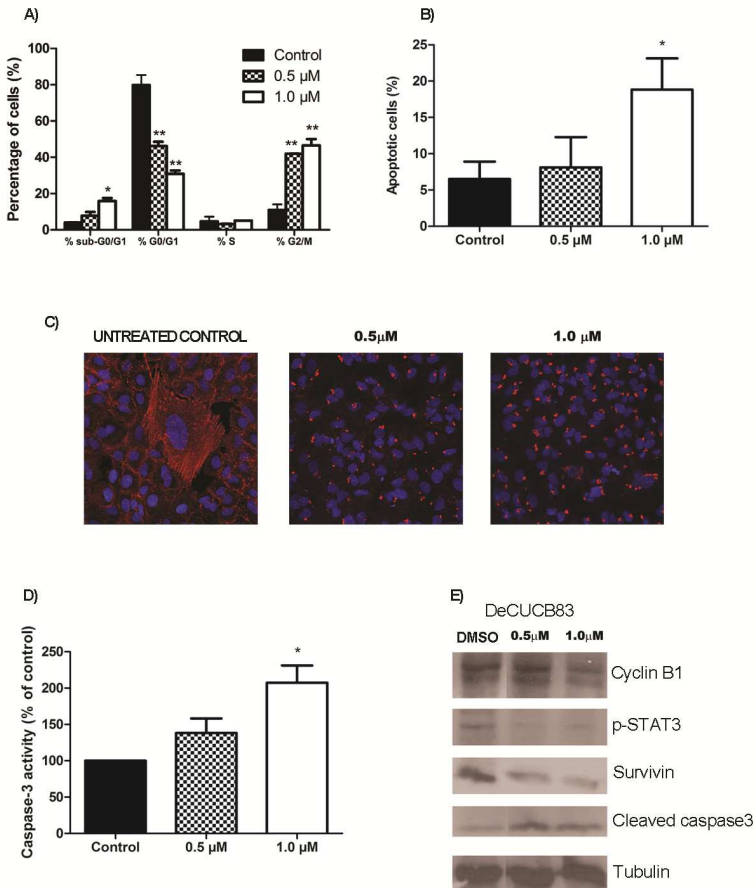


Fig. 3 Effects of DeCUCB83 on cell cycle arrest and apoptosis. (A) A549 cells (5×10^5) were treated with DeCUC83 and analyzed 24 h later by DNA flow cytometry. The values indicate the percentage of A549 cells in the indicated phases of the cell cycle (sub-G0/G1, G0/G1, S and G2/M). $*p < 0.001$ and $**p < 0.0001$ as compared with control. (B) The A549 cells were treated for 12 h with DeCUC83, stained with Annexin V/PI, and submitted to flow cytometry for analysis of the apoptotic cells proportion. $*p < 0.05$ as compared with control. (C) The A549 cells were either untreated or treated with 0.5 μM and 1.0 μM of DeCUC83 for 12 h, fixed, stained with Hoechst and TRITC-labeled-phalloidin and analyzed by confocal microscopy. Overlay images are shown. (D) The A549 cells were treated for 12 h with DeCUC83 and their cytosolic fraction was analyzed for changes in the activity of caspase-3. $*p < 0.05$ as compared with control. (E) A549 cells were treated with DeCUC83 for 12 h and then subjected to Western blotting using antibodies as indicated. Equal protein loading was confirmed by probing for tubulin. Representative images of three independently repeated experiments are shown. The values represent means of three independent experiments and SD.

3.5 DeCUCB83 is a potent suppressor of the PI3Kinase/AKT signaling pathway and alters the phosphorylation/activation status of ERK

PI3K/AKT and RAS/RAF/ERK pathways are key regulators of cell survival and proliferation and their deregulation are commonly found in cancer (7). To investigate the effects of DeCUCB83 on these pathways, firstly the phosphorylation status of AKT and ERK in the A549 cells was studied. In these experiments, the cells were treated with DeCUCB83 for 24 and 48 h followed by stimulation with TNF α (30ng/mL) for additional 15 min. As shown in Fig.4A, the TNF α -mediated activation/phosphorylation of both AKT and ERK was inhibited, when A549 cells were treated with either 0.5 or 1.0 μM of the compound. In contrast, the activation state of key proteins of other signaling pathways such as p38, JNK, NF-kappaB p65 as well as the degradation of I κ B α , was not significantly changed after treatment with DeCUCB83 (data not shown). All the blots related to 48 h of treatment can be found as a Supplementary material. To reveal whether DeCUCB83 affects the AKT kinase directly, A549 cells were transiently transfected with a wild-type form of AKT or the

corresponding pCMV5 empty vector and exposed to 0.5 and 1.0 μM of DeCUCB83 during 24 h. The expressed recombinant AKT kinase always displayed an increased phosphorylation already in non-stimulated cells and, interestingly, this basal phosphorylation was not inhibited by DeCUCB83. To the contrary, phosphorylation of endogenous AKT was always completely inhibited by the compound (Fig. 4B). Overexpression of AKT also had no effect on inhibition of ERK phosphorylation by DeCUCB83 compound. These data indicate that upstream components of the AKT signaling cascade rather than AKT itself are affected by the DeCUCB83. However, while phosphorylation of the AKT and the PI3k kinases were strongly inhibited by both 0.5 and 1.0 μM of DeCUCB83, the phosphorylation of upstream components of PI3K/AKT signaling pathway such as PTEN and PDK1 were unaffected (Fig.4C).

3.6 DeCUCB83 inhibits the expression level of EGFR and phosphorylation of EGFR

Both PI3K and ERK1/2 kinases can be activated by tyrosine kinase receptors (7). EGFR is expressed at high levels in a wide range of tumor types and in most lung cancers it has been associated to lower rates of survival. Therefore, we assessed whether the effects of DeCUCB83 on PI3K/AKT and ERK1/2, we have seen, might result from inhibition of this tyrosine kinase receptor. Therefore, we transiently overexpressed the human EGFR in A549 cells and analyzed its phosphorylation after stimulation with EGF in the presence or absence of the DeCUCB83 compound. Growth factor stimulation of A549 cells overexpressing the EGFR resulted in a stronger tyrosine phosphorylation signal of the receptor than in empty vector transfected cells. Of note, incubation of both vector- and EGFR-transfected cells with DeCUCB83 compound efficiently inhibited the EGF-mediated phosphorylation of the receptor. The effect was concentration-dependent and a concentration of 1 μM of DeCUCB83 was sufficient to completely prevent the phosphorylation of endogenous EGFR. While this amount also efficiently blocked the receptor phosphorylation in overexpressing cells, some residual phosphorylation was still detected there (Fig.4D). Interestingly, overexpression of the EGFR also attenuated the inhibitory effect of DeCUCB83 on AKT and ERK kinases, suggesting that the tyrosine kinase receptor is probably the primary target of the compound.

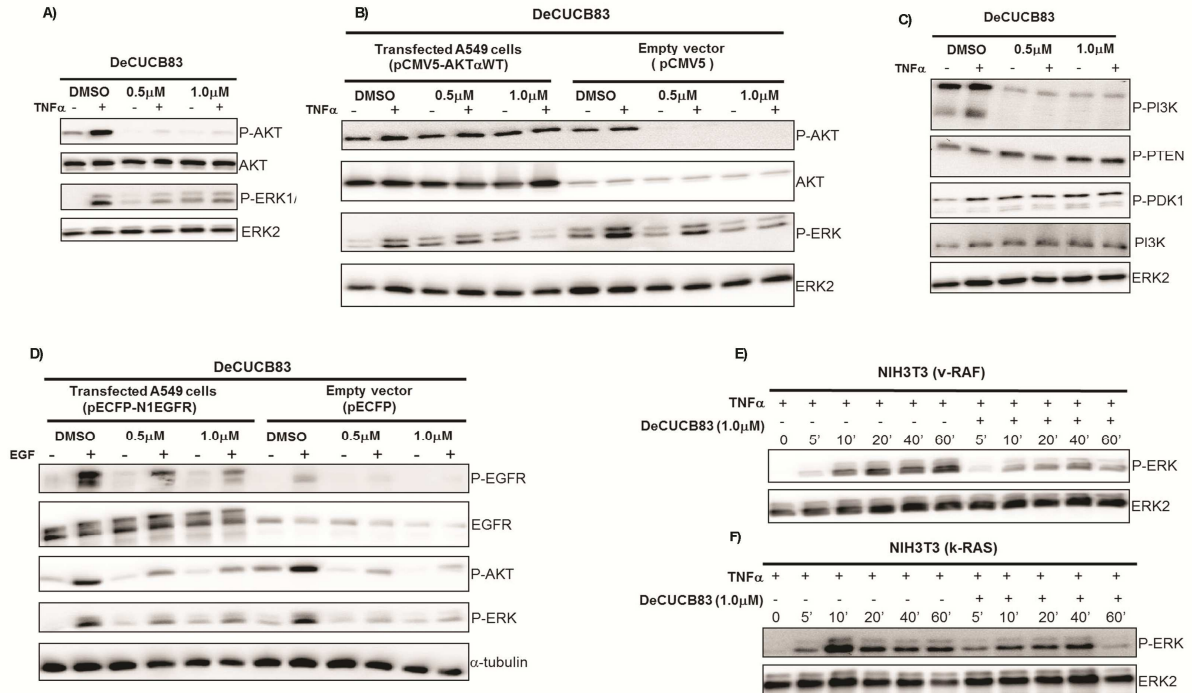


Fig.4: Effects of DeCUCB83 on TNF α -mediated activation of signaling pathways. (A) Effect of DeCUCB83 on the phosphorylation status of AKT and ERK. (B) Effect of DeCUCB83 on the phosphorylation status of AKT and ERK in A549 cells transiently transfected with 1 μ g of wild-type form of AKT or the empty pCMV5 vector. (C) Effect of DeCUCB83 on the phosphorylation status of PI3K and its regulators PTEN and PDK1. In A, B and C the cells were exposed to 0.5 and 1.0 μ M of DeCUCB83 for 24 h, stimulated or not for additional 15 min with 30ng/mL of TNF α and analyzed by Western blotting. (D) Effect of DeCUCB83 on the phosphorylation level of EGFR, measured by phosphorylation of its specific Tyr 1068 site and downstream targets AKT and ERK. The A549 cells were transiently transfected with 1 μ g of human EGFR or its comparable empty vector control. The cells were exposed to 0.5 and 1.0 μ M of DeCUCB83 for 24 h, stimulated or not with EGF (10ng/mL, 15min) and then analyzed by Western blotting. (E) and (F) Effect of DeCUCB83 on the phosphorylation status of ERK in NIH3T3/v-RAF- (E) and NIH3T3/k-RAS- (F) transformed cells. The cells were simultaneously stimulated with TNF α (30ng/mL) and exposed or not to 1.0 μ M of DeCUCB83 for time points indicated and analyzed by Western blotting. Equal protein loading was confirmed by probing for tubulin or ERK2. The most representative results of three independent experiments are shown.

3.7 DeCUCB83 is more selectivity towards malignant transformed cells

The RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway is frequently hiperactivated in NSCLC (8). Our experiments showed that DeCUCB83 efficiently inhibited the activation/ phosphorylation of this pathway. Hence, we aimed to investigate the selectivity and efficiency of DeCUCB83 towards tumor cells in which this pathway is permanently active due to oncogenic transformation of particular members of the pathway. To study this we took advantage of tumorigenic NIH3T3 cells that have been transformed by transduction with either oncogenic k-RAS or v-RAF (35). A particular advantage of these cells is that only the RAS/ERK pathway is oncogenically altered. Comparative treatment of NIH3T3 cell lines with the DeCUCB83 compound for 48 h revealed that the growth inhibitory effect of DeCUCB83 towards v-RAF and ki-RAS transformed cells was 31- or 5-times more efficient, respectively, than towards wt non-transformed NIH3T3 cells. For comparison,

staurosporin, which is an inhibitor of diverse signaling kinases had either no or even a growth promoting effect compared to wt cells (Table 1). In good agreement with these data, the TNF α -mediated phosphorylation of ERK1/2 was efficiently blocked by the DeCUCB83 compound in these cells and the inhibitory effect was more pronounced in v-RAF- compared with k-RAS-transformed NIH3T3 fibroblasts (Fig.4E and 4F).

Table1: Growth inhibitory effects and selectivity of DeCUCB83 and staurosporine towards normal and v-RAF and k-RAS transformed NIH3T3 fibroblasts.

| Cells | DeCUCB83 IC ₅₀ ^a μ M (CI 95%) | Staurosporine IC ₅₀ ^a μ M (CI 95%) |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| NIH3T3 normal | 17.592 (9.872 – 31.349) | 0.0692 (0.029-0.165) |
| NIH3T3/v-RAF | 0.561 0.316 – 0.998 | 0.064 (0.048-0.088) |
| NIH3T3/k-RAS | 3.559 (1.612 - 7.857) | 12.728 (0.748-21.643) |
| SI ^b (NIH3T3/v-RAF) | 31.4 | 1.08 |
| SI ^b (NIH3T3/k-RAS) | 4 | ND |

^a Inhibitory concentration of 50% cell growth was calculated through a nonlinear fit-curve (log of compound concentration *versus* normalized response - variable slope)

^b Selectivity index: calculated as IC₅₀ NIH3T3 normal / IC₅₀ NIH3T3/v-RAF or IC₅₀ NIH3T3 normal / IC₅₀ NIH3T3/k-RAS

ND= Not determined, since staurosporine was more cytotoxic toward normal NIH3T3 cell line.

3.8 DeCUCB83 reduces RAF-induced lung tumors growth *in vivo*

To study the *in vivo* relevance of the DeCUCB83 in preventing tumor growth, we injected the compound into the peritoneal cavity of c-RAF-1-BxB mice. These transgenic mice develop multiple adenomas of type II pneumocyte origin within 3-4 months after birth, because they contain a truncated oncogenic version of the RAF-kinase. The

expression of the oncogene is restricted to lung tissue, as the c-RAF-1-BxB transgene is driven by the surfactant protein-C (SP-C) promoter (34). Treatment of four-months-old mice with 1 mg/kg of DeCUCB83 every second day during 21 days did suppress the tumor growth slightly, while the DMSO control did not show any effect (only 16% of tumor reduction was measured, data not shown). At this dose and scheme of treatment, DeCUCB83 was well tolerated (data not shown). However, when DeCUCB83 was administrated at the same dose (1 mg/kg) and for the same time period (21 days), but every single day, which was still tolerated by the animals, the size of c-RAF-BxB-1-positive tumor foci was significantly reduced compared to the control-treated mice (Fig.5A and 5B). As the development of lung adenomas in these mice mainly, if not exclusively, depends on expression of the oncogenic human c-RAF-1-BxB (34), it is conceivable that the amount of c-RAF-1-BxB protein or mRNA in lungs will be directly proportional to the amount of tumor tissue. Indeed, not only the number of tumor colonies and their size were reduced after treatment of mice with DeCUCB83, but also the amount of c-RAF-BxB protein and mRNA (Fig.5C-F) and the measured amounts of tumor tissue correlated very well with the amounts of expressed c-RAF-1-BxB protein and mRNA (Fig. 5E and G).

Taken together, these data demonstrate that DeCUCB83 is a potential anti-tumor drug, as it inhibited the growth of RAF oncogene-induced lung tumors in mice significantly. Furthermore, these data show that the c-RAF-1-BxB transgenic mice represent a good mouse model for evaluation of anti-lung tumor effects of potential cancer drugs.

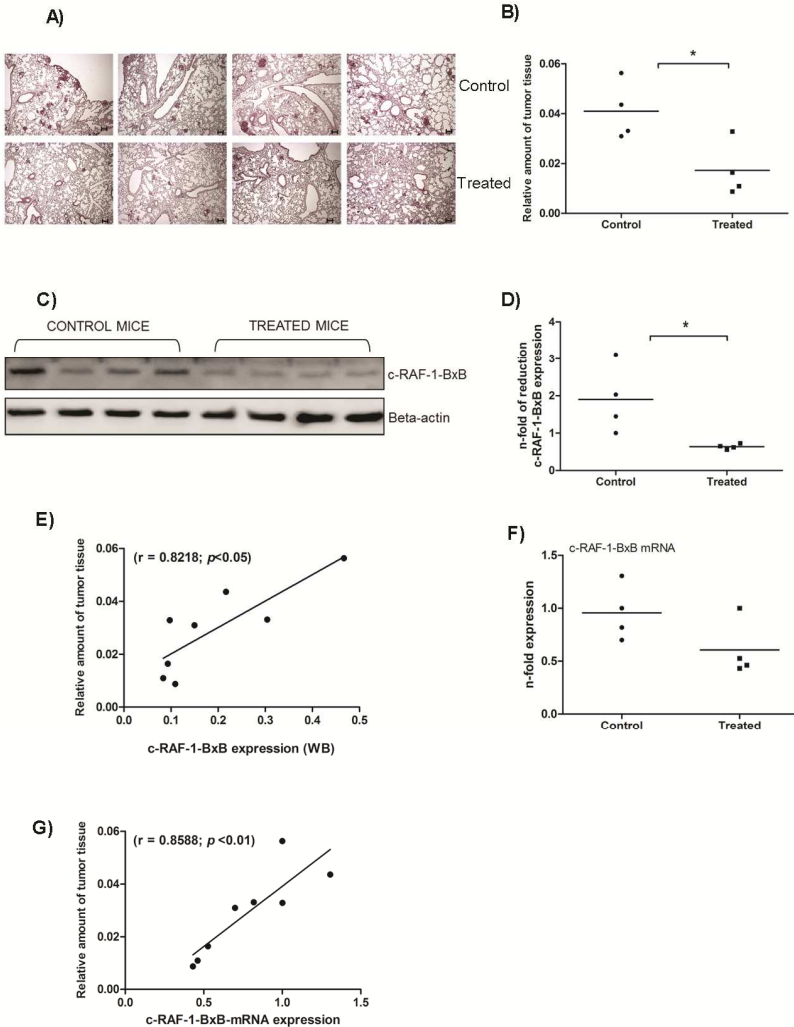


Fig.5: Effects of DeCUCB83 on c-RAF-1-induced lung tumors growth in mice. (A) Immunohistological analysis of lung tissues from untreated mice ($n=4$, upper panels) and DeCUCB83-treated mice ($n=4$, lower panels) for lung expression of c-RAF-1-BxB protein. Magnification 5X.

(B) The total amount of tumor tissue in the lungs of untreated control mice ($n=4$) and DeCUCB83-treated mice ($n=4$) measured after immunohistochemistry. The lungs of treated mice exhibited 58% ($*p < 0.05$, t test) less tumor tissue in comparison to untreated control animals. (C) Western blotting of tumor lysates of untreated control mice ($n=4$) and DeCUCB83-treated mice ($n=4$) for c-RAF-1-BxB expression. Beta-actin was used as a loading control. (D) Densitometric quantitation of the human c-RAF-1-BxB protein expressed in the lungs of untreated and DeCUCB83-treated mice. The lungs of treated mice exhibited 66% ($*p < 0.05$, t test) less c-RAF-1-BxB expressed protein in comparison to untreated control animals. (F) The total RNA was isolated from the lungs of untreated mice ($n=4$) and DeCUCB83-treated mice ($n=4$), reverse transcribed and the expression of c-RAF-1-BxB mRNA was determined by quantitative real-time PCR. The expression of c-RAF-1-BxB mRNA was reduced 37% after systemic treatment with DeCUCB83, albeit the means are not statistically significant when compared by t test. ($p > 0.05$). Relationship between tumor tissue amount and c-RAF-1-BxB protein (E) and c-RAF-1-BxB mRNA (G) in lungs of all mice analyzed. The relative amounts of tumors, c-RAF-1-BxB protein and mRNA were measured by immunohistochemistry, Western blotting and qRT-PCR as shown in (A, C and F).

4. Discussion

Plant-based systems play a crucial role in healthcare and continue to be a key source of new drugs and new chemical entities. Of the plant-derived antitumor drugs in clinical use, some of the best known are the vinca alkaloids, vinblastine and vincristine, together with the two clinically-active agents, etoposide and teniposide, which are semisynthetic derivatives of the natural product epipodophyllotoxin (14, 16). Cucurbitacins are a class of highly oxidized tetracyclic triterpenoids, which are distributed in the plant kingdom. They exhibit a wide array of *in vitro* and *in vivo* pharmacological effects, and their antitumor activity has been particularly investigated (17-21).

Recently, our research group have studied the cucurbitacins as natural product scaffolds for the achievement of new bioactive molecules (29). In the current study, we demonstrated that a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B (DeCUCB83) is a potent suppressor of human NSCLC cell growth *in vitro* through its effects on

actin-cytoskeleton, EFG receptor and its downstream signaling pathways, mainly PI3Kinase, ERK1/2 and STAT3, cell-cycle regulatory and apoptotic proteins. In addition, for the first time, the potential antitumoral activity of DeCUCB83 was showed in a well-established c-RAF induced lung adenoma model *in vivo*.

MTT analysis showed significant inhibition of A549 cells viability *in vitro* at a concentration and time-dependent manner (Fig.2). DeCUCB83 treatment inhibited cell growth, showing IC_{50} values of 0.42 μM and 0.12 μM for 48 and 72 h, respectively. It was even more active than paclitaxel (IC_{50} values of 1.16 μM and 0.19 μM for 48 and 72 h, respectively), a well-known drug clinically used for the treatment of lung cancer (43). In addition, DeCUCB83 showed 31.4 and 4 times more selectivity towards NIH3T3/v-RAF and NIH3T3/k-RAS cells, respectively, when compared to non-transformed cells (NIH3T3 wild type cells). These results raise the possibility that DeCUCB83 might have selectivity for cancer cells, but further studies are needed to substantiate this hypothesis.

Since the most anticancer drugs exhibit their inhibitory effects on tumor cell growth by inducing cell cycle arrest and apoptosis, a set of assays on cell cycle distribution and apoptosis detection by FACS was performed to better characterize the mechanism associated to the inhibitory activity of DeCUCB83 on A549 cells. The treated cells were arrested at the G2/M phase of cell cycle resulting in a decreased G0/G1 cell population (Fig.3A) and suggesting that the new compound inhibits cell growth via blocking cell division at the G2/M phase. In addition, the distribution of cells over different cell cycle phases analyzed by FACS showed that the treatment of A549 cells resulted in increase of cell apoptosis (from 4.02% in the untreated group to 15.90% after 24h of exposure to 1 μM of DeCUCB83), which was confirmed by Annexin V/PI staining (Fig.3B). These results are in good agreement with recent findings, demonstrating that other cucurbitacins also induce a G2/M arrest and apoptosis in other human cancer cell lines *in vitro* (32, 44-46).

In order to better understand the mechanism by which DeCUCB83 induces cell cycle arrest and apoptosis of A549 cells, we firstly investigated the status of key proteins known to regulate G2/M transition and apoptosis. The signal transducer and activator of transcription protein 3 (STAT3) is a latent cytosolic transcription factor that transfers signals from the cell membrane directly to the nucleus,

and it is found to be aberrantly activated in many cancers, including NSCLC (47). Some studies have proposed that cucurbitacins induce inhibitory effects against several human cancer cell lines via suppression of STAT3 phosphorylation (48-53). It is very well-known that STAT3 is responsible for up-regulating the expression of several cell cycle regulators and antiapoptotic proteins (47, 54). In the current study, it was clearly demonstrated that the levels of p-STAT3 and cyclin B1 proteins were decreased in A549 cells treated with DeCUCB83 (Fig 3E), suggesting that the cell cycle arrest and apoptosis of A549 cells was at least partially mediated via suppression of STAT3 activation. In the same context, survivin, a human inhibitor of apoptosis protein (IAP) that plays an important role in both cell cycle regulation and inhibition of apoptosis, was expressed in cells during the G2/M phase of the cell cycle, followed by a rapid decay of both mRNA and protein levels at the G1 phase (55). Inhibition of survivin expression or disruption of survivin interaction with microtubules leads to apoptosis at G2/M phase (56). As can be seen in Fig.3E, both analyzed concentrations of DeCUCB83 decreased the expression of survivin after 12 h of treatment. This fact indicates that survivin might be a regulator of cell division and is required to protect cells from apoptosis.

To confirm the apoptotic nature of cell death in DeCUCB83 treated cells, we assessed the activation of the major effector caspase, which is an important executor of the apoptotic process through its ability to cleave several cellular substrates (40). The ability of DeCUCB83 to activate caspase-3 was demonstrated by the cleavage of a caspase-3-specific substrate (Fig.3D) and was confirmed by Western blotting analysis (Fig.3E), since the treatment of A549 cells with both concentrations of DeCUCB83 increased the amount of the active caspase-3, when compared to untreated control cells. These results confirm the involvement of this enzyme in the DeCUCB83-mediated cell death.

In the current study, confocal microscopy analyses with rhodamine-phalloidin and Hoechst fluorescent staining showed that DeCUCB83 exposure at both tested concentrations induced intense alterations in the cytoskeleton (Fig.3C). The actin filamentous organization was rapidly disrupted upon treatment of A549 cells switching from a slight network that elongated continuously through the cytoplasm in untreated cells to an intensely fluorescent accumulation located next to the cell nucleus in treated cells. These findings are in

complete agreement with the present understanding about cucurbitacins, which suggest a direct modulation of the actin cytoskeleton (57-60).

The cucurbitacins have shown strong antiproliferative activity against many human cancer cells, primarily as inhibitors of the JAK/STAT3 pathway, as previously described in this section. For illustration, Blaskovich and co-workers (53) were the first to report that cucurbitacin I rapidly suppresses phosphotyrosine STAT3 in v-Src-transformed NIH3T3 cells and in A549 cells. Consequently, STAT3 DNA binding and STAT3-mediated gene transcription is inhibited. This cucurbitacin also decreased the phosphorylation of JAK without affecting AKT, ERK1/2, or JNK, suggesting that cucurbitacin I is highly selective for JAK/STAT3. Conversely, cucurbitacin Q selectively inhibits STAT3 without affecting JAK2, Src, AKT, ERK, and JNK in A549 cells (49). Nonetheless, five different leukemia cell lines treated with cucurbitacin B showed cell growth inhibition, which was achieved by suppression of both STAT3 activation and RAF/ERK kinase pathways (61). But when hepatocellular carcinoma (BEL-7402) cells were treated with cucurbitacin B, the c-RAF was inhibited without affecting STAT3 (62). Another study showed that cucurbitacin B inhibited the proliferation of seven human osteosarcoma cells lines *in vitro*, suppressing ERK, AKT and mammalian target of rapamycin (mTOR) proteins (63). Therefore, cucurbitacins can selectively inhibit different signaling pathways, depending on the cancer cell type, which led us to study which other pathways are affected by the novel DeCUCB83.

Here, we showed for the first time that this class of compounds can target directly the epidermal growth factor receptor (EGFR) (Fig.4D), suppressing its phosphorylation in a concentration-dependent manner in both EGFR-overexpressing A549 cells and empty vector control cells, followed by inhibition of its secondary PI3K/AKT, RAS/ERK and JAK/STAT3 signaling pathways (Fig.3E and Fig.4). The EGFR and its downstream targets are mostly overexpressed and constitutively active in NSCLC, being involved in the development and progression of lung cancer, which is usually associated with poor prognosis of many human malignancies (7, 8, 64). Emerging evidence indicates that the RAF/MEK/ERK pathway is intimately linked with the PI3K/AKT pathway (64). In fact, RAS activation regulates activation of both pathways that may result in the phosphorylation of many downstream targets and play a role in the regulation of cell survival and

proliferation. Upon activation, the ERK translocates to the nucleus to induce transcription of the genes, such as Bcl-2, caspase-9 and cyclin D1 for growth and survival (65). Likewise, activated AKT exerts its anti-apoptotic activity, in part by preventing the release of cytochrome *c* from the mitochondria, inhibiting the cell cycle G2/M check-point initiation, and directly inactivating pro-apoptotic factors such as Bad and procaspase-9 by phosphorylating them (10, 66). For this reason, considerable attention has been given to the EGFR pathway because both EGFR and some downstream components might attend as targets for anticancer therapy.

In addition to DeCUCB83's effects on STAT3 activation, PI3K and its downstream target AKT were strongly inhibited in unstimulated and TNF α -stimulated A549 treated cells as it can be seen in Fig.4A and 4C. The effect of DeCUCB83 on the AKT phosphorylation could also be visualized when EGFR-overexpressing A549 cells were treated, which confirms its potential (Fig.4D). In the same context, the ERK phosphorylation-TNF α -induced was clearly down-regulated by the treatment with both concentrations of DeCUCB83, as it can be seen in Fig.4A-4D.

In order to develop novel therapeutic approaches for the management of cancer, animal models are required. We have used transgenic mice with lung targeted expression of the c-RAF kinase, who develop multiple type II pneumocyte adenomas within 3-4 months after birth (34), to evaluate DeCUCB83's effects on tumor progression. Considering the fact that DeCUCB83 was able to reduce ERK phosphorylation, which is a downstream target of RAF, in A549 cells and also in NIH3T3 cells transfected with RAS and RAF oncogenes, it could be a valuable indicative of its effectiveness in this model. The results showed that DeCUCB83 could significantly suppress the lung tumor present in these transgenic mice as could be visualized directly in the lungs by immunohistochemistry and also by Western blotting analyses, measuring the amount of c-RAF-BxB expressed (Fig.5), with a significant positive correlation between these parameters (Pearson correlation= 0.8218, $p < 0.05$).

In conclusion, the present study indicates, for the first time, that a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B (DeCUCB83) suppresses EGFR phosphorylation in NSCLC cells, followed by inhibition of its secondary pathways, especially JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling

that provide valuable information on the molecular mechanism of its cytotoxic effects. In addition, its antitumor activity was proved, also for the first time, in a well-established c-RAF induced lung tumor model *in vivo*. Taken together, these findings strongly suggest that DeCUCB83 is a promising drug candidate for the treatment of lung cancer.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127:2893-917.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63:11-30.
3. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2001;18:1059-68.
4. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *The lancet oncology*. 2008;9:1002-11.
5. Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807:735-45.
6. Prasasya RD, Tian D, Kreeger PK. Analysis of cancer signaling networks by systems biology to develop therapies. *Seminars in cancer biology*. 2011;21:200-6.
7. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cellular signalling*. 2006;18:2089-97.
8. Haura EB, Cress WD, Chellappan S, Zheng Z, Bepler G. Antiapoptotic signaling pathways in non-small-cell lung cancer: biology and therapeutic strategies. *Clinical lung cancer*. 2004;6:113-22.
9. Lee HY, Srinivas H, Xia D, Lu Y, Superty R, LaPushin R, et al. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase kinase-4/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent Pathways cooperate to maintain lung cancer cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:23630-8.
10. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005;24:7455-64.

11. Duffy A, Kummar S. Targeting mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) in solid tumors. *Targeted oncology*. 2009;4:267-73.
12. Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res*. 2008;18:254-67.
13. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharmaceutical research*. 2010;27:950-61.
14. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*. 2012;75:311-35.
15. Lee KW, Bode AM, Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:211-8.
16. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830:3670-95.
17. Chen JC, Chiu MH, Nie RL, Cordell GA, Qiu SX. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: Structures and biological activities. *Nat Prod Rep*. 2005;22:386-99.
18. Lee DH, Iwanski GB, Thoennissen NH. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:413-8.
19. Rios JL, Andujar I, Escandell JM, Giner RM, Recio MC. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. *Current pharmaceutical design*. 2012;18:1663-76.
20. Alghasham AA. Cucurbitacins - a promising target for cancer therapy. *International journal of health sciences*. 2013;7:77-89.
21. Chen X, Bao J, Guo J, Ding Q, Lu J, Huang M, et al. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anti-cancer drugs*. 2012;23:777-87.
22. Bernard SA, Olayinka OA. Search for a novel antioxidant, antiinflammatory/analgesic or anti-proliferative drug: Cucurbitacins hold the ace. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4:2821-6.
23. Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett*. 2003;189:11-6.
24. Duangmano S, Sae-Lim P, Suksamrarn A, Domann FE, Patmasiriwat P. Cucurbitacin B inhibits human breast cancer cell proliferation through disruption of microtubule polymerization and

- nucleophosmin/B23 translocation. BMC complementary and alternative medicine. 2012;12:185.
25. Duangmano S, Sae-Lim P, Suksamrarn A, Patmasiriwat P, Domann FE. Cucurbitacin B Causes Increased Radiation Sensitivity of Human Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest. Journal of oncology. 2012;2012:601682.
26. Kausar H, Munagala R, Bansal SS, Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC. Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: Identification of intracellular thiols as critical targets. Cancer letters. 2013;332:35-45.
27. Hsu HS, Huang PI, Chang YL, Tzao C, Chen YW, Shih HC, et al. Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in nonsmall cell lung cancer-derived CD133-positive cells. Cancer. 2011;117:2970-85.
28. Lang KL, da Rosa Guimarães T, Rocha Machado V, Zimmermann LA, Silva IT, Teixeira MR, et al. New Cytotoxic Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. Planta Medica. 2011;77:1648-51.
29. Lang KL, Silva IT, Zimmermann LA, Machado VR, Teixeira MR, Lapuh MI, et al. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. Bioorganic & medicinal chemistry. 2012;20:3016-30.
30. Duncan KL, Duncan MD, Alley MC, Sausville EA. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. Biochemical Pharmacology. 1996;52:1553-60.
31. 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 chemotherapy and pharmacology. 2012;70:415-24.
32. Yasuda S, Yogosawa S, Izutani Y, Nakamura Y, Watanabe H, Sakai T. Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. Molecular nutrition & food research. 2010;54:559-65.
33. Silva IT, Teixeira MR, Lang KL, Guimarães TR, Dudek SE, Durán FJ, Ludwig S, Caro MSB, Schenkel EP, Simões CMO Proliferative inhibition and apoptotic mechanism on human non-small-cell lung cancer (A549 cells) of a novel cucurbitacin from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. International Journal of Cancer Research 2013; DOI: 10.3923/ijcr.2013.
34. Kerkhoff E, Fedorov LM, Siefken R, Walter AO, Papadopoulos T, Rapp UR. Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic

mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;11:185-90.

35. Kolch W, Heidecker G, Lloyd P, Rapp UR. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*. 1991;349:426-8.

36. von Gise A, Lorenz P, Wellbrock C, Hemmings B, Berberich-Siebelt F, Rapp UR, et al. Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Molecular and cellular biology*. 2001;21:2324-36.

37. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.

39. Bellomo G, Mirabelli F. Oxidative stress and cytoskeletal alterations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;663:97-109.

40. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-6.

41. Johnson AL, Langer JS, Bridgham JT. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinology*. 2002;143:3405-13.

42. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8:547-66.

43. Rigas JR. Taxane-platinum combinations in advanced non-small cell lung cancer: a review. *The oncologist*. 2004;9 Suppl 2:16-23.

44. Zhu JS, Ouyang DY, Shi ZJ, Xu LH, Zhang YT, He XH. Cucurbitacin B induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy associated with G actin reduction and persistent activation of cofilin in Jurkat cells. *Pharmacology*. 2012;89:348-6.

45. Liu T, Zhang M, Zhang H, Sun C, Deng Y. Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2008;265:1225-32.

46. 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. *Biochemical Pharmacology*. 2007;73:56-67.

47. Fletcher S, Drewry JA, Shahani VM, Page BDG, Gunning PT. Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. *Biochem Cell Biol.* 2009;87:825-33.
48. Sun C, Zhang M, Shan X, Zhou X, Yang J, Wang Y, et al. Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2010;136:603-10.
49. Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D, Sebti SM. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene.* 2005;24:3236-45.
50. 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 research.* 2009;69:5876-84.
51. Wiart C. The Definition and Significance of Cucurbitacin B a STAT3 Inhibitors. *Cancer letters.* 2013;328:188.
52. Sun C, Zhang M, Shan X, Zhou X, Yang J, Wang Y, et al. Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136:603-10.
53. Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebti 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 research.* 2003;63:1270-9.
54. Yu H, Jove R. The STATs of cancer - new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:97-105.
55. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Science.* 2000;113:4363-71.
56. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nature cell biology.* 1999;1:461-6.
57. Duncan KL, Duncan MD, Alley MC, Sausville EA. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* 1996;52:1553-60.
58. Haritunians T, Gueller S, Zhang L, Badr R, Yin D, Xing H, et al. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 2008;32:1366-73.

59. Wakimoto N, Yin D, O'Kelly J, Haritunians T, Karlan B, Said J, et al. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Science*. 2008;99:1793-7.
60. Yin D, Wakimoto N, Xing H, Lu D, Huynh T, Wang X, et al. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. *Int J Cancer*. 2008;123:1364-75.
61. Chan KT, Li K, Liu SL, Chu KH, Toh M, Xie WD. Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer letters*. 2010;289:46-52.
62. Chan KT, Meng FY, Li Q, Ho CY, Lam TS, To Y, et al. Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. *Cancer letters*. 2010;294:118-24.
63. Lee DH, Thoennissen NH, Goff C, Iwanski GB, Forscher C, Doan NB, et al. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. *Cancer letters*. 2011;306:161-70.
64. Ciuffreda L, McCubrey JA, Milella M. Signaling Intermediates (PI3K/PTEN/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK Pathways) as Therapeutic Targets for Anti-Cancer and Anti-Angiogenesis Treatments. *Current signal transduction therapy*. 4:130-43.
65. Herrera R, Sebolt-Leopold JS. Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends in molecular medicine*. 2002;8:S27-31.
66. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*. 2004;30:193-204.

**CAPÍTULO IV:
AVALIAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA DE
CUCURBITACINAS NATURAIS E DERIVADOS
SEMISSINTÉTICOS ATIVOS NÃO INCLUSOS NAS
PUBLICAÇÕES PRÉVIAS**

1. APRESENTAÇÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados da avaliação do mecanismo de morte celular induzida por alguns compostos pertencentes ao primeiro grupo de cucurbitacinas avaliadas, que se mostraram bastante ativas durante o processo de triagem, sendo estas as de números **16** e **18** (duas cucurbitacinas naturais inéditas), **19** (cucurbitacina B), **20** e **31** (derivados semissintéticos da cucurbitacina B). Os resultados da cucurbitacina 18 (ativa na primeira triagem) já foram apresentados no capítulo II na forma de um artigo publicado.

Num segundo momento, conforme mencionado no capítulo I desta tese, outro grupo de 18 compostos (números 34 a 51 do Quadro 2, capítulo I) foram fornecidos para avaliação, quando o estudo do mecanismo de ação do primeiro grupo de compostos já havia sido finalizado. Por questões práticas, estes compostos foram avaliados somente em células A549, uma vez que essa linhagem já havia sido eleita para a avaliação do mecanismo de ação de morte celular dos outros compostos. Com base nos valores de CC_{50} , que podem ser visualizados na Tabela 3 (capítulo I), três compostos (números **37**, **39** e **43**) mostraram-se ativos, e foram selecionados, juntamente com outros quatro compostos do primeiro grupo (números **16**, **18**, **19** e **20**), para serem avaliados mais detalhadamente durante o estágio sanduíche na Universidade de Münster. Os resultados obtidos estão expostos neste capítulo, sendo que os efeitos *in vitro* e *in vivo* da CUC 37 (=DeCUCB83) foram detalhadamente descritos também no capítulo III, sob a forma de artigo a ser submetido para avaliação.

2. ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO CITOTÓXICA DAS CUCURBITACINAS MAIS ATIVAS SELECIONADAS NA PRIMEIRA TRIAGEM, FRENTE À LINHAGEM CELULAR TUMORAL A549

Antes da elucidação do mecanismo, foi avaliado o grau de indução de morte das células A549, em diferentes tempos de tratamento, e as cucurbitacinas selecionadas do primeiro grupo de compostos avaliados (números 16, 19, 20 e 31) exerceram uma ação citotóxica tempo-dependente, tendo sido observado maior grau de indução de morte celular, após 72 h de tratamento, como pode ser verificado na Tabela 4.

Tabela 4: Determinação dos valores de CC_{50} das cucurbitacinas mais ativas, do primeiro grupo avaliado, em diferentes tempos de tratamento.

| CUCs | CC_{50} *- Células A549 | | |
|----------------------|---------------------------|----------------|---------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 16 | >50,00 | 10,590 ± 1,344 | 4,808 ± 0,018 |
| 19 | 0,315 ± 0,090 | 0,119 ± 0,018 | 0,031 ± 0,007 |
| 20 | >50,00 | 11,497 ± 0,484 | 2,540 ± 0,622 |
| 31 | >50,00 | 22,850 ± 1,721 | 9,454 ± 1,157 |
| Doxorrubicina | >50,00 | 1,530 ± 0,636 | 1,460 ± 0,159 |
| Paclitaxel | >50,00 | 0,211 ± 0,035 | 0,055 ± 0,011 |

* CC_{50} = Concentração tóxica a 50% para as células A549 (μ M); Valores representam a média \pm D.P. de três experimentos independentes.

O crescimento das células transformadas em um tumor requer a ocorrência de proliferação, isto é, aumento no número de células. As células humanas em divisão progridem através de um ciclo celular (ou ciclo mitótico) que consiste em fases distintas. Os dois eventos-chave no ciclo celular consistem na síntese do DNA durante a fase S e na divisão da célula-mãe em duas células-filhas durante a mitose ou fase M. A fase entre a divisão celular e a síntese de DNA é denominada G0/G1, enquanto a fase entre a síntese do DNA e a mitose é denominada G2/M. Certas proteínas, denominadas ciclinas (CL) e

quinases dependentes de ciclinas (CDKs), governam a progressão pelas fases do ciclo celular, e a ocorrência de mutações nos genes das CL e/ou CDK pode resultar em transformações neoplásicas (MOLINARI, 2000). Os alvos da maioria dos agentes antineoplásicos são as células que se encontram em divisão e, por isso, os cânceres de rápido crescimento (como as leucemias) frequentemente respondem de modo mais favorável à quimioterapia do que os grandes tumores volumosos (TAN; WHITE, 2008).

Neste contexto, foi avaliada a distribuição das células A549, tratadas ou não com as quatro cucurbitacinas selecionadas, nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo, após serem coradas com iodeto de propídeo. A detecção de uma possível interrupção do ciclo celular é fundamental para verificar a presença de danos no DNA, pois dele depende a progressão da multiplicação celular.

Como demonstrado na Figura 9A, após 24 h de tratamento com 20 μ M da CUC 16 ocorreu um bloqueio do ciclo celular aumentando a população das células A549 na fase G2/M de 17,06 % para 38,60 %, quando comparado aos controles celulares não tratados ($p < 0,0001$). Este evento foi acompanhado de uma redução da população de células em fase G0/G1 de 72,13 % no controle celular não tratado para 52,35 % após o tratamento com a CUC 16.

O tratamento com as CUCs 19 e 20 resultou em alterações semelhantes na distribuição do ciclo celular, como pode ser visualizado nas Figuras 9B e 9C. Já o tratamento com a CUC 31 não promoveu alteração na distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, quando comparado aos controles celulares não tratados (Fig. 9D).

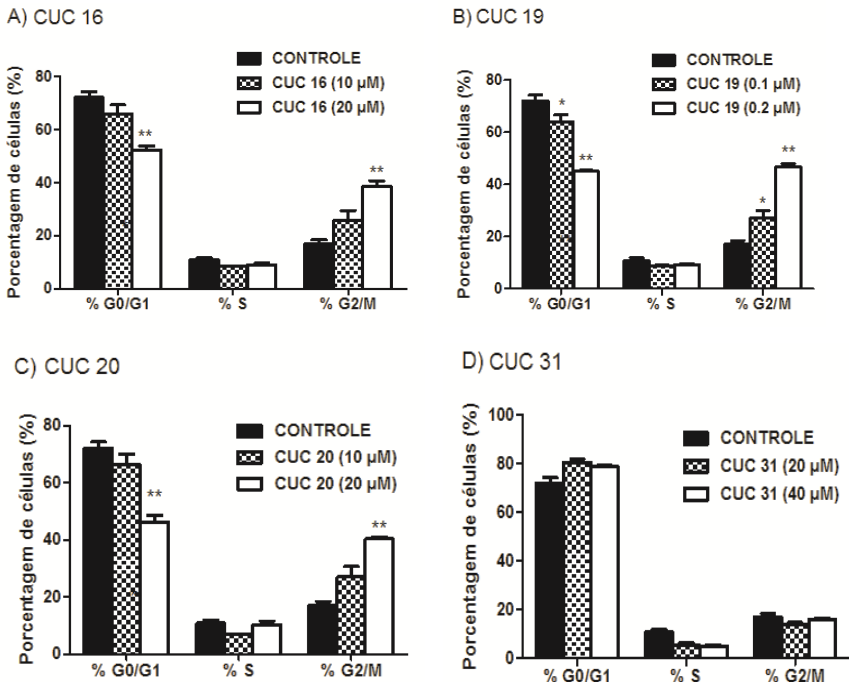


Figura 9: Efeito das cucurbitacinas 16 (A), 19 (B), 20 (C) e 31 (D) na distribuição das células A549, em diferentes fases do ciclo celular. (*) e (**) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$), em comparação aos controles de células não tratadas (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

Durante o processo apoptótico, ocorre a sinalização celular devido à translocação precoce de resíduos de fosfatidilserina do folheto interno da membrana plasmática para o folheto externo, marcando as células que devem ser fagocitadas pelo sistema imunológico (ELMORE, 2007). A proteína recombinante Anexina V é uma molécula de ligação para fosfatidilserina que interage fortemente e especificamente com resíduos deste fosfolípido de membrana, através de suas cargas negativas em presença de cálcio, podendo ser usada para a detecção *in vitro* do processo de morte celular programada (VAN GENDEREN et al., 2006). Como pode ser visualizado na Figura 10, o

tratamento com a CUC 16 (Fig. 10A) resultou em um maior percentual de células em apoptose (22,15% e 47,41% nas concentrações de 10 e 20 μM , respectivamente), quando comparado ao controle não tratado (5,18% de células apoptóticas). O mesmo comportamento foi observado após o tratamento das células A549 com as CUCS 19 e 20 (Fig. 10B e 10C), o que levou a um aumento da população apoptótica de forma concentração-dependente. Porém, a **CUC 31** (Fig. 10D) não induziu, de forma significativa, um aumento da população de células apoptóticas, após 12 h de tratamento, razão pela qual este composto não foi incluído nos demais experimentos de elucidação do mecanismo de morte celular.

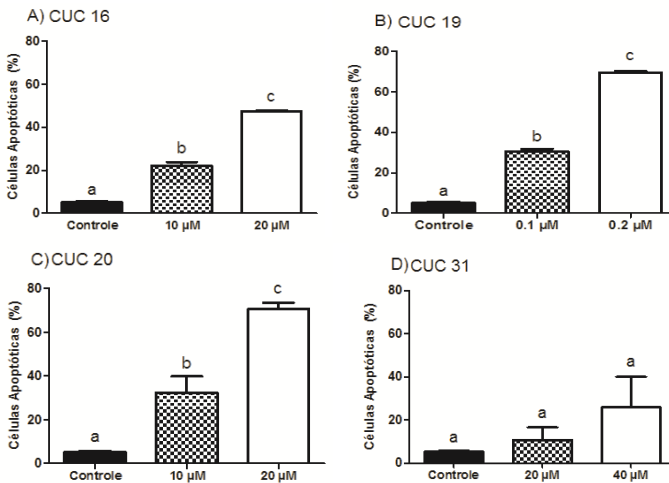


Figura 10: População de células apoptóticas (%) tratadas por 12 h com as cucurbitacinas 16 (A), 19 (B), 20 (C) e 31 (D) em relação ao controle de células não tratadas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,0001$; ANOVA, seguido do teste de Tukey).

As caspases são enzimas aspartato-específicas, presentes entre as membranas celulares e mitocondriais, no citoplasma, no retículo endoplasmático e núcleo da célula, na forma de zimogênios inativos. São executoras da morte por apoptose e compreendem duas classes diferentes: as iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e as efetoras (caspases 3, 6 e 7) que clivam substratos específicos e são responsáveis pelas características típicas deste tipo de morte (BUDIHARDJO et al., 1999).

Neste trabalho, foram utilizados kits Millipore® com substratos específicos para as caspases-3, -8 e -9 associados ao cromóforo pNA (p-nitroanilina). A clivagem do substrato pela caspase ativa libera o cromóforo, gerando coloração que pode ser quantificada por espectrofotometria, sendo as absorbâncias medidas, diretamente proporcionais à atividade enzimática. Como mostra a Figura 11, o tratamento das células A549 por 12 h com as CUCs 16 e 19 ativou, de forma significativa, a caspase-3 nas duas concentrações utilizadas, enquanto que apenas a maior concentração da CUC 20 ativou esta principal caspase efetora. Cabe ressaltar que 10 µM da CUC 16 ativaram também a caspase-9, porém o mesmo não foi observado quando se utilizou uma maior concentração, sendo que este dado precisa ser confirmado subsequentemente. O aumento da ativação das caspases, quando comparado ao controle celular não tratado, demonstrou que estas enzimas estão envolvidas no processo de morte celular induzido pelas CUCs, confirmando a indução do processo apoptótico pelos compostos estudados.

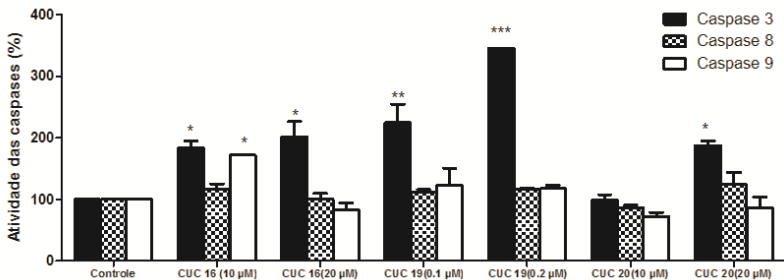


Figura 11: Análise da ativação das caspases 3, 8 e 9, em células A549 tratadas por 12 h com as cucurbitacinas 16, 19 e 20. (*), (**), e (***) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente; ANOVA, seguido do teste de Dunnett), em comparação aos controles de células não tratadas.

Durante o processo apoptótico, ocorre a clivagem de filamentos intermediários de proteínas do citoesqueleto que compõem a estrutura celular, sendo a actina uma dessas proteínas clivadas (YAMAZAKI et al., 2000). O corante fluorescente rodamina-faloidina possui alta afinidade pelos filamentos de actina, e quando ocorre conjugação, há

emissão de fluorescência. Além disso, a fragmentação nuclear é outra característica marcante em células que estejam sofrendo morte celular programada, sendo que o surgimento de células multinucleadas pode ser observado com o uso do corante nuclear Hoechst, que emite fluorescência azul ao ser excitado em microscópio confocal de fluorescência. O tratamento das células A549 com as CUCs 16, 19 e 20 induziu mudança conformacional e desestruturação dos filamentos de actina do citoesqueleto, além do surgimento de células multinucleadas de forma concentração-dependente após 12 h de tratamento, quando comparadas ao controle celular não tratado. As fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de fluorescência estão apresentadas nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

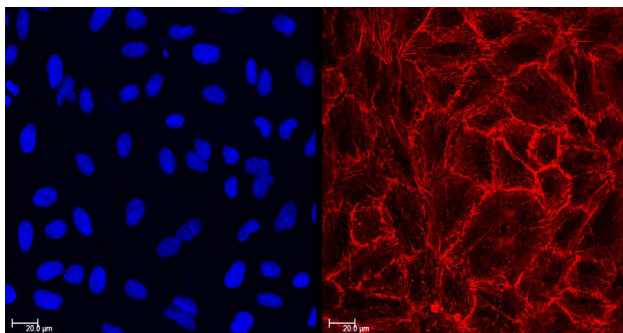


Figura 12: Imagem do controle de células A549 não tratadas, obtida através de microscopia confocal. À esquerda os núcleos podem ser visualizados através da coloração por Hoechst e à direita os filamentos de actina estão corados com rodamina-faloidina.

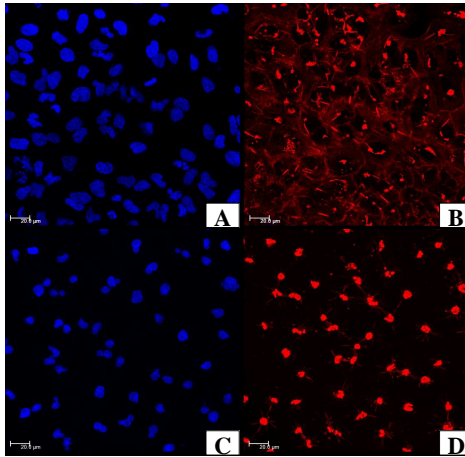


Figura 13: Imagem obtida por microscopia confocal das células A549 tratadas com a cucurbitacina 16, nas concentrações de 10 μM (A e B) e 20 μM (C e D). Em A e C, as células foram coradas com Hoechst, e em B e D com rodamina-faloidina.

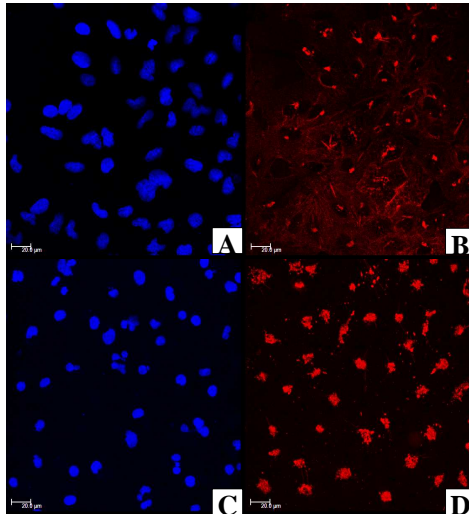


Figura 14: Imagem obtida por microscopia confocal das células A549 tratadas com a cucurbitacina 19, nas concentrações de 0,1 μM (A e B) e 0,2 μM (C e D). Em A e C, as células foram coradas com Hoechst, e em B e D com rodamina-faloidina.

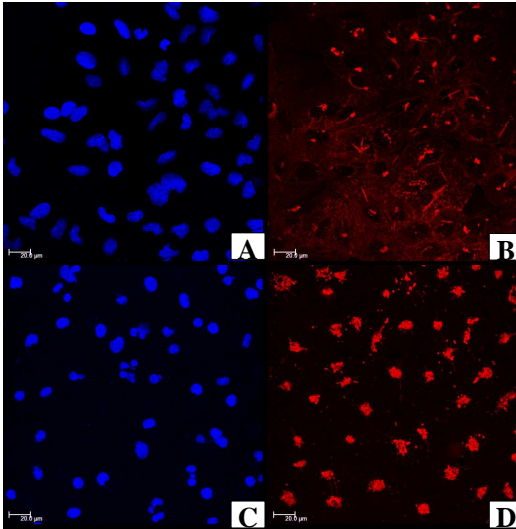


Figura 15: Imagem obtida por microscopia confocal das células tratadas com a cucurbitacina 20, nas concentrações de 10 μM (A e B) e 20 μM (C e D). Em A e C, as células foram coradas com Hoechst, e em B e D com rodamina-faloidina.

Para avaliar a expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico foi conduzido um ensaio de Western blotting, e, após 12 h de tratamento com as CUCs 16, 19 e 20, as proteínas celulares foram extraídas de forma adequada, quantificadas, analisadas em gel de SDS-PAGE, para posterior *blotting* com os anticorpos específicos. Conforme mostrado na Figura 16, o tratamento com todas as CUCs induziu a expressão da caspase-3 na sua forma ativa, o que corrobora a participação desta enzima no processo de morte celular.

O Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição (STAT3) é um fator de transcrição citosólico latente, que transmite sinais da membrana celular diretamente para o núcleo. O STAT3 encontra-se constitutivamente ativado em vários tipos de cânceres humanos, incluindo o de pulmão, desempenhando um papel crucial no crescimento, diferenciação e sobrevivência de células tumorais, as quais superexpressam vários genes, incluindo aqueles que codificam para proteínas antiapoptóticas, tais como Mcl-1 e Bcl-xL, e os reguladores

de ciclo celular ciclina D1 e c-Myc (YU, JOVE, 2004; FLETCHER et al., 2009). Considerando que as estratégias quimioterápicas mais modernas objetivam induzir o processo de morte celular programada, o STAT3 representa um alvo promissor para o desenho de novos fármacos anticâncer (AL ZAID SIDDIQUEE, TURKSON, 2008).

Recentes estudos têm demonstrado que muitas cucurbitacinas exercem seu efeito citotóxico frente a inúmeras linhagens de células tumorais, através da supressão da fosforilação do STAT3 (BLASKOVICH et al., 2003; SUN et al., 2005; SHI et al., 2006; SU et al., 2008; VAN KESTER et al., 2008; LUI et al., 2009; ISHDORJ et al., 2010).

Neste estudo, foi avaliada a expressão de p-STAT3 em células A549 por Western blotting, sendo que o tratamento das células A549 por 12 h com as CUCs 19 e 20 resultou em uma redução significativa dos níveis de p-STAT3, diferentemente da CUC 16 que não alterou sua expressão (Figura 16). Isto sugere que a inibição da fosforilação do STAT3 pode estar associada com a indução de apoptose pelos compostos 19 e 20. Para verificar a expressão de algumas proteínas-alvo do STAT3 envolvidas no processo de morte celular por apoptose, foi avaliada também a expressão de Bcl-2, a qual teve sua expressão reduzida após tratamento com as CUCs 19 e 20, mas não com a CUC 16 (Figura 16). As proteínas da família Bcl-2 exercem papel fundamental nos mecanismos de sobrevivência e morte celular. Algumas atuam como proteínas antiapoptóticas e protegem as células da morte (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1), enquanto outras atuam como pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid), controlando a liberação de citocromo *c* mitocondrial pela modulação da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (LESSENE et al., 2008). Foi possível verificar também que as CUCs 19 e 20 induziram a liberação do citocromo *c* para o citosol (Figura 16), sendo este um importante mediador pró-apoptótico desencadeador do processo de morte celular programada. A expressão de beta-actina, uma proteína celular constitutiva, não foi alterada após tratamento das células A549 com as CUCs, a qual serviu como controle.

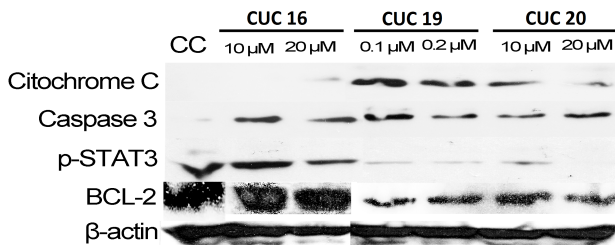


Figura 16: Análise da expressão das proteínas de citocromo *c*, caspase 3 (forma clivada), p-STAT3 e Bcl-2 por Western blotting em células A549 não tratadas (CC) ou tratadas com as cucurbitacinas 16, 19 e 20, por 12 h. β -actina foi usada como controle. Dados são representativos de três diferentes experimentos.

3. RESULTADOS OBTIDOS DURANTE A REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO SANDUÍCHE NA UNIVERSIDADE DE MÜNSTER, ALEMANHA (2012-2013)

Com o intuito de realizar um estudo mais detalhado do mecanismo de ação de morte celular, foram selecionados sete compostos (cucurbitacinas **16**, **18**, **19**, **20**, **37**, **39** e **43**) para os estudos realizados durante a realização do estágio sanduíche no *Institut für Molekulare Virologie* da Universidade de Münster (fevereiro de 2012 à janeiro de 2013). Cabe ressaltar que todos os resultados referentes à CUC 18 já foram explicitados no capítulo II e alguns dos resultados referentes à CUC 37 encontram-se no capítulo III.

Sabe-se que outras abordagens vêm sendo bastante estudadas para o tratamento do câncer, e seus alvos principais consistem na inibição das vias de sinalização de sobrevivência tumoral, as quais são reguladas por citocinas, hormônios e fatores de crescimento nos mais variados tumores, especialmente nos casos avançados de câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). Em células tumorais, componentes chaves destas vias são alterados por ativação de oncogenes ou ainda por perda de função de genes supressores de tumor, resultando em proliferação celular desregulada, inibição do processo apoptótico e aumento da angiogênese. Estratégias terapêuticas direcionadas a múltiplos elementos de uma cascata de sinalização, por exemplo, bem como quinases intracelulares, podem ser candidatos

ideais como alvos para o bloqueio da sinalização celular. Nesse sentido as vias de sinalização PI3K/AKT, RAF/MEK/ERK e dos STATs aparecem como candidatos para o bloqueio de crescimento tumoral e indução de apoptose de células tumorais (HAURA et al., 2004; TAN; WHITE, 2008; PRASASYA et al., 2011).

Embasado pelo fato de que as cucurbitacinas são reconhecidamente compostos inibidores da via de sinalização JAK/STAT3, efeito confirmado por alguns compostos aqui avaliados (capítulos II e III), os perfis de transdução de outras vias de sinalização em células A549 tratadas com os compostos selecionados foi avaliado. Na Tabela 5, pode-se visualizar um resumo dos perfis de sinalização das vias das MAP quinases, NFκB e PI3K/AKT de células tratadas com veículo (DMSO) ou com cada um dos sete compostos.

Ao se avaliar as principais vias de sinalização (MAP quinases, NFκB, PI3K/AKT), envolvidas no processo tumorigênico, pôde-se verificar que todas as cucurbitacinas avaliadas reduziram, principalmente, a fosforilação da AKT. Algumas cucurbitacinas reduziram também a fosforilação da ERK, inclusive em células A549, previamente estimuladas com TNFα. Este fato, além da baixa concentração necessária para exercer tais efeitos, fez com que três dos compostos fossem selecionados para a continuidade dos estudos, sendo eles as cucurbitacinas B (n^o **19**) e seus derivados semissintéticos números **37** e **39**, e estes efeitos foram novamente avaliados por Western blotting, como pode ser visto na Figura 17.

Importante ressaltar que a CUC 19 é um composto natural, conhecido como cucurbitacina B e, pelo fato dos seus efeitos em linhagens tumorais já terem sido bastante descritos, este composto foi incluso no estudo atuando como um controle positivo. Os compostos 37 e 39 são compostos inéditos na literatura, derivados semissintéticos diretos da cucurbitacina B e seus efeitos na redução da fosforilação de AKT e ERK foram até mesmo mais pronunciados do que os exercidos pela CUC 19.

Tabela 5: Perfis de transdução de sinais, em células A549, tratadas com cucurbitacinas, obtidos por Western blotting.

| CUC | Tempo de tratamento | p-AKT | p-ERK | p-NFκB p65 | IκB | p-p38 | p-JNK |
|-----|---------------------|-------|-------|------------|-----|-------|-------|
| 16 | 24h | | | | | | |
| | 48h | | | | | | |
| 18 | 24h | | | | | | |
| | 48h | | | | | | |
| 19 | 24h | | | | | | |
| | 48h | | | | | | |
| 20 | 24h | | | | | | |
| | 48h | | | | | | |

Tabela 5: Perfis de transdução de sinais, em células A549, tratadas com cucurbitacinas, obtidos por Western blotting. Continuação.

| CUC | Tempo de tratamento | p-AKT | p-ERK | p-NFκB p65 | IκB | p-p38 | p-JNK |
|-----|---------------------|-------|-------|------------|-----|-------|-------|
| 37 | 24h | | | | | | |
| | 48h | | | | | | |
| 39 | 24h | | | | | | |
| | 48h | | | | | | |
| 43 | 24h | | | | | | |
| | 48h | | | | | | |

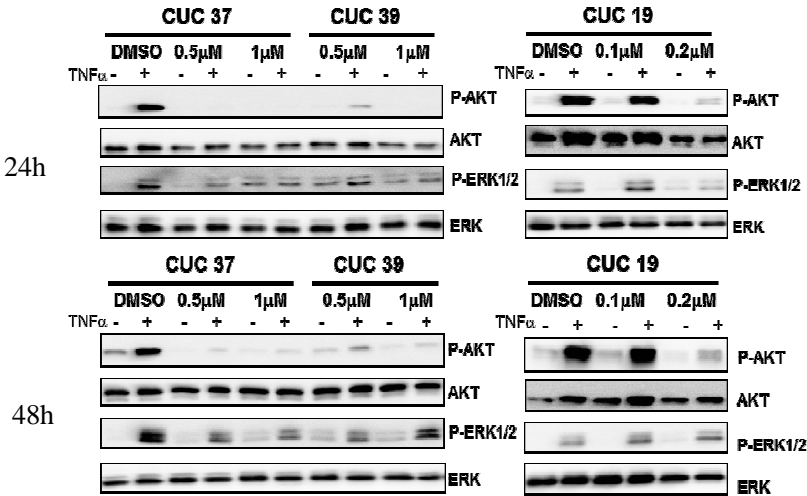


Figura 17: Efeito das cucurbitacinas na expressão de proteínas das vias AKT e ERK. As células foram tratadas por 24 ou 48 h nas concentrações indicadas. Posteriormente, foi empregado o TNF α como um indutor das vias de sinalização por 15 min antes de serem lisadas e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de três experimentos independentes.

Devido ao pronunciado efeito dos compostos na fosforilação da AKT, esta via foi selecionada para ser estudada mais detalhadamente no intuito de elucidar em qual nível desta cascata estes compostos estariam atuando. Portanto, o próximo passo foi avaliar o efeito destes compostos na fosforilação de mediadores localizados acima da AKT na via PI3K, tais como PTEN, PDK1 e o próprio PI3K. Como pode ser verificado na Figura 18, a fosforilação de PI3K foi fortemente inibida, nos dois tempos de tratamento empregados (24 e 48 h), sem alteração dos outros intermediários (PTEN e PDK1).

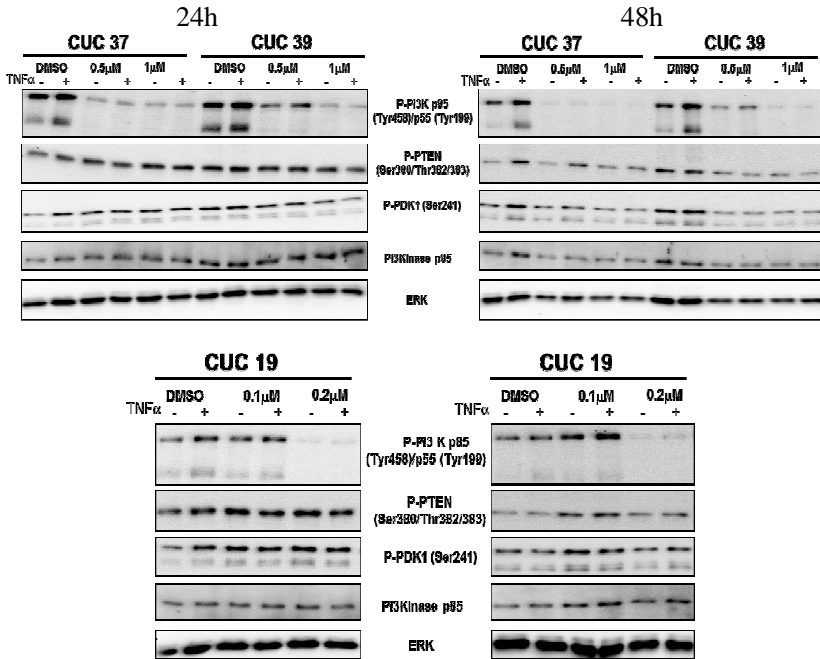


Figura 18: Efeito das cucurbitacinas na fosforilação de intermediários da via de sinalização PI3K. As células foram tratadas por 24 ou 48 h nas concentrações indicadas e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de três experimentos independentes.

O próximo passo do estudo foi avaliar o efeito das cucurbitacinas na fosforilação dos receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), uma vez que eles transmitem sinais, através das vias de sinalização PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK e JAK/STAT3, acarretando alterações na expressão de genes importantes para a regulação da proliferação celular, sobrevivência e oncogênese. Para isso, células A549 transfectadas com o EGFR, as quais superexpressam este receptor, foram tratadas com as cucurbitacinas por 24 h. O mesmo procedimento foi realizado com as células controle, as quais foram transfectadas com o vetor vazio. A seguir, a fosforilação de um sítio específico de EGFR (Tirosina 1068), os níveis de EGFR, e as fosforilações de AKT e ERK foram analisados por Western blotting.

Como pode ser verificado na Figura 19, após 24 h de exposição, especialmente à cucurbitacina 37, o grau de fosforilação do EGFR, assim como de sua forma não fosforilada, bem como as fosforilações de AKT e ERK foram reduzidas em células A549 tranfectadas com o vetor vazio ou com o gene para EGFR. Além disso, o efeito aqui verificado corrobora o efeito inibitório sobre as vias PI3K/AKT e RAF/ERK, especialmente quando as células foram tratadas com o composto n° 37 (conforme já foi discutido no capítulo III).

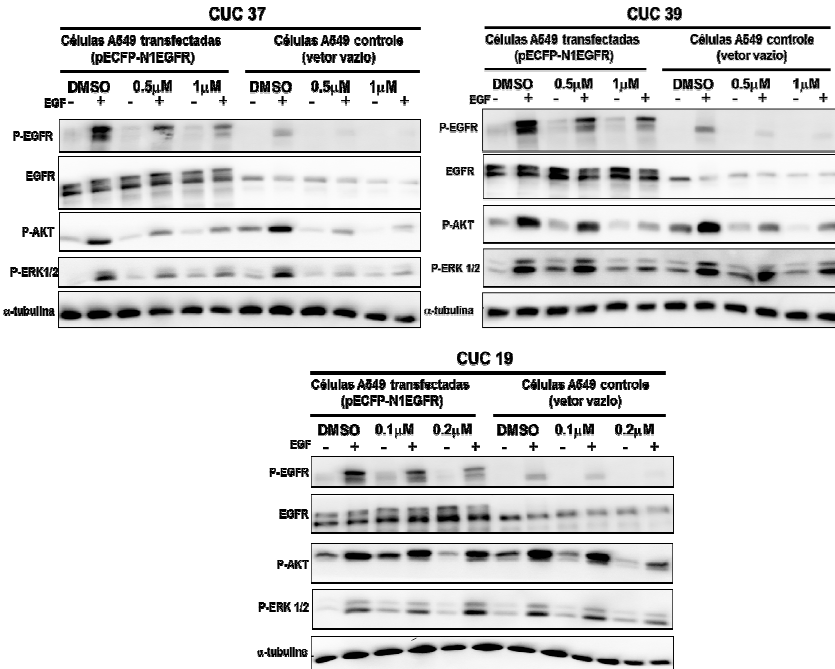


Figura 19: Efeito das cucurbitacinas sobre os receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR) e as principais vias deflagradas por sua ativação (AKT e ERK). As células A549 tranfectadas ou não foram tratadas por 24 h nas concentrações indicadas. Posteriormente, foi empregado o EGF como um indutor das vias de sinalização por 15 min antes de serem lisadas e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de três experimentos independentes.

4. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DAS CUCURBITACINAS MAIS ATIVAS

Outro aspecto investigado foi o grau de seletividade das cucurbitacinas mais ativas frente a células tumorais e células saudáveis, empregando-se, num primeiro momento, fibroblastos saudáveis oriundos de cultura primária de tecido gengival humano (protocolo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, número 021/2009). Para tal, foi empregado o ensaio colorimétrico do MTT, sob as mesmas condições descritas no capítulo I. Os resultados obtidos estão compilados na Tabela 6.

Tabela 6: Comparação de citotoxicidade das cucurbitacinas mais ativas frente a células saudáveis (fibroblastos) e tumorais (A549).

| Amostra | CC ₅₀ ^a | | |
|-------------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------|
| | Fibroblastos saudáveis | Células A549 | IS ^b (CC _{50FIB} /CC _{50A549}) |
| 16 | 43,04 ± 2,86 | 10,590 ± 1,344 | 4,25 |
| 18 | 132,95 ± 24,11 | 13,512 ± 1,846 | 9,84 |
| 19 | 11,42 ± 4,14 | 0,119 ± 0,018 | 95,92 |
| 20 | 86,07 ± 4,16 | 11,497 ± 0,484 | 7,48 |
| Paclitaxel | >10 | 0,211 ± 0,035 | > 47,39 |

^aCC₅₀ = Concentração tóxica a 50% das células após 48 h de tratamento expressa como valores de CC₅₀ (µM); Valores representam a média ± D.P. de três experimentos independentes.

^bIS: Índice de seletividade; neste caso é o valor que demonstra qual o menos tóxico é o composto para uma célula saudável quando comparada a uma linhagem tumoral.

Num segundo momento, já durante a realização do estágio sanduíche, a seletividade da CUC 19 foi novamente avaliada, juntamente com as CUCs 37 e 39, mas empregando-se desta vez, fibroblastos murinos (NIH3T3) e suas linhagens transfectadas com os oncogenes RAS e RAF, os quais conferem um caráter altamente oncogênico à estas células. Os resultados obtidos estão compilados na Tabela 7.

Tabela 7: Comparação de citotoxicidade das cucurbitacinas mais ativas frente a células saudáveis (NIH3T3) e transfectadas com oncogenes (NIH3T3/k-RAS e NIH3T3/v-RAF).

| Amostra | CC ₅₀ ^a | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Intervalo de Confiança 95% | | | | |
| | NIH3T3 | NIH3T3/k-RAS | IS NIH3T3/ NIH3T3/kRAS | NIH3T3/v-RAF | IS NIH3T3/ NIH3T3/vRAF |
| 19 | 41,882 21,208-82,708 | 10,343 2,044-52,343 | 4,1 | 0,346 0,120-0,995 | 121,1 |
| 37 | 17,592 9,872-31,349 | 3,559 1,612-7,857 | 4,9 | 0,561 0,316-0,998 | 31,4 |
| 39 | 16,615 9,450-29,215 | 2,594 1,300-5,177 | 6,4 | 0,444 0,292-0,674 | 37,4 |
| Estau- rosporina | 0,069 0,029-0,165 | 12,728 0,748-21,643 | ND | 0,064 0,048-0,088 | 1,1 |

^aCC₅₀ = Concentração tóxica a 50% das células após 48 h de tratamento expressa como valores de CC₅₀ (µM). Para determinação de CC₅₀, os dados experimentais foram analisados por regressão não linear e calculados utilizando log(composto) comparado com a resposta normalizada (slope variável), através do software GraphPad Prism®.

^b IS: Índice de seletividade: calculado como CC₅₀ NIH3T3 normal / CC₅₀ NIH3T3/v-RAF ou CC₅₀ NIH3T3 normal / CC₅₀ NIH3T3/k-RAS

ND= Não determinado, pois a estaurosporina foi mais tóxica para as células NIH3T3 saudáveis do que para as linhagens oncogênicas.

A CUC 19, a qual corresponde à molécula líder da série (cucurbitacina B), mostrou-se cerca de 95 e 121 vezes mais seletiva para as células A549 e NIH3T3/v-RAF, respectivamente, sendo estes valores maiores que os do paclitaxel e da estaurosporina, utilizados como controles positivos destes experimentos. As demais CUCs, especialmente as CUCs 37 e 39, também apresentaram maior toxicidade em relação às células tumorais, quando comparada aos valores de CC₅₀, obtidos em fibroblastos saudáveis.

Sabe-se que o objetivo da terapia farmacológica antineoplásica é a toxicidade seletiva, ou seja, a inibição de vias ou de alvos, que são críticos para a sobrevivência e a replicação de células tumorais, em

concentrações abaixo daquelas necessárias para afetar as células saudáveis do hospedeiro. A seletividade pode ser obtida ao se direcionar a terapia a alvos exclusivos das células tumorais, que não estejam presentes em células saudáveis, ou a vias de sinalização e receptores superexpressos em células tumorais. Este é o caso dos receptores de EGF, uma vez que eles são reconhecidamente superexpressos em 40 a 75 % dos casos de CPCNP, acompanhados também pela ativação constitutiva das principais proteínas efetoras de EGFR, tais como PI3K/AKT, RAF/ERK e STAT3, que são alvos potenciais para intervenção terapêutica, com certo grau de seletividade.

De forma geral, as cucurbitacinas avaliadas neste estudo bloquearam as células A549 na fase G2/M do ciclo celular e induziram o processo apoptótico, com a participação das enzimas efetoras desta via, as capases-3. Com exceção da CUC 16, este efeito pode estar relacionado, ao menos em parte, com a supressão da fosforilação de STAT3 por tais compostos, e conseqüente redução da transcrição de genes antiapoptóticos (tais como Bcl-2, survivina e ciclina B1), efeito bastante descrito na literatura para outros compostos da classe das cucurbitacinas. Ao se avaliar outras vias de sinalização (MAP quinases, e PI3K/AKT), também envolvidas no processo tumorigênico, pôde-se verificar que todas as cucurbitacinas selecionadas e avaliadas durante o estágio sanduíche, reduziram, principalmente, a fosforilação da AKT, porém algumas cucurbitacinas reduziram também a fosforilação da ERK, inclusive em células A549, previamente estimuladas com TNF α . Este fato chamou a atenção para dois compostos inéditos até o momento (as CUCs 37 e 39), os quais correspondem a derivados semissintéticos da conhecida cucurbitacina B. Estes compostos, em especial a CUC 37 (a qual teve seu mecanismo detalhadamente descrito no capítulo III desta tese de doutoramento), atuou diretamente sobre os receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), inclusive em células onde os mesmos encontravam-se superexpressos, fato não descrito até o momento para cucurbitacinas. Este efeito causou redução da expressão de todas as vias localizadas abaixo deste receptor (ERK, PI3K/AKT e STAT3), fato confirmado pela redução da expressão de intermediários destes processos. O efeito antitumoral da CUC 37 foi avaliado e confirmado num modelo de tumor de pulmão, em camundongos geneticamente modificados (ver capítulo III), o que novamente confirma o potencial deste composto como um futuro fármaco quimioterápico.

4 DISCUSSÃO GERAL

Buscando contemplar o objetivo principal deste trabalho, que consistiu em ampliar o conhecimento científico disponível sobre cucurbitacinas focando no seu potencial como quimioterápico, primeiramente, um conjunto de 33 cucurbitacinas (Quadro 2 do Capítulo I), foram avaliados em relação ao seu perfil citotóxico, frente a diferentes linhagens de células tumorais, através do ensaio colorimétrico do MTT.

As linhagens tumorais utilizadas nesta primeira triagem citotóxica foram: A549 (câncer de pulmão de células não-pequenas), RD (rabdomiocarcinoma), KB (carcinoma nasofaríngeo), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) e N2A (neuroblastoma murinho). Neste primeiro grupo de compostos avaliados, as cucurbitacinas mais citotóxicas frente às cinco linhagens celulares tumorais foram as de números 13, 16, 18, 19, 20, 29 e 31, com valores de CC_{50} variando de 0,013 a 11,454 μ M.

O composto 13 é uma cucurbitacina natural, já bastante estudada, conhecida como cucurbitacina R, com elevada ação citotóxica, sendo que tal atividade já foi relatada por outros grupos de pesquisadores (ESCANDELL et al., 2008; CHEN et al., 2009), tendo sido decidido, por este motivo, descontinuar sua avaliação.

Os compostos **16** e **18** são cucurbitacinas naturais inéditas, isoladas das raízes de *Wilbrandia ebracteata*, e seu isolamento, caracterização estrutural e avaliação da sua ação citotóxica foram descritos no trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (LANG et al., 2011; **Capítulo I**).

O composto **19** (cucurbitacina B) já foi extensivamente estudado no que diz respeito ao mecanismo de sua ação citotóxica (HARITUNIANS et al., 2008; YIN et al., 2008; WAKIMOTO et al., 2008; THOENNISSSEN et al., 2009; CHAN et al., 2010a,b; LIU et al., 2010; YASUDA et al., 2010; JIN et al., 2011; KAUSAR et al., 2013; PROMKAN et al., 2013), motivo pelo qual ele foi selecionado para a realização dos estudos de mecanismo como um controle positivo dos experimentos.

O composto 29, apesar de induzir a morte celular em baixas concentrações, frente às linhagens celulares tumorais avaliadas, corresponde a um intermediário de reação extremamente instável, tendo sido decidido, por este motivo, descontinuar sua avaliação.

As CUCs **20** e **31**, derivados semissintéticos (DeCUCs) da cucurbitacina B, apresentaram atividade citotóxica promissora, fazendo parte dos compostos selecionados, para a elucidação do mecanismo de morte celular.

Num segundo momento da realização desta tese, foram fornecidos para avaliação mais 18 compostos (números 34 a 51, do Quadro 2), os quais são derivados semissintéticos da cucurbitacina B e da diidrocurcubitacina B, e também alguns glicosídeos (números 47 a 50). Por questões práticas, estes compostos foram avaliados somente em células A549, uma vez que essa linhagem já havia sido eleita para a avaliação de mecanismo de ação de morte celular dos compostos mais ativos. Deste segundo grupo, três derivados semissintéticos da cucurbitacina B (números **37**, **39** e **43**) foram citotóxicos, fazendo parte do grupo dos oito compostos selecionados para avaliação do mecanismo de morte, como descrito a seguir.

Portanto, entre os 51 compostos avaliados durante a triagem citotóxica, oito deles (três cucurbitacinas naturais e cinco derivados semissintéticos da cucurbitacina B) tiveram seu mecanismo de morte celular *in vitro* investigado. Baseado na potência antiproliferativa *in vitro*, os compostos que apresentaram valores de $CC_{50} \leq 11,5 \mu\text{M}$, após 72 h de exposição às células A549, foram selecionados para a etapa de investigação subsequente (Figura 20).

Selecionados os compostos mais ativos, partiu-se para uma etapa de análise dos mecanismos de ação *in vitro*. Assim, alguns dos compostos selecionados foram descartados baseados nos critérios abaixo:

✓ a CUC 16 foi eliminada em razão de seu efeito negativo quanto à inibição da STAT3, em células A549;

✓ a CUC 18 teve apenas seu mecanismo citotóxico *in vitro* elucidado. Esta investigação foi publicada em um periódico da área (**Capítulo II**);

✓ a CUC 19, também denominada cucurbitacina B, é a estrutura mais estudada dentre as cucurbitacinas, portanto ela foi eliminada para dar prioridade aos compostos inéditos na série;

✓ a CUC 20, um derivado acetilado da CUC 19, apresentou mecanismo bastante semelhante ao da sua precursora, porém com um valor de $CC_{50} \sim 100$ vezes maior, além de não ter inibido efetivamente a fosforilação de ERK (Tabela 5);

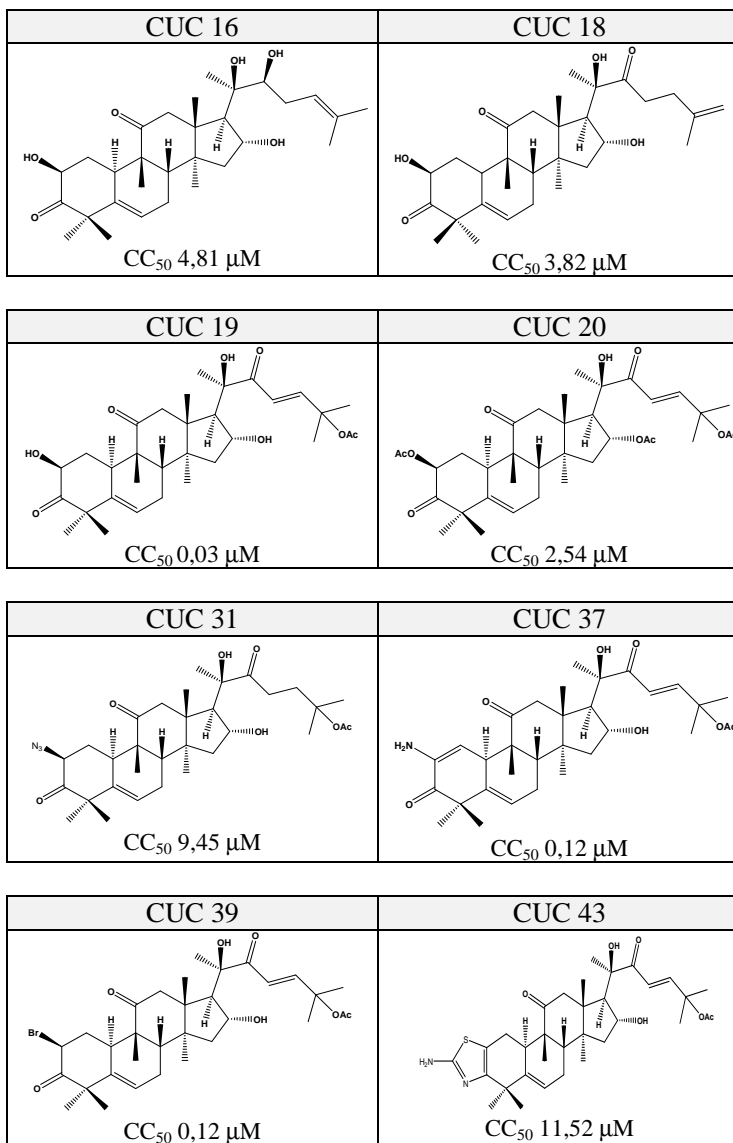


Figura 20: Estruturas e valores de CC_{50} das oito cucurbitacinas selecionadas para avaliação do mecanismo de morte celular.

✓ a CUC 31, também derivado semissintético da CUC 19, não alterou a distribuição das células A549 nas diferentes fases do ciclo celular, bem como não induziu morte celular por apoptose, razão pela qual este composto foi eliminado já nas etapas iniciais do estudo do mecanismo de morte celular (Figuras 9D e 10D);

✓ a CUC 43, outro derivado semissintético da CUC 19, apresentou um valor de CC₅₀, frente às células A549, mais elevado do que o valor demonstrado pelos demais compostos selecionados após 48h e 72 h de tratamento, além de não ter sido capaz de inibir a fosforilação de ERK em células A549 tratadas (Tabela 5).

Os dois compostos mais promissores restantes, as CUCs 39 e 37, apresentaram um perfil de morte celular bastante semelhante, com valores de CC₅₀ de 0,12 μ M após 72 h de exposição. A fim de direcionar a escolha do composto ideal, uma análise em detalhes dos resultados obtidos com ambos os compostos, revela que a CUC 37 apresentou algumas características que a destacaram em relação à CUC 39. A CUC 37 reduziu mais eficientemente a fosforilação de AKT e ERK, inclusive em células cujos receptores EGFR encontravam-se superexpressos, além de ter apresentado um valor de CC₅₀ em torno de três vezes menor (0,42 μ M), que o valor de CC₅₀ da CUC 39 (1,33 μ M), quando o tempo de exposição às células A549 foi reduzido para 48 h.

Como ilustrado na Figura 21, diversos filtros foram sendo aplicados, no sentido de selecionar também o candidato ideal para os estudos *in vivo*. As restrições basearam-se acima de tudo na potência da atividade antiproliferativa *in vitro*, nas vias de sinalização afetadas pelos compostos, ou seja, o seu mecanismo de morte celular, e nas características físico-químicas que determinam as suas propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade). Em conjunto, esses fatores determinam o quão promissor é um composto para o desenvolvimento farmacêutico.

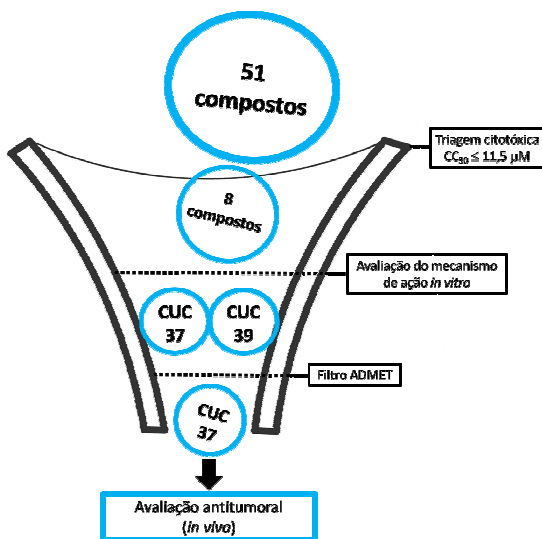


Figura 21: Esquema de seleção dos compostos avaliados.

Para a determinação do candidato ideal para os estudos *in vivo*, foi levado em conta o fato de que questões relativas à absorção, metabolismo e toxicidade de medicamentos continuam a representar um sério problema para o P&D na indústria farmacêutica, e que o *approach* multifatorial, de otimização de diversas propriedades simultaneamente, tem se mostrado efetivo. Isso tem estimulado esforços para o desenvolvimento de modelos preditivos que possam auxiliar na seleção de compostos com um perfil ADMET mais desejável, ainda no início da cadeia científica. Tais modelos visam correlacionar algumas propriedades físico-químicas com a farmacocinética e toxicidade *in vivo* dos compostos.

Nesse sentido, a Regra de Lipinski ou “*Rule of Five*” tem sido bastante útil na predição da absorção oral de fármacos. Através da análise de propriedades físico-químicas, e o estabelecimento de valores restritivos para cada uma delas, os compostos podem ser classificados entre si baseados na maior ou menor probabilidade de serem absorvidos. Os valores preconizados por tal regra são os seguintes: peso molecular < 500 g/mol, número de grupamentos doadores de hidrogênio < 5, número de grupamentos aceptores de hidrogênio < 10 e coeficiente

de partição octanol-água (clogP) < 5 . Desde que dois destes valores não sejam violados em uma mesma molécula, há boas chances desta ter $>80\%$ de biodisponibilidade oral (LIPINSKI et al., 1997; KERNS et al., 2008).

Conforme demonstrado no quadro abaixo (Quadro 3), pode-se perceber que ambas as moléculas selecionadas até esta etapa apresentam boa predição de biodisponibilidade oral, entretanto, a CUC 37 possui peso molecular muito mais próximo ao cut-off de 500 g/mol, fato que poderia representar uma vantagem competitiva em relação à CUC 39.

Quadro 3: Quadro comparativo das propriedades físico-químicas e biológicas das cucurbitacinas selecionadas.

| CUC | PM | clogP | H aceptores | H doadores | TPSA | CC ₅₀ 48h (μM) | CC ₅₀ 72h (μM) |
|-----|-------|----------------|----------------|---------------|--------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 37 | 555,7 | 2,85 | 7 | 3 | 143,99 | 0,42 | 0,12 |
| 39 | 621,6 | 4,67 | 6 | 2 | 117,97 | 1,33 | 0,12 |

PM: peso molecular; H aceptores: n° de grupamentos aceptores de hidrogênio; H doadores: n° de grupamentos doadores de hidrogênio; TPSA: *topological surface area*.

Os valores foram preditos através do software Instant JChem 5.5.1 ChemAxon®.

Em vermelho estão representados os valores que violaram a Regra de Lipinski e em verde os valores dentro dos limites preconizados.

Paralela à pura análise das propriedades afetadas pela Lei de Lipinski foi realizada a predição *in silico* da solubilidade aquosa, estabilidade metabólica e toxicidade dos compostos, através das plataformas *Virtual Computational Chemistry Laboratory* (www.vcclab.org) e *Tox-Portal* (www.tox-portal.net), a fim de dar suporte para a tomada de decisão. Em relação à solubilidade, para a CUC 39 foi obtido um valor de 2,16 $\mu\text{g/mL}$, consideravelmente mais baixo que a solubilidade teórica da CUC 37 (9,44 $\mu\text{g/mL}$). Uma vez que não houve diferenças entre as predições das estabilidades metabólicas das duas moléculas, e os dados preliminares de permeabilidade intestinal *in vitro* das moléculas se mostraram similares (dados não mostrados), a solubilidade superior da CUC 37 nos fluidos biológicos é determinante para a obtenção de concentrações plasmáticas adequadas para uma ação antitumoral *in vivo*, e motivaram a escolha dessa molécula em detrimento da CUC 39, tendo em vista a importância desses fatores na biodisponibilidade de fármacos.

Adicionalmente, outro ponto a ser considerado é a toxicidade inespecífica dos compostos e o surgimento de efeitos adversos à quimioterapia. Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de prever os efeitos adversos de fármacos em desenvolvimento, e dentre eles os trabalhos de Hugues e colaboradores, e Lu e colaboradores são muito relevantes. Esses estudos indicam que compostos cujos valores de $\text{clog}P$ sejam iguais ou próximos à 2, e os valores de TPSA (*topological surface area*) sejam superiores a 75 apresentam menor probabilidade de efeitos tóxicos *in vivo*. Neste contexto, o valor calculado do $\text{clog}P$ da CUC 39 foi 4,67, enquanto que o da CUC 37 foi 2,85, sendo mais um indicativo de que a CUC 37 deveria ser o composto selecionado para a continuidade do estudo (HUGHES et al., 2008; LU et al., 2012). Em relação à TPSA, ambos os compostos satisfazem este pré-requisito. Outro ponto importante a ser considerado é a toxicidade inerente aos compostos bromados, os quais vêm sendo relacionados a problemas neurodegenerativos, câncer e alterações no sistema imune (BUDNIK et al., 2012; DOMINGO, 2012). Em resumo, considerando as características biofarmacêuticas superiores da CUC 37, esse composto foi eleito para a avaliação de seu efeito antitumoral *in vivo*, que será discutido adiante neste capítulo.

Este novo derivado semissintético da cucurbitacina B, a CUC 37 (descrita como DeCUCB83 no capítulo III desta tese), mostrou-se mais citotóxico para as células A549 do que o próprio controle positivo paclitaxel, e foi avaliado também em relação a sua seletividade para células tumorais. Neste caso, foram empregados, para fins de comparação, fibroblastos murinos saudáveis e os mesmos transfectados com os oncogenes RAS e RAF (NIH3T3/v-RAF e NIH3T3/k-RAS), os quais conferem um caráter altamente oncogênico a estas linhagens. Os resultados mostraram que este composto foi cerca de 30 e 4 vezes mais tóxico para as células NIH3T3/v-RAF e NIH3T3/k-RAS, respectivamente, sugerindo certa seletividade para células tumorais.

Pela primeira vez, está sendo aqui demonstrado que um composto da classe das cucurbitacinas, atua diretamente sobre os receptores de fator de crescimento epidérmico, suprimindo sua fosforilação de maneira concentração-dependente, tanto em células A549 transfectadas, as quais superexpressam estes receptores, quanto em células A549 transfectadas com o vetor vazio. Este efeito foi acompanhado pela inibição de todas as vias normalmente controladas

por estes receptores, tais como, PI3K/AKT, RAS/ERK e STAT3. Estes receptores, bem como estas vias de sinalização, encontram-se superexpressos em grande parte dos casos de CPCNP, e acarretam alterações na expressão de genes importantes da tumorigênese, incluindo aqueles envolvidos na progressão do ciclo celular, indução do processo apoptótico, angiogênese, invasão e metástase. A título de exemplo, o STAT3 protege as células tumorais do processo apoptótico, através da superregulação de genes de sobrevivência, tais como Bcl-2, Mcl-1 e survivina (FLETCHER et al., 2009). Já o ERK, após ativação por fosforilação, também induz a transcrição de Bcl-2 e ciclina D1, enquanto que a AKT ativada, exerce sua atividade antiapoptótica, ao menos em parte, prevenindo a liberação de citocromo *c* da mitocôndria, inibindo o início do ponto de checagem da fase G2/M do ciclo celular e, inativando diretamente fatores pró-apoptóticos como Bad e procaspase-9 (HERRERA; SEBOLT-LEOPOLD, 2002; FRESNO VARA et al., 2004).

De fato, este composto bloqueou, eficientemente, as células A549 na fase G2/M do ciclo celular, o que pode estar em parte, relacionado à redução da expressão de um importante regulador positivo do ciclo celular, a ciclina B1, além de ter induzido apoptose nas células A549. A indução deste tipo de morte celular foi quantificada por citometria de fluxo, utilizando-se a marcação com Anexina V. Também foi confirmada a participação da enzima efetora deste processo, a caspase-3, tanto por um ensaio colorimétrico, quanto pela detecção da expressão de sua forma clivada ativa por Western blotting. Além disso, a redução da expressão de survivina, uma proteína inibidora de apoptose, contribuiu em parte para a indução da morte celular. Estes resultados estão em concordância com achados recentes, os quais demonstraram que outras cucurbitacinas também induziram bloqueio na fase G2/M do ciclo celular e apoptose em outras linhagens tumorais *in vitro* (TANNIN-SPITZ et al., 2007; YASUDA et al., 2010; ZHU et al., 2012).

Após os primeiros relatos de que as cucurbitacinas eram potentes inibidores de STAT3 (BLASKOVICH et al., 2003), um pequeno estudo de “relação estrutura-atividade” com cinco diferentes cucurbitacinas, demonstrou que, ao se adicionar um grupamento hidroxila no carbono 19 destes compostos, como ocorre na cucurbitacina A, ocorreu a perda da capacidade de inibir o STAT3 (SUN et al., 2005). Isto demonstra que a inibição de STAT3 depende das

características estruturais das cucurbitacinas e a CUC 37, a qual não apresenta o grupamento OH nesta posição da molécula, reduziu eficientemente a fosforilação de STAT3, corroborando este resultado.

A CUC 37 também induziu uma severa mudança conformacional e desestruturação dos filamentos de actina do citoesqueleto de células A549 tratadas por 12h. Durante o processo apoptótico, ocorre a clivagem de filamentos intermediários de proteínas do citoesqueleto que compõem a estrutura celular, sendo a actina uma dessas proteínas clivadas (YAMAZAKI et al., 2000). Estes resultados estão em concordância com diversos achados que também descreveram o efeito das cucurbitacinas sobre o citoesqueleto de outras linhagens tumorais *in vitro* (MUSZA et al., 1994; DUNCAN et al., 1996; GRANESS et al., 2006; ESCANDELL et al., 2008; HARITUNIANS et al., 2008; MOMMA et al., 2008; YIN et al., 2008; WAKIMOTO et al., 2008; KNECHT et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2012a).

Além disso, pela primeira vez, o potencial antitumoral de um composto da classe das cucurbitacinas foi avaliado num modelo bem estabelecido de tumores de pulmão em camundongos, obtido por direcionar a c-RAF quinase constitutivamente ativada para os pulmões desses animais (camundongos c-RAF-1-BxB geneticamente modificados) (KERKHOFF et al., 2000). A CUC 37 também reduziu a fosforilação de ERK *in vitro*, o qual está localizado abaixo de RAF nesta via oncogênica, tanto em células A549 quanto em células NIH3T3, transfectadas com este oncogene, o que se tornou um valioso indicativo da efetividade deste composto em reduzir tumores também *in vivo*. O tratamento de camundongos de quatro meses de idade com 1 mg/kg da CUC 37, aplicado intraperitonealmente a cada dois dias, durante 21 dias, não suprimiu efetivamente o crescimento tumoral (apenas 16% de redução em relação ao grupo controle). Contudo, quando a mesma dose de CUC 37 foi administrada todos os dias, durante o mesmo período de tempo (21 dias), o tamanho dos tumores foi significativamente reduzido (56%), quando comparado ao grupo controle não tratado. Isto pôde ser visualizado diretamente nos pulmões, através da técnica de imunohistoquímica, com posterior análise e medida do tamanho dos tumores, e também medindo-se a quantidade de C-RAF-BxB expressa, por Western blotting, tendo sido detectada uma correlação positiva entre estes parâmetros avaliados. Uma representação esquemática do mecanismo de ação proposto para este composto pode ser visualizado na Figura 22.

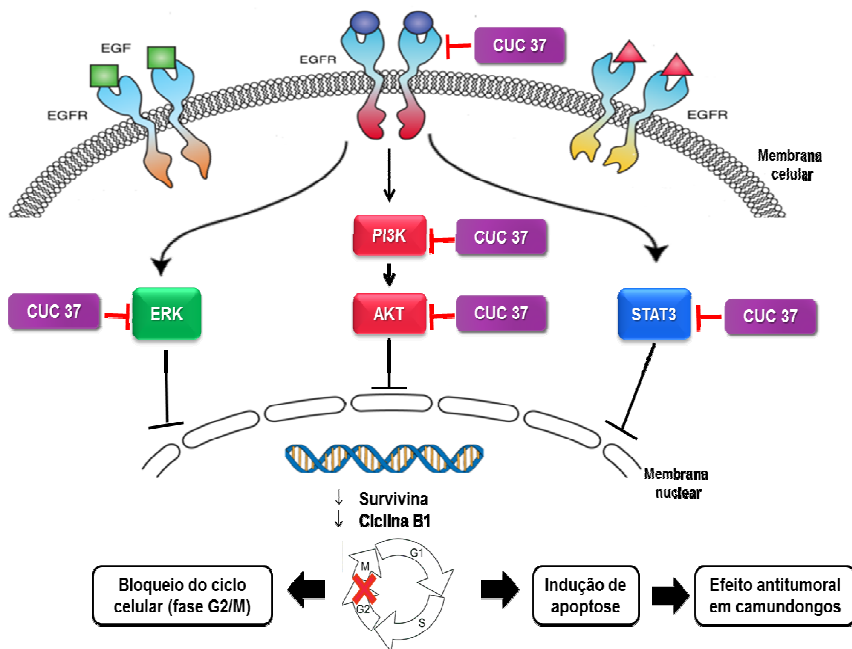


Figura 22: Representação esquemática do mecanismo da ação citotóxica da CUC 37, em células A549.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram o potencial *in vitro* e *in vivo* da CUC 37 a ser desenvolvida como um fármaco quimioterápico. Além disso, a avaliação do mecanismo de ação das outras cucurbitacinas da série confirmou a principal propriedade biológica desta classe de compostos, que é seu potencial citotóxico.

5 CONCLUSÕES

- ✓ As sete cucurbitacinas mais citotóxicas frente às linhagens celulares tumorais testadas foram as de números 13, 16, 18, 19, 20, 29 e 31, com valores de CC_{50} variando de 0,013 a 11,454 μM . Além desses compostos, dois derivados semissintéticos da cucurbitacina B (números 37 e 39) destacaram-se pela potente ação citotóxica, com valores de CC_{50} de 0,42 e 1,33 μM , respectivamente.
- ✓ Foi elucidado o mecanismo de morte celular provocada pelas cucurbitacinas mais ativas.
- ✓ A CUC 18, uma cucurbitacina natural inédita obtida a partir das raízes de *Wilbrandia ebracteata*, induziu apoptose em células A549, bloqueou estas células na fase G2/M do ciclo celular e provocou desestruturação do citoesqueleto. Estes efeitos foram atribuídos à inibição das vias STAT3 e AKT, o que acarretou na baixa expressão de Bcl-2. Este efeito consequentemente induziu a liberação do citocromo *c* da mitocôndria para o citosol, que é necessária para a ativação das caspases 9 e 3, levando à indução do processo apoptótico.
- ✓ A CUC 37, um novo derivado semissintético da cucurbitacina B, também induziu apoptose, bloqueio na fase G2/M do ciclo celular e desestruturação do citoesqueleto de células A549, porém em concentrações 30 vezes mais baixas do que as da CUC 18.
- ✓ A CUC 37 atuou diretamente sobre os receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR), causando a redução da expressão de todas as vias localizadas abaixo deste receptor (ERK, PI3K/AKT e STAT3) e, consequentemente, reduzindo a transcrição de genes alvos das mesmas. Entre eles pôde-se verificar a redução da ciclina B1 e da survivina, as quais contribuíram para a parada de ciclo e indução do processo apoptótico. Além disso, houve participação da caspase 3 no processo induzido.
- ✓ Todas as cucurbitacinas selecionadas, por terem sido mais ativas, reduziram a fosforilação da AKT, porém somente as CUCs 37 e 39, reduziram também a fosforilação da ERK, inclusive em células A549, previamente estimuladas com $\text{TNF}\alpha$.

✓ Ao se avaliar a seletividade das cucurbitacinas B (CUC 19), 37 e 39 em fibroblastos murinos (NIH3T3) e suas linhagens transfectadas com os oncogenes RAS e RAF, verificou-se que a cucurbitacina B mostrou-se 121 vezes mais seletiva para as células NIH3T3/v-RAF. A CUC 37 também apresentou maior toxicidade em relação às linhagens oncogênicas (NIH3T3/v-RAF e NIH3T3/k-RAS).

✓ O efeito antitumoral da CUC 37 foi confirmado num modelo de tumor de pulmão, utilizando-se camundongos geneticamente modificados (c-RAF-1-BxB), o que apontou para o potencial deste composto como um potencial fármaco quimioterápico, especialmente pelo fato dele inibir os EGFR, sendo este mecanismo de ação comum ao dos novos fármacos empregados com maior sucesso no tratamento de casos avançados de CPCNP.

REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; VINCOURT, J-B.; HABIB, L.; NETTER, P.; GREIGE-GERGES, H.; MAGDALOU, J. The cucurbitacins E, D and I: Investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver. **Toxicology Letters**, v. 216, p. 189 – 199, 2013.

ABDELWAHAB, S.I.; HASSAN, L.E.; SIRAT, H.M.; YAGI, S.M.; KOKO, W.S.; MOHAN, S.; TAHA, M.M.; AHMAD, S.; CHUEN, C.S.; NARRIMA, P.; RAIS, M.M. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. citroides: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. **Fitoterapia**, v. 82, 1190-1197, 2011.

ABDELWAHAB, S.I.; HASSAN, L.; E.; ABDUL MAJID, A.M.; YAGI, S.M.; MOHAN, S.; ELHASSAN TAHA, M.M.; AHMAD, S.; CHUEN, C.S.; NARRIMA, P.; RAIS, M.M.; SYAM, S.; MOHARAM, B A.; HADI, A.H. Cucurbitacin L 2-O-beta-Glucoside demonstrates apoptogenesis in colon adenocarcinoma cells (HT-29): involvement of reactive oxygen and nitrogen species regulation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

AGIL, A.; MIRÓ, M.; JIMENEZ, J.; ANEIROS, J.; CARACUEL, M.D.; GARCIA-GRANADOS, A.; NAVARRO, M.C. Isolation of an anti-hepatotoxic principle from the juice of *Ecballium elaterium*. **Planta Medica**, v. 65, p. 673-675, 1999.

AHMED, M.S.; HALAWEISH, F.T. Cucurbitacins: potential candidates targeting mitogen-activated protein kinase pathway for treatment of melanoma. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2013. In press.

AL ZAID SIDDIQUEE, K. ; TURKSON, J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. **Cell Research**, v. 18, p. 254-267, 2008.

ALGHASHAM, A.A. Cucurbitacins – A promising target for cancer therapy. **International Journal of Health Sciences**, v. 7, p. 77 – 89, 2013.

ALMEIDA, F.R.C.; RAO, V.S.N.; MATOS, M.E.O. Antiinflammatory, antitumor and antifertility effects in rodents of two nor-cucurbitacins glucosides from *Wilbrandia* species. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 189 - 193, 1992.

ALTOMARE, D.A.; TESTA, J.R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene**, v. 24, p. 7455-7464, 2005.

ARIBI, A.; GERY, S.; LEE, D.H.; THOENNISSSEN, N.H.; THOENNISSSEN, G.B.; ALVAREZ, R.; HO, Q.; LEE, K.; DOAN, N.B.; CHAN, K.T.; TOH, M.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. The triterpenoid cucurbitacin B augments the antiproliferative activity of chemotherapy in human breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 132, p. 2730-2737, 2013.

ARISAWA, M.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents. XXX: cucurbitacins from *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p.411-413, 1984.

ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with proapoptotic receptor agonists. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p.1001-1012, 2008.

AYOOLA, A.; BAROCHIA, A.; BELANI, K.; BELANI, C.P. Primary and acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer: an update. **Cancer Investigation**, v. 30, p. 433-446, 2012.

BELLACOSA et al. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. **Advances in Cancer Research**, v. 94, p. 29-86, 2005.

BENSON, J.R.; LIAU, S.S. Cancer genetics: a primer for surgeons. **Surgical Clinics of North America**, v. 88, p. 681 - 704, 2008.

BLASKOVICH, M.A.; SUN, J.; CANTOR, A.; TURKSON, J.; JOVE, R.; SEBTI, S.M. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin D), 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 Research**, v. 63, p.1270-1279, 2003.

BOIK, J. **Natural Compounds in Cancer Therapy**. Princeton: Oregon Medical Press, 2001, 520 p.

BORGHAEI, H.; SMITH, M.R.; CAMPBELL, K.S. Immunotherapy of cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p.41-54, 2009.

BOYKIN, C.; ZHANG, G.; CHEN, Y.H.; ZHANG, R.W.; FAN, X.E.; YANG, W.M.; LU, Q. Cucurbitacin IIa: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. **British Journal of Cancer**, v. 104, p. 781-789, 2011.

BRASIL/INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRÖKER, L.E.; KRUYT, F.A.E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 3155-3162, 2005.

BROMBERG, J. Stat proteins and oncogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 109, p. 1139 – 1142, 2002.

BUDIHardjo, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review Cell and Developmental Biology**, v.15, p. 269- 290, 1999.

BUDNIK, L.; KLOTH, S.; VELASCO-GARRIDO, M.; BAUR, X. Prostate cancer and toxicity from critical use exemptions of methyl bromide: Environmental protection helps protect against human health risks. **Environmental Health**, v. 11, p. 5, 2012.

BURCHILL, S.A. What do, can and should we learn from models to evaluate potential anticancer agents? **Future Oncology**, v. 2, p. 201-211, 2006.

CAO, S.G.; CHANG, Y.Q.; QU, H.G.; ZHEN, L.H.; WEI, Z.R.; YANG, S.J. Inhibited effects and mechanisms of cucurbitacin B on apoptosis of neonate rat hepatocytes induced by H₂O₂. *Food Science*. v. 26, p. 527-530, 2005.

CAO, Y; DEPINHO, R.A.; ERNST, M.; VOUSDEN, K. Cancer research: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 749-754, 2011.

CASTROP, H. Genetically modified mice-successes and failures of a widely used technology. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, v. 459, p. 557-567, 2010.

CHAN, K.T.; MENG, F.Y.; LI, Q.; HO, C.Y.; LAM, T.S.; TO, Y.; LEE, W.H.; LI, M.; CHU, K.H.; TOH, M. Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. **Cancer Letters**, v. 294, p.118-124, 2010a.

CHAN, K.T.; LI, K.; LIU, S.L.; CHU, K.H.; TOH, M.; XIE, W.D. Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. **Cancer Letters**, v. 289, p.46-52, 2010b.

CHANG, C.J.; CHIANG, C.H.; SONG, W.S.; TSAI, S.K.; WOUNG, L.C.; CHANG, C.H.; JENG, S.Y.; TSAI, C.Y.; HSU, C.C.; LEE, H.F.; HUANG, C.S., YUNG, M.C.; LIU, J.H.; LU, K.H. Inhibition of phosphorylated STAT3 by Cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. **Child's nervous system: ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 28, p. 363 – 373, 2012.

CHEN, C.; QIANG, S.; LOU, L.; ZHAO, W. Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of *Cucumis melo*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 824 – 829, 2009.

CHEN, J.C.; CHIU, M.H.; NIE, R.L.; CORDELL, G.A.; QIU, S.X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: Structures and biological activities. **Natural Product Reports**, v. 22, p.386-399, 2005.

CHEN, Z; HAN, Z.C. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Medicinal Research Reviews*, v. 28, p. 185-200, 2008.

CHEN, W.; LEITER, A.; YIN, D.; MEIRING, M.; LOUW, V.J.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B inhibits growth, arrests the cell cycle, and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 37, p. 737-743, 2010.

CHEN, X., BAO, J., GUO, J., DING, Q., LU, J., HUANG, M.; WANG, Y. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. **Anticancer Drugs**, **23**, v. 8, p. 777-787, 2012.

CHEONG, K.; SPICER, J.; CHOWDHURY, S.; HARPER, P. Combination therapy versus single agent chemotherapy in non-small cell lung cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6, p. 1693-1700, 2005.

CHO, W.C. Targeting signaling pathways in lung cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutics Targets**, v. 17, p. 107-111, 2013.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2013.*In press*.

DAKENG, S.; DUANGMANO, S.; JIRATCHARIYAKUL, W.; U-PRATYA, Y.; BOGLER, O.; PATMASIRIWAT, P. Inhibition of Wnt signaling by Cucurbitacin B in breast cancer cells: Reduction of Wnt associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated beta-catenin to the nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 49-60, 2012.

DANIEL, V.C.; MARCHIONNI, L.; HIERMAN, J.S.; RHODES, J.T.; DEVEREUX, W.L.; RUDIN, C.M.; YUNG, R.; PARMIGIANI, G.; DORSCH, M.; PEACOCK, C.D.; WATKINS, D.N. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. **Cancer Research**, v. 69, p. 3364-3373, 2009.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; BARRETT REINA, L.D.C.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p.118-129, 2005.

DECAUDIN, D. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer. **Anticancer Drugs**, v. 9, p.827-841, 2011.

DINAN, L.; HARMATHA, J.; LAFONT, R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p.105-123, 2001.

DING, N.; YAMASHITA, U.; MATSUOKA, H.; SUGIURA, T.; TSUKADA, J.; NOGUCHI, J.; YOSHIDA, Y. Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-cell leukemia. **Cancer**, v. 117, p.2735-2746, 2011.

DOMINGO, J.L. Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: A review of the recent scientific literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 238-249, 2012.

DONG, Y.; LU, B.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; LAI, L.; LI, D.; WU, Y.; SONG, Y.; LUO, J.; PANG, X.; YI, Z.; LIU, M. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 2097-2104, 2010.

DOSKOTCH, R.W.; MALIK, M.Y.; BEAL, J.L. Cucurbitacin B the cytotoxic principle of *Begonia tuberhybrida* var. alba. **Lloydia**, v. 32, p. 115-122, 1969.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p.11-22, 2003.

DUANGMANO, S.; DAKENG, S.; JIRATCHARIYAKUL, W.; SUKSAMRARN, A.; SMITH, D.R.; PATMASIRIWAT, P. Antiproliferative effects of cucurbitacin B in breast cancer cells: down-regulation of the c-Myc/hTERT/Telomerase pathway and obstruction of the cell cycle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p.5323-5338, 2010.

DUANGMANO, S.; SAE-LIM, P.; SUKSAMRARN, A.; DOMANN, F.E.; PATMASIRIWAT, P. Cucurbitacin B inhibits human breast cancer cell proliferation through disruption of microtubule polymerization and nucleophosmin/B23 translocation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 185, 2012a.

DUANGMANO, S.; SAE-LIM, P.; SUKSAMRARN, A.; PATMASIRIWAT, P.; DOMANN, F.E. Cucurbitacin B causes increased radiation sensitivity of human breast cancer cells via G2/M cell cycle arrest. **Journal of Oncology**, v. 2012, p. 1-8, 2012b.

DUNCAN, K.L.K.; DUNCAN, M.D.; ALLEY, M.C.; SAUSVILLE, E.A. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 1553 - 1560, 1996.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

ESCANDELL, J.M., RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J.L. Dihydrocucurbitacin B, isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, V. 532, p. 145 – 154, 2006.

ESCANDELL, J.M.; RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J.L. Cucurbitacin R reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in lewis rats by suppression of tumor necrosis factor- α in T lymphocytes

and macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, p.581-590, 2007a.

ESCANDELL, J.M.; RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; GIL-BENSO, R.; RÍOS, J.L. Dihydrocucurbitacin B inhibits delayed type hypersensitivity reactions by suppressing lymphocyte proliferation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, p.1261-1268, 2007b.

ESCANDELL, J.M.; KALER, P.; RECIO, M.C.; SASAZUKI, P.; SHIRASAWA, S.; AUGENLICHT, L.; RIOS, J.L.; KLAMPFER, L. Activated kRas protects colon cancer cells from cucurbitacin-induced apoptosis: The role of p53 and p21. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 198 - 207, 2008.

FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; MAYER, R.; RUCKER, G. Cucurbitacins as constituents of *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, v. 59, p.272-275, 1993.

FIEBIG, H.H.; SCHULER, J.; BAUSCH, N.; HOFMANN, M.; METZ, T.; KORRAT, A. Gene signatures developed from patient tumor explants grown in nude mice to predict tumor response to 11 cytotoxic drugs. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 4, p. 197-209, 2007.

FIRESTONE, B. The challenge of selecting the 'right' in vivo oncology pharmacology model. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 391-396, 2010.

FLETCHER, S.; DREWRY, J.A.; SHAHANI, V.M.; PAGE, B.D.G.; GUNNING, P.T. Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, p. 825-833, 2009.

FOGH, J.; GIOVANELLA, B.C. **The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research**. Academic Press; 1978.

FOX, J.T.; MYUNG, K. Cell-based high-throughput screens for the discovery of chemotherapeutic agents. **Oncotarget**, v. 3, p. 581-585, 2012.

FRESNO VARA, J.A.; CASADO, E.; DE CASTRO, J.; CEJAS, P.; BELDA-INIESTA, C.; GONZALEZ-BARON, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 30, p. 193-204, 2004.

FRUMAN, D.A.; MEYERS, R.E.; CANTLEY, L.C. Phosphoinositide kinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 481-507, 1998.

FUJIMOTO, H.; HAGIWARA, H.; SUZUKI, K.; YAMAZAKI, M. New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. II. Isolation and structures of hebevinosides VI, VII, VIII, IX, X, and XI. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p.2254-2260, 1987.

FULDA, S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, p. 1075-1079, 2010.

FULLER, R.W.; CARDELLINA II, J.H.; CRAGG, G.M.; BOYD, M.R. Cucurbitacins: Differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystylus keithii*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1442 - 1445, 1994.

GALLILY, R.; SHOHAT, B.; KALISH, J.; GITTER, S.; LAVIE, D. Further studies on the antitumor effect of cucurbitacins. **Cancer Research**, v. 22, p. 1038-1045, 1962.

GALLUZZI et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GARCIA, R.; BOWMAN, T.L.; NIU, G.; YU, H.; MINTON, S.; MURO-CACHO, C.A.; COX, C.E.; FALCONE, R.; FAIRCLOUGH, R.; PARSONS, S.; LAUDANO, A.; GAZIT, A.; LEVITZKI, A.; KRAKER, A.; JOVE, R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. **Oncogene**, v. 20, p. 2499-2513, 2001.

GEISSMAN, T.A. New Substances of Plant Origin. **Annual Review of Pharmacology**, v. 4, p.305-316, 1964.

GITTER, S.; GALLILY, R.; SHOHAT, B.; LAVIE, D. Studies on the antitumor effect of cucurbitacins. **Cancer Research**, v. 21, p. 516-521, 1961.

GIOVANELLA, B.C.; YIM, S.O.; STEHLIN, J.S.; WILLIAMS, L.J. Development of invasive tumors in the “nude” mouse after injection of cultured human melanoma cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 48, p.1531-1533, 1972.

GIULIANI, C.M.; DASS, C.R. Autophagy and cancer: taking the “toxic” out of cytotoxics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.65, p.777-789, 2013.

GORDON, J.W.; SCANGOS, G.A.; PLOTKIN, D.J. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 7380-7384, 1980.

GRAZIOSE, R.; GRACE, M.H.; RATHINASABAPATHY, T.; ROJAS-SILVA, P.; DEKOCK, C.; POULEV, A.; LILA, M.A.; SMITH, P.; RASKIN, I. Antiplasmodial activity of cucurbitacin glycosides from *Datisca glomerata* (C. Presl) Baill. **Phytochemistry**, v. 87, p. 78-85, 2013.

GRANESS, A.; POLI, V.; GOPPELT-STRUEBE, M. STAT3-independent inhibition of lysophosphatidic acid-mediated upregulation of connective tissue growth factor (CTGF) by cucurbitacin I. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 32-41, 2006.

GUENEBEAUD, C.; GOLDSCHNEIDER, D.; CASTETS, M.; GUIX, C.; CHAZOT, G.; DELLOYE-BOURGEOIS, C.; EISENBERG-LERNER, A.; SHOHAT, G.; ZHANG, M.; LAUDET, V.; KIMCHI, A.; BERNET, A.; MEHLEN, P. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. **Molecular Cell**, v. 40, p. 863-876, 2010.

HAIL, J. N.; CARTER, B.Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 11, p. 889- 904, 2006.

HAN, S.W.; ROMAN, J. Targeting apoptotic signaling pathways in human lung cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 10, p. 566-574, 2010.

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

HARITUNIANS, T.; GUELLER, S.; ZHANG, L.; BADR, R.; YIN, D.; XING, H.; FUNG, M.C.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 32, p.1366-1373, 2008.

HAURA, E.B.; CRESS, W.D.; CHELLAPPAN, S.; ZHENG, Z.; BEPLER, G. Antiapoptotic signaling pathways in non-small-cell lung cancer: biology and therapeutic strategies. **Clinical Lung Cancer**, v. 6, p. 113-122, 2004.

HE, J.; WANG, Y.; XU, L.H.; QIAO, J.; OUYANG, D.Y.; HE, X.H. Cucurbitacin IIa induces caspase-3-dependent apoptosis and enhances autophagy in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **International Immunopharmacology**, v., p. 2013.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HENSON, E.S.; GIBSON, S.B. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. **Cellular Signalling**, v. 18, p. 2089-2097, 2006.

HERRERA, R.; SEBOLT-LEOPOLD, J.S. Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. **Trends in molecular medicine**, v. 8, p. S27-31,2002.

HSU, H.S.; HUANG, P.I.; CHANG, Y.L.; TZAO, C.; CHEN, Y.W.; SHIH, H.C.; HUNG, S.C.; CHEN, Y.C.; TSENG, L.M.; CHIOU, S.H. Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in nonsmall cell lung cancer-derived CD133-positive cells. **Cancer**, v. 117, p.2970-2985, 2011.

HUANG, W.W.; YANG, J.S.; LIN, M.W.; CHEN, P.Y.; CHIOU, S.M.; CHUEH, F.S.; LAN, Y.H.; PAI, S.J.; TSUZUKI, M.; HO, W.J.; CHUNG, J.G. Cucurbitacin E induces G(2)/M phase arrest through STAT3/p53/p21 signaling and provokes apoptosis via Fas/CD95 and mitochondria-dependent pathways in human bladder cancer T24 cells. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2012, p. 952762, 2012.

HUGHES, J.D.; BLAGG, J.; PRICE, D.A.; BAILEY, S.; DECRESCENZO, G.A.; DEVRAJ, R.V.; ELLSWORTH, E.; FOBIAN, Y.M.; GIBBS, M.E.; GILLES, R.W.; GREENE, N.; HUANG, E.; KRIEGER-BURKE, T.; LOESEL, J.; WAGER, T.; WHITELEY, L.; ZHANG, Y. Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 4872-4875, 2008.

INDRAN, I.R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 735- 745, 2011.

ISHDORJ, G.; JOHNSTON, J. B.; GIBSON, S. B. Inhibition of constitutive activation of STAT3 by curcubitacin-I (JSI-124) sensitized human B-leukemia cells to apoptosis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, p.3302-3314, 2010.

ISHDORJ, G.; JOHNSTON, J.B.; GIBSON, S.B. Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B Leukemic Cells. **BMC Cancer**, v. 11, p.268, 2011.

ISHII, T.; KIRA, N.; YOSHIDA, T.; NARAHARA, H. Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. **Tumor Biology**, v. 34, p. 285 - 291, 2013.

IWANSKI, G.B.; LEE, D.H.; EN-GAL, S.; DOAN, N.B.; CASTOR, B.; VOGT, M.; TOH, M.; BOKEMEYER, C.; SAID, J.W.; THOENNISSSEN, N.H.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 998-1007, 2010.

JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N.P.; NAIR, M.G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. **Cancer Letters**, v. 189, p.11-16, 2003.

JIN, H.R.; JIN, X.; DAT, N.T.; LEE, J.J. Cucurbitacin B suppresses the transactivation activity of RelA/p65. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, p. 1643-1650, 2011.

JOHNSON, J.I.; DECKER, S.; ZAHAREVITZ, D.; RUBINSTEIN, L.V.; VENDITTI, J.M.; SCHEPARTZ, S.; KALYANDRUG, S.; CHRISTIAN, M.; ARBUCK, S.; HOLLINGSHEAD, M.; SAUSVILLE, E.A. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 1424-1431, 2001

JOHNSON, G.L.; DOHLMAN, H.G.; GRAVES, L.M. MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 325-331, 2005.

KANG, S.S.; KWON, T.; KWON, D.Y.; DO, S.I. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, 13085-13090, 1999.

KAUSAR, H., MUNAGALA, R., BANSAL, S.S., AQIL, F., VADHANAM, M.V., GUPTA, R.C., Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: Identification of intracellular thiols as critical targets. **Cancer Letters**, v. 332, p. 35-45, 2013.

KAWAHARA, N.; KURATA, A.; HAKAMATSUKA, T.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect on PEBP2 α A and OCIF gene expression in a human osteoblast-like Saos-2 cell line. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p.1377-1379, 2001.

KEPP, O., GALLUZZI, L., LIPINSKI, M., YUAN, J. & KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 221-237, 2011.

KERBEL, R.S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. **Cancer biology & therapy**, v. 2, p. S134-S139, 2003.

KERKHOFF, E.; FEDOROV, L.M.; SIEFKEN, R.; WALTER, A.O.; PAPADOPOULOS, T.; RAPP, U.R. Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein. **Cell Growth Differentiation**, v. 11, p. 185-190, 2000.

KERNS, E.H.; DI, L.; (Eds.) **Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods**. Amsterdam: Elsevier, 2008.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KNECHT, D.A.; LAFLEUR, R.A.; KAHSAI, A.W.; ARGUETA, C.E.; BESHIR, A.B.; FENTEANY, G. Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. **PLoS ONE**, v. 5, p.1-11, 2010.

KOH, P.K.; FAIVRE-FINN, C.; BLACKHALL, F.H.; DE RUYSSCHER, D. Targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical developments and rationale for the combination with thoracic radiotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 626–640, 2012.

KONGTUN, S.; JIRATCHARIYAKUL, W.; KUMMALUE, T.; TAN-ARIYA, P.; KUNNACHAK, S.; FRAHM, A.W. Cytotoxic properties of root extract and fruit juice of *Trichosanthes cucumerina*. **Planta Medica**, v. 75, p. 839-842, 2009.

KONOPA, J.; ZIELINSKI, J.; MATUSZKIEWICZ, A. Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from *Bryonia alba* L. I: isolation and identification. **Arzneimittelforschung**, v. 24, p. 1554-1557, 1974.

KREUZALER, P.; WATSON, C.J. Killing a cancer: what are the alternatives? **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 411-424, 2012.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3-11, 2009.

KUPCHAN, S.M.; SMITH, R.M.; AYNEHCHI, Y.; MARUYAMA, M. Tumor inhibitors. LVI. Cucurbitacins O, P, and Q, the cytotoxic principles of *Brandegea bigelovii*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 35, p. 2891-2894, 1970.

LANG, K.L.; GUIMARÃES, T.R.; MACHADO, V.R.; ZIMMERMANN, L.A.; SILVA, I.T.; TEIXEIRA, M.R.; DURÁN, F.J.; PALERMO, J.A.; SIMÕES, C.M.O.; CARO, M.S.B.; SCHENKEL, E.P. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Planta Medica**, v. 77, p. 1648 – 1651, 2011.

LANG, K.L.; SILVA, I.T.; ZIMMERMANN, L.A.; MACHADO, V.R.; TEIXEIRA, M. R.; LAPUH, M.I.; GALETTI, M.A.; PALERMO, J.A.; CABRERA, G.; BERNARDES, L.S.C.; SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; CARO, M.; DURÁN, F.J. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B

derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry (Print)**, v. 20, p. 3016-3030, 2012.

LASZCZYK, M.N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta Medica**, v. 75, p.1549-1560, 2009.

LEE, D.H.; IWANSKI, G.B.; THOENNISSSEN, N.H. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p.413-418, 2010.

LEE, D.H.; THOENNISSSEN, N.H.; GOFF, C.; IWANSKI, G.B.; FORSCHER, C.; DOAN, N.B.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. **Cancer Letters**, v. 306, p.161-170, 2011.

LESSENE, G.; CZABOTAR, P.E.; COLMAN, P.M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 989-1000, 2008.

LI, Y.; WANG, R.; MA, E.; DENG, Y.; WANG, X.; XIAO, J.; JING, Y. The induction of G2/M cell-cycle arrest and apoptosis by cucurbitacin E is associated with increased phosphorylation of eIF2alpha in leukemia cells. **Anticancer Drugs**, v. 21, p.389-400, 2010.

LIANG, J.; SLINGERLAND, J.M. Multiples roles of the PI3K/PKB (Akt) pathways in cell cycle progression. **Cell Cycle**, v. 2, p. 339-345, 2003.

LIN, H.; CHEN, C.; LI, X.; CHEN, B.D. Activation of the MEK/MAPK Pathway Is Involved in Bryostatin1-Induced Monocytic Differentiation and Up-regulation of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein. **Experimental Cell Research**, v. 272, p. 192-198, 2002.

LIN, S.Y.; MAKINO, K.; XIA, W.; MATIN, A.; WEN, Y.; KWONG, K.Y.; BOURGUIGNON, L.; HUNG, M.C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nature Cell Biology**, v. 3, p.802-808, 2001.

LIN, W.-W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p.1175-1183, 2007.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LIU, T.; ZHANG, M.; ZHANG, H.; SUN, C.; DENG, Y. Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 265, p. 1225 - 1232, 2008a.

LIU, T.; ZHANG, M.; ZHANG, H.; SUN, C.; YANG, X.; DENG, Y.; JI, W. Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 78 - 84, 2008b.

LIU, T.; PENG, H.; ZHANG, M.; DENG, Y.; WU, Z. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, p. 15-22, 2010.

LIU, K.; XING, H.; ZHANG, S.; LIU, S.; FUNG, M. Cucurbitacin D induces fetal hemoglobin synthesis in K562 cells and human hematopoietic progenitors through activation of p38 pathway and stabilization of the gammaglobin mRNA. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 45, p. 269-275, 2010b.

LOPEZ-HABER, C.; KAZANIETZ, M.G. Cucurbitacin I Inhibits Rac1 Activation in Breast Cancer Cells by a Ros-Mediated Mechanism and Independently of Jak2 and P-Rex1. **Molecular pharmacology**, v. 83, p. 1141-1154, 2013.

LU, P.; YU, B.; XU, J. Cucurbitacin B regulates immature myeloid cell differentiation and enhances antitumor immunity in patients with lung

cancer. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 27, p. 495-503, 2012.

LU, S.; JESSEN, B.; STROCK, C.; WILL, Y. The contribution of physicochemical properties to multiple in vitro cytotoxicity endpoints. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 613-620, 2012.

LUI, V.W.; YAU, D.M.; WONG, E.Y.; NG, Y.K.; LAU, C.P.; HO, Y.; CHAN, J.P.; HONG, B.; HO, K.; CHEUNG, C.S.; TSANG, C.M.; TSAO, S.W.; CHAN, A.T. Cucurbitacin I elicits anoikis sensitization, inhibits cellular invasion and in vivo tumor formation ability of nasopharyngeal carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 30, p.2085-2094, 2009.

MATOS, F.J.; GOTTLIEB, O.R. Isocucurbitacina B, constituinte citotóxico de *Luffa operculata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 39, p. 245-247, 1967.

MATSUDA, H.; NAKASHIMA, S.; ABDEL-HALIM, O.B.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. Cucurbitane-type triterpenes with anti-proliferative effects on U937 cells from an Egyptian natural medicine, *Bryonia cretica*: structures of new triterpene glycosides, Bryoniaosides A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 58, p. 747-751, 2010.

MAYO, L. D.; DONNER, D.B. A phosphatidylinositol 3-kinaseAkt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p.11598-11603, 2001.

MCCUBREY, J.A.; STEELMAN, L.S.; CHAPPELL, W.H.; ABRAMS, S.L.; WONG, E.W.T.; CHANG, F.; LEHMANN, B.; TERRIAN, D.M.; MILELLA, M.; TAFURI, A.; STIVALA, F.; LIBRA, M.; BASECKE, J.; EVANGELISTI, C.; MARTELLI, A.M.; FRANKLIN, R.A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, p. 1263-1284, 2007.

MCCUBREY, J.A.; STEELMAN, L.S.; CHAPPELL, W.H.; ABRAMS, S.L.; FRANKLIN, R.A.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; LIBRA, M.; CANDIDO, S.; MALAPONTE, G.; MAZZARINO, M.C.; FAGONE, P.; NICOLETTI, F.; BASECKE, J.; MIJATOVIC, S.; MAKSIMOVIC-IVANIC, D.; MILELLA, M.; TAFURI, A.; CHIARINI, F.; EVANGELISTI, C.; COCCO, L.; MARTELLI, A.M. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. **Oncotarget**, v. 3, p. 1068-1111, 2012.

MEHLEN, P.; BREDESEN, D.E. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Science Signaling*, v. 4, p. mr2, 2011.

MILLE, F.; THIBERT, C.; FOMBONNE, J.; RAMA, N.; GUIX, C.; HAYASHI, H.; CORSET, V.; REED, J.C.; MEHLEN, P. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL–caspase-9 complex. **Nature Cell Biology**. V. 11, p 739–746, 2009.

MIRÓ, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytotherapy Research**, v. 9, p.159-168, 1995.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v. 33, p. 261-274, 2000.

MOMMA, K.; MASUZAWA, Y.; NAKAI, N.; CHUJO, M.; MURAKAMI, A.; KIOKA, N.; KIYAMA, Y.; AKITA, T.; NAGAO, M. Direct interaction of Cucurbitacin E isolated from *Alsomitra macrocarpa* to actin filament. **Cytotechnology**, v. 56, p. 33-39, 2008.

MORO, M.; BERTOLINI, G.; TORTORETO, M.; PASTORINO, U.; SOZZI, G.; ROZ, L. Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. **Journal of Biomedicine Biotechnology**, v. 2012, p. 568567, 2012.

MORTON, C.L.; HOUGHTON, P.J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. **Nature Protocols**, v. 2, p. 247-250, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 - 63, 1983.

MUSZA, L.J.; SPEIGHT, P.; MCELHINEY, S.; BARROW, C.J.; GILLUM, A.M.; COOPER, R.; KILLAR, L.M. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conochea scoparioides*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1498 – 1502, 1994.

NAKASHIMA, S.; MATSUDA, H.; KURUME, A.; ODA, Y.; NAKAMURA, S.; YAMASHITA, M.; YOSHIKAWA, M. Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 2994-2997, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NORMANNO, N.; BIANCO, C.; STRIZZI, L.; MANCINO, M.; MAIELLO, M.R.; DE LUCA, A.; CAPONIGRO, F.; SALOMON, D.S. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 253-257, 2005.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

OUYANG, D.; ZHANG, Y.; XU, L.; LI, J.; ZHA, Q.; HE, X. Histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes B16F10 melanoma cells to cucurbitacin B treatment. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, p. 487 - 495, 2011.

PARK, C.S.; LIM, H.; HAN, K.J.; BAEK, S.H.; SOHN, H.O.; LEE, D.W.; KIM, Y.-G.; YUN, H.-Y.; BAEK, K.J.; KWON, N.S. Inhibition of Nitric Oxide Generation by 23,24-Dihydrocucurbitacin D in Mouse

Peritoneal Macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p.705-710, 2004.

PEREIRA, L.V. Animais transgênicos:nova fronteira do saber. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, p. 40-42, 2008.

PETERS, R.R.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, v. 63, p. 525-528, 1997.

PETERS, R.R.; SALEH, T.F.; LORA, M.; PATRY, C.; BRUM-FERNANDES, A.J. de; FARIAS, M.R., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. **Life Sciences**, v. 64, p. 2429-2437, 1999.

PETERS, R.R.; KREPSKY, P.B.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; DA SILVA ROCHA, J.C.; BEZERRA, M.M.; DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.; FARIAS, M.R.; CASTRO DA ROCHA, F.A; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. **Life Sciences**, v. 73, p. 2185 - 2197, 2003.

PETERSON, J.K.; HOUGHTON, P.J. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 837-844, 2004.

POMMIER, Y.; SORDET, O.; ANTONY, S.; HAYWARD, R.L.; KOHN, K.W. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. **Oncogene**, v. 23, p. 2934-2949, 2004.

PRASASYA, R.D.; TIAN, D.; KREEGER, P.K. Analysis of cancer signaling networks by systems biology to develop therapies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, p. 200-206, 2011.

PROMKAN, M.; DAKENG, S.; CHAKRABARTY, S.; BOGLER, O.; PATMASIRIWAT, P. The effectiveness of cucurbitacin B in BRCA1 defective breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 8, p. e55732. 2013.

QIAO, J.; XU, L.H.; HE, J.; OUYANG, D.Y.; HE, X.H. Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF-kappaB nuclear translocation. **Inflammation Research**, 2013. *In press*.

RAMALHETE, C.; MOLNAR, J.; MULHOVO, S.; ROSARIO, V.E.; FERREIRA, M.J. New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6942-6951, 2009.

RECIO, M.C.; PRIETO, M.; BONUCELLI, M.; ORSI, C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RÍOS, J. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. **Planta Medica**, v. 70, p. 414 - 420, 2004.

REHM, S.; ENSLIN, P.R.; MEEUSE, A.D.J.; WESSELS, J.H. Bitter principles of the cucurbitaceae. VII.—the distribution of bitter principles in this plant family. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p.679-686, 1957.

REN, F.B.; HONG, M. Recent pharmacological and clinical development of cucurbitacins in the treatment of hepatitis and primary liver cancer. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 6, p. 633-635, 1986.

RÍOS, J.L.; ESCANDELL, J.M.; RECIO, M.C. New insights into the bioactivity of cucurbitacins. In: RAHMAN, A.U. (Ed.) **Studies In Natural Products Chemistry**, 32. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 429 - 469.

RÍOS, J.L. Effects of triterpenes on the immune system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p.1-14, 2010.

RÍOS, J.L.; ANDÚJAR, I.; ESCANDELL, J.M.; GINER, R.M.; RECIO, M.C. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 1663 – 1676, 2012.

RYAN, K.M. p53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome. **European Journal of Cancer**, v. 47, p. 44-50, 2011.

RYGAARD, J.; POVLSSEN, C.O. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 77, p.758-760, 1969.

SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; DAIMON, T.; SONOBE, T. Screening of biochemical modulator by tumor cell permeability of doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, p.63-69, 2008.

SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; SONOBE, T. Enhancement of doxorubicin concentration in the M5076 ovarian sarcoma cells by cucurbitacin E co-treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p.186-191, 2010.

SARKER, S.D.; WHITING, P.; Å IK, V.; DINAN, L. Ecdysteroid antagonists (cucurbitacins) from *Physocarpus opulifolius* (rosaceae). **Phytochemistry**, v. 50, p.1123-1128, 1999.

SAUSVILLE, E.A.; BURGER, A.M. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. **Cancer Research**, v. 66, p. 3351-3354, discussion 3354, 2006.

SCHENKEL, E.P.; FARIAS, M.R.; MAYER, R.; BREITMAIER, E.; RUCKER, G. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochemistry**, v. 31, p.1329-1333, 1992.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS / Ed. da UFSC, 2007. p. 371-400.

SHAN, X.L.; ZHOU, X.Y.; YANG, J.; WANG, Y.L.; DENG, Y.H.; ZHANG, M.X. Inhibitory effect of cucurbitacin E on the proliferation

of ovarian cancer cells and its mechanism. **Chinese Journal of Cancer**, v. 29, p. 20-24, 2010.

SHI, X.; FRANKO, B.; FRANTZ, C.; AMIN, H.M.; LAI, R. JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells. **British Journal of Haematology**, v. 135, p.26-32, 2006.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 813-823, 2006.

SHOHAT, B.; GITTER, S.; LAVIE, D. Antitumor activity of cucurbitacins: metabolic aspects. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 23, p. 19-24, 1962.

SHOHAT, B.; GITTER, S.; LEVIE, B.; LAVIE, D. The combined effect of cucurbitacins and X-ray treatment on transplanted tumors in mice. **Cancer Research**, v. 25, p. 1828-1835, 1965.

SIQUEIRA, J.M.; PETERS, R.R.; GAZOLA, A.C.; KREPSKY, P.B.; FARIAS, M.R.; RAE, G.A.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Life Sciences**, v. 80, p. 1382-1387, 2007.

SIQUEIRA, J.M.; GAZOLA, A.C.; FARIAS, M.R.; VOLKOV, L.; RIVARD, N.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both *in vitro* and *in vivo* models. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, p. 1-10, 2009.

STANTON, V.P.; NICHOLAS, D.W.; LAUDANO, A.P.; COOPER, G. M. Definition of the human Raf amino-terminal regulatory region by deletion mutagenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 639-647, 1989.

SU, Y.; LI, G.; ZHANG, X.; GU, J.; ZHANG, C.; TIAN, Z.; ZHANG, J. JSI-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through G2/M cell cycle arrest and apoptosis augment. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, p. 1243 -1249, 2008.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN, K. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**, v. 6. London: Academic Press; 1990. p 71-133.

SUN, C.; ZHANG, M.; SHAN, X.; ZHOU, X.; YANG, J.; WANG, Y.; LI-LING, J.; DENG, Y. Inhibitory effect of Cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, p.603-610, 2010.

SUN, J.; BLASKOVICH, M.A.; JOVE, R.; LIVINGSTON, S.K.; COPPOLA, D.; SEBTI, S.M. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. **Oncogene**, v. 24, p.3236-3245, 2005.

TAKAHASHI, N.; YOSHIDA, Y.; SUGIURA, T.; MATSUNO, K.; FUJINO, A.; YAMASHITA, U. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 508 - 513, 2009.

TAN, T.T.; WHITE, E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 615, p. 81-104, 2008.

TANNIN-SPITZ, T.; GROSSMAN, S.; DOVRAT, S.; GOTTLIEB, H.E.; BERGMAN, M. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 56 - 67, 2007.

TAYLOR, B.S.; LADANYI, M. Clinical cancer genomics: how soon is now? **Journal of Pathology**, v. 223, p.318-326, 2011.

TESSIER, A.M.; PARIS, R.R. Study of some African toxic euphobiacees containing cucurbitacins (author's transl). **Toxicological European Research**, v. 1, p. 329-336, 1978.

TESTA, J.R.; BELLACOSA, A. AKT plays a central role in tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 10983-10985, 2001.

THANT, A.A.; NAWA, A.; KIKKAWA, F.; ICHIGOTANI, Y.; ZHANG, Y.; SEIN, T.T.; AMIN, A.R.; HAMAGUCHI, M. Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 18, p. 423-428, 2000.

THOENNISSSEN, N.H.; IWANSKI, G.B.; DOAN, N.B.; OKAMOTO, R.; LIN, P.; ABBASSI, S.; SONG, J.H.; YIN, D.; TOH, M.; XIE, W.D.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. **Cancer Research**, v. 69, p.5876-5884, 2009.

THOMAS, K.R.; CAPECCHI, M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, v. 51, p.503-512, 1987.

TSENG, L.M.; HUANG, P.I.; CHEN, Y.R.; CHEN, Y.C.; CHOU, Y.C.; CHEN, Y.W.; CHANG, Y.L.; HSU, H.S.; LAN, Y.T.; CHEN, K.H.; CHI, C.W.; CHIOU, S.H.; YANG, D. M.; LEE, C.H. Targeting signal transducer and activator of transcription 3 pathway by cucurbitacin I diminishes self-renewing and radiochemoresistant abilities in thyroid cancer-derived CD133+ cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, p. 410-423, 2012.

UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; TORIUMI, M.; KOIKE, K.; KIMURA, Y.; NIKAIDO, T.; AOI, W.; NISHINO, H.; TAKIDO, M. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of cucurbitane glycosides from the roots of *Bryonia dioica*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 179-183, 2002.

VALENTE, L.M.M.; GUNATILAKA, A.A.L.; GLASS, T.E.; KINGSTON, D.G.I.; PINTO, A.C. New Norcucurbitacin and Heptanorcucurbitacin Glucosides from *Fevillea trilobata*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1772-1778, 1993.

VALENTE, L.M.M.; GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I.; PINTO, A.C. Norcucurbitacin Gentiobiosides from *Fevillea trilobata*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 11, p. 1560-1563, 1994.

VALENTE, L.M.M. Cucurbitacins and their main structural characteristics. **Quimica Nova**, v. 27, p.944-948, 2004.

VAN GENDEREN, H.; KENIS, H.; LUX, P.; UNGETH, L.; MAASSEN, C.; DECKERS, N.; NARULA, J.; HOFSTRA, L.; REUTELINGSPERGER, C. *In vitro* measurement of cell death with the Annexin A5 affinity assay. **Nature protocols**, v. 1, p.363-367, 2006.

VAN KESTER, M.S.; OUT-LUITING, J.J.; VON DEM BORNE, P.A.; WILLEMZE, R.; TENSEN, C.P.; VERMEER, M.H. Cucurbitacin I inhibits STAT3 and induces apoptosis in Sezary cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p.1691-1695, 2008.

VIRTUOSO, J. F. Morbidade e mortalidade da população idosa de Florianópolis: um estudo comparativo entre homens e mulheres. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 13, p. 215-223, 2010.

YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 559-564, 2005.

YAMAZAKI, Y.; TSURUGA, M.; ZHOU, D.; FUJITA, Y.; SHANG, X.; DANG, Y.; KAWASAKI, K.; OKA, S. Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 259, p. 64-78, 2000.

YANG, S.J.; CHANG, Y.Q.; ZHENG, L.H.; WEI, Z.R.; QU, H.G.; CAO, S.G. Protective effects of cucurbitacin B on the acute liver injury induced by CCl₄. **Food Science**, v. 26, p. 524-526, 2005.

YASUDA, S.; YOGOSAWA, S.; IZUTANI, Y.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, H.; SAKAI, T. Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p.559-565, 2010.

YESILADA, E.; USTUN, O.; SEZIK, E.; TAKAISHI, Y.; ONO, Y.; HONDA, G. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: Interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 59 - 73, 1997.

YIN, D.; WAKIMOTO, N.; XING, H.; LU, D.; HUYNH, T.; WANG, X.; BLACK, K.L.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1364 - 1375, 2008.

YU, H.; JOVE, R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p.97-105, 2004.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p.41-51, 2007.

WANG, C., YOULE, R.J. The role of mitochondria in apoptosis*. **Annual Reviews Genetics**, v. 43, p. 95-118, 2009.

WANG, S.; WU, X.; TAN, M.; GONG, J.; TAN, W.; BIAN, B.; CHEN, M.; WANG, Y. Fighting fire with fire: poisonous Chinese herbal medicine for cancer therapy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 33-45, 2012.

WAKIMOTO, N.; YIN, D.; O'KELLY, J.; HARITUNIANS, T.; KARLAN, B.; SAID, J.; XING, H.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Science**, v. 99, p. 1793 -1797, 2008.

WHITE, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 401-410, 2012.

WHITE, E.; DIPAOLA, R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clinical Cancer Research**, v.15, p. 5308-5316, 2009.

WILLIAM, W.N.; HEYMACH, J.V.; KIM, E.S.; LIPPMAN, S.M. Molecular targets for cancer chemoprevention. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 213 - 225, 2009.

WU, J.; DENT, P.; JELINEK, T.; WOLFMAN, A.; WEBER, M.J.; STURGILL, T.W. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. **Science**, v. 262, p. 1065-1069, 1993.

ZHANG, M.; ZHANG, H.; SUN, C.; SHAN, X.; YANG, X.; LI-LING, J.; DENG, Y. Targeted constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatocellular carcinoma cells by cucurbitacin B. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, p. 635 - 642, 2009.

ZHANG, M.; SUN, C.; SHAN, X.; YANG, X.; LI-LING, J.; DENG, Y. Inhibition of pancreatic cancer cell growth by Cucurbitacin B through modulation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. **Pancreas**, v. 39, p.923-929, 2010.

ZHANG, Y.; OUYANG, D.; XU, L.; JI, Y.; ZHA, Q.; CAI, J.; HE, X. Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, p.556-567, 2011.

ZHANG, T.; LI, J.; DONG, Y.; ZHAI, D.; LAI, L.; DAI, F.; DENG, H.; CHEN, Y.; LIU, M.; YI, Z. Cucurbitacin E inhibits breast tumor metastasis by suppressing cell migration and invasion. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, p. 445-458, 2012a.

ZHANG, T.; LI, Y.; PARK, K.A.; BYUN, H.S.; WON, M.; JEON, J.; LEE, Y.; SEOK, J.H.; CHOI, S.W.; LEE, S.H.; MAN KIM, J.; LEE, J.H.; SON, C.G.; LEE, Z.W.; SHEN, H.M.; HUR, G.M. Cucurbitacin induces autophagy through mitochondrial ROS production which

counteracts to limit caspase-dependent apoptosis. **Autophagy**, v. 8, p. 559-576, 2012b.

ZHOU, B.P.; LIAO, Y.; XIA, W.; SPOHN, B.; LEE, M.H.; HUNG, M.C. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. **Nature Cell Biology**, v. 3, p. 245-252, 2001.

ZHU, J.S.; OUYANG, D.Y.; SHI, Z.J.; XU, L.H.; ZHANG, Y.T.; HE, X.H. Cucurbitacin B induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy associated with G actin reduction and persistent activation of cofilin in Jurkat cells. **Pharmacology**, v. 89, p. 348-346, 2012.

APÊNDICE 1

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DAS CUCURBITACINAS ATIVAS (N^{OS} 18 E 19), EM CÉLULAS CACO-2, COM VISTAS À PREDIÇÃO DA SUA ABSORÇÃO ORAL

A oncologia é uma das poucas áreas da medicina onde a maioria dos pacientes é tratada por via intravenosa, ao invés de receber medicamentos por via oral. Porém, a quimioterapia oral está assumindo um papel cada vez mais importante na terapia do câncer e as indústrias farmacêuticas estão investindo significativamente no desenvolvimento de quimioterápicos a serem administrados por esta via, com aproximadamente 25% dos mais de 400 fármacos atualmente em processo de desenvolvimento, planejados como futuros quimioterápicos orais (MOORE, 2007).

A via parenteral, comumente empregada, apresenta uma série de desvantagens, tais como a própria agressividade da técnica e o desconforto do paciente. Assim, outras rotas de administração e formas farmacêuticas vêm sendo desenvolvidas e investigadas a fim de substituir a via parenteral. Ao contrário da via intravenosa, que acarreta em picos de concentração do fármaco, muitas vezes em níveis tóxicos, a terapia oral pode prover uma exposição efetiva mais prolongada e contínua dos agentes quimioterápicos às células tumorais, em menores concentrações, melhorando dessa forma o perfil de segurança do fármaco. Isso é especialmente apropriado para os inibidores da topoisomerase I ou novos fármacos, tais como os inibidores de transdução de sinais e os antiangiogênicos, que necessitam ser administrados diariamente por meses ou anos (O'NEILL; TWELVES, 2002).

Recentemente, vários quimioterápicos orais foram aprovados e há muitos em fase de desenvolvimento. Muitos quimioterápicos orais são, na verdade, novas formulações de fármacos rotineiramente administrados pela via intravenosa. Alguns estudos possibilitaram a exploração da via oral para a administração de determinados quimioterápicos que, por muitos anos, foram essencialmente empregados pela via convencional, tais como etoposídeo, ciclofosfamida, idarubicina, entre outros, levando a significativos progressos nessa área de pesquisa. Um importante exemplo são os

topotecanos, que apresentaram efetividade equivalente frente ao câncer de pulmão ao serem administrados, tanto pela via oral quanto pela via intravenosa, mas o tratamento oral teve um melhor perfil de toxicidade com menos mielossupressão (PIRKER et al., 2010).

A possibilidade de administrar taxanos oralmente também oferece consideráveis vantagens, particularmente para o paclitaxel, onde o solubilizante das formulações intravenosas, o Cremofor EL®, é responsável por uma série de efeitos adversos, tais como reações de hipersensibilidade, neurotoxicidade e nefrotoxicidade, além de causar alterações no perfil farmacocinético do fármaco (WEISS et al., 1990; PANDITA et al., 2011).

Além da potencial melhor eficácia e reduzida toxicidade, a quimioterapia oral é custo-efetiva, flexível em esquemas posológicos e conveniente para o paciente, o que resulta em maior adesão ao tratamento. A disponibilidade de um medicamento veiculado em uma forma farmacêutica oral pode permitir novos regimes terapêuticos, principalmente para os pacientes fora do ambiente hospitalar (BROMBERG, 2008; MO et al., 2011).

Para que um medicamento oral alcance sua eficácia terapêutica, ele deve ser liberado da formulação, dissolver-se nos fluidos gastrointestinais e só então ser transportado através da mucosa intestinal. Portanto, no caso de fármacos em desenvolvimento, mesmo a molécula sendo altamente potente, seu desenvolvimento tecnológico até o produto farmacêutico final, somente poderá ocorrer se ele possuir um perfil biofarmacêutico adequado. Portanto, o maior desafio para os pesquisadores é a obtenção de fármacos que exibam, além da atividade farmacológica, características biofarmacêuticas ótimas (BOHETS et al., 2001; HIDALGO, 2001).

A absorção intestinal de um fármaco é controlada fundamentalmente por dois fatores: sua solubilidade aquosa e taxa de dissolução (que determinam a velocidade na qual o fármaco atinge sua concentração máxima nos fluidos intestinais) e seu coeficiente de permeabilidade (relacionado com a quantidade de fármaco dissolvido que é transportado através da mucosa intestinal e passa para a circulação portal) (AMIDON et al., 1995; BOHETS et al., 2001). Portanto, a determinação *in vitro* do perfil de dissolução, da solubilidade aquosa e da permeabilidade de fármacos podem prover valiosas informações sobre sua absorção oral.

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para a avaliação da permeabilidade intestinal de compostos. Entre eles estão modelos físico-químicos, modelos computacionais *in silico*, modelos *in vitro* e modelos de perfusão *in situ*, cada um deles apresentando vantagens e desvantagens perante os demais. Dentre esses modelos, o mais amplamente reconhecido pela indústria farmacêutica e agências regulatórias na área de medicamentos e alimentos é o modelo de avaliação da permeabilidade *in vitro* com células Caco-2 (BALIMANE et al., 2006), que foi recentemente implementado e validado no nosso Laboratório (KRATZ et al., 2011) e foi empregado neste trabalho.

A linhagem de células Caco-2, derivada de um adenocarcinoma de cólon humano, diferencia-se sob condições específicas de cultura, e passa a exibir características morfofuncionais similares às dos enterócitos: capacidade absorptiva, presença de junções impermeáveis, expressão de enzimas intestinais e de proteínas transportadoras (BOHETS et al., 2001; SAMBUY et al., 2005). Do ponto de vista experimental, as células são cultivadas por, pelo menos, 21 dias para formarem uma monocamada de células diferenciadas sobre um filtro poroso, deve ser de natureza inerte e possuir poros com um diâmetro específico para evitar a migração celular do lado apical para o basolateral. O tempo relativamente grande de cultivo é necessário para garantir a formação das junções oclusivas, obtenção da polaridade celular e expressão de transportadores de membrana (BOHETS et al., 2001).

Nos experimentos de transporte, os compostos são, geralmente, adicionados no lado apical da monocamada celular e sua taxa de passagem para o lado basolateral pode ser medida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a diferentes detectores, tais como UV (Ultra Violeta) ou EM (Espectrômetro de Massas), os quais apresentam como vantagens alta sensibilidade e alta especificidade. Porém, ambos os transportes, apical→basolateral (AP/BL) e basolateral→apical (BL/AP), são rotineiramente investigados para determinar se o transporte mediado por carreador ou um mecanismo de efluxo estão envolvidos no processo avaliado (PRESS; DI GRANDI, 2008). Vários transportadores de efluxo localizados na porção apical da célula, tais como a glicoproteína P (P-gp), são funcionais e podem limitar a absorção intestinal e também a distribuição de compostos através da barreira hemato-encefálica e em tecidos tumorais, uma vez que estas regiões superexpressam tais transportadores. Os resultados são

expressos como coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app} , cm/s) (BOHETS et al., 2001; SAMBUY et al., 2005), o qual é calculado através da equação: $P_{app} = (\Delta Q/\Delta t) \times 1/60 \times 1/A \times 1/Co$, onde $\Delta Q/\Delta t$ é a taxa de permeabilidade (quantidade de amostra permeada por minuto); A é a área de difusão das células (filtro) e Co é a concentração inicial da amostra.

No quesito avaliação da morfologia, diversos métodos estão disponíveis para avaliar a integridade da monocamada celular. Comumente, utiliza-se a medida da resistência elétrica transepitelial (em inglês, *Trans Epithelial Electrical Resistance* – TEER) é utilizada, uma vez que células confluentes com junções oclusivas formadas constituem uma barreira para a troca de eletrólitos e, conseqüentemente, geram uma resistência elétrica. As medidas de TEER são realizadas através de um voltímetro acoplado a microeletrodos colocados em ambos os compartimentos (apical e basolateral) dos insertos, onde são cultivadas as células, e devem ser feitas antes e após a realização dos experimentos (PRESS; DI GRANDI, 2008).

Para garantir a qualidade dos resultados dos experimentos de transporte, também é desejável incluir um composto marcador da integridade da monocamada de células Caco-2, ou seja, um composto que possua baixíssimo coeficiente de permeabilidade. Vários compostos são utilizados nesse sentido, dentre eles o manitol, a dextrana conjugada ao isotiocianato de fluoresceína e o marcador de permeabilidade paracelular *Lucifer yellow* (YAMASHITA et al., 2002).

Através da aplicação desse modelo, foram avaliados os perfis de permeabilidade intestinal *in vitro* de duas cucurbitacinas pertencentes ao primeiro grupo avaliado, sendo uma delas o composto líder (CUC 19 = cucurbitacina B) e aquela cujos resultados foram mais promissores (CUC 18) durante a primeira triagem. Os resultados referentes ao mecanismo de ação desta CUC 18 já foram publicados na forma de artigo científico, conforme relatado no capítulo II desta tese.

No nosso conhecimento, até o momento, não dá dados disponíveis acerca da absorção intestinal desta classe de compostos na literatura, empregando este modelo de predição da absorção oral, o que confere um caráter inovador a esta pesquisa. Existem publicações sobre a capacidade de modulação de transportadores celulares, tais como P-gp e proteínas de resistência múltipla a fármacos (MRP), por algumas cucurbitacinas e derivados, como descrito previamente por Sadzuka e colaboradores (2008, 2010), que demonstraram que a cucurbitacina E

promoveu o acúmulo intracelular da doxorubicina, em células de sarcoma de ovário, por facilitar o influxo e prevenir o efluxo desse quimioterápico nestas células tumorais, modulando transportadores de membrana como a P-gp. Outro estudo também demonstrou o efeito sinérgico de cucurbitacinas, obtidas a partir de fontes naturais, com a doxorubicina, em células de linfoma resistentes a doxorubicina, através da modulação dos principais transportadores de efluxo (RAMALHETE et al., 2009).

Os resultados obtidos na avaliação da permeabilidade intestinal *in vitro* são apresentados na Tabela 1. Em relação à CUC 19, foram empregadas três diferentes concentrações (10, 25 e 50 μM) para verificar se a amostra apresentaria uma possível toxicidade frente às células Caco-2, além de ponderar sobre questões de sensibilidade analítica para detecção do composto por CLAE, após os experimentos. Os resultados obtidos garantiram a qualidade e a viabilidade dos experimentos, uma vez que, nas concentrações testadas, as amostras não foram tóxicas durante o intervalo de tempo dos ensaios de permeabilidade (2 h), bem como foi possível detectar a amostra nos tampões utilizados. As metodologias de CLAE para o doseamento das duas cucurbitacinas foram desenvolvidas com base no trabalho de Krepsky e colaboradores (2009).

Tabela 1: Coeficientes de permeabilidade aparente (P_{app}) das cucurbitacinas 19 e 18, obtidos em experimentos com células Caco-2.

| CUC | Concentração doadora (μM) | P_{app} (10^{-6} ; cm/s) | | Taxa de efluxo ^c |
|-----|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| | | AP-BL ^a | BL-AP ^b | |
| 19 | 10 (-) ^d | 2,81 | 23,34 | 8,30 |
| | 10 (+) ^d | 24,03 | 33,83 | 1,41 |
| | 25 (-) ^d | 7,37 | 42,14 | 5,71 |
| | 25 (+) ^d | 27,44 | 34,16 | 1,24 |
| | 50 (-) ^d | 7,42 | 23,33 | 3,14 |
| | 50 (+) ^d | 27,15 | 24,33 | 0,90 |
| 18 | 25 (-) ^d | 50,48 | 56,43 | 1,11 |

Os experimentos de transporte foram realizados em condições de iso-pH (7,4); ^aExperimento da direção apical para a direção basolateral; ^bExperimento da direção basolateral para a direção apical; ^c $P_{\text{app BL-AP}} / P_{\text{app AP-BL}}$; ^d(-) e (+) indicam ausência e presença de Verapamil (200 μM), respectivamente. n=2.

Em relação ao perfil de permeabilidade da CUC 19, foram avaliados os transportes nos sentidos AP/BL e BL/AP. Nas concentrações de 25 e 50 μM , os valores de P_{app} AP/BL foram semelhantes e, isoladamente, indicam um perfil de permeabilidade moderada, que satisfaz em parte as condições necessárias para uma absorção oral adequada. Entretanto, se analisados os dados de taxa de efluxo (razão do P_{app} BL/AP e P_{app} AP/BL), eles evidenciam o papel de transportadores de efluxo no transporte desse composto, como já proposto anteriormente para outros compostos da classe das cucurbitacinas (SADZUKA et al., 2008, 2010; RAMALHETE et al., 2009). Entretanto, na concentração de 50 μM , foi obtida uma taxa de efluxo de 3,14, que é indicativa da interação com transportadores de efluxo (GIACOMINI et al., 2010). Na concentração de 25 μM , essa taxa subiu para 5,71, reforçando o envolvimento desses transportadores, e indicando uma possível saturação destes em concentrações mais altas. De fato, quando a permeabilidade da CUC 19 foi avaliada na concentração mais baixa (10 μM), a taxa de efluxo subiu ainda mais (8,30) e os valores de P_{app} AP/BL caíram significativamente. Esses dados indicam um possível comprometimento da absorção oral e da distribuição tecidual em concentrações menores, sendo esse efeito mediado pelo efluxo celular, como já discutido anteriormente (SUGANO et al., 2010). Outro dado que corrobora esses achados, e que também geram indicativos de que o transportador envolvido seja a P-gp, é que na presença de um inibidor da P-gp (verapamil, 200 μM), essa taxa de efluxo foi reduzida, atingindo valores próximos a 1,00 (alusivo de transporte passivo).

Em contrapartida, a CUC 18 não demonstrou ser alvo de transporte ativo secretório, representado por uma baixa taxa de efluxo (1,11). Adicionalmente, seu valor de P_{app} AP/BL foi cerca de sete vezes maior do que o valor obtido com a molécula líder da série dos compostos ativos (CUC 19), quando avaliadas na mesma concentração doadora. Estes resultados são interessantes, não apenas em termos de permeabilidade intestinal e predição da absorção oral, mas também representam uma potencial melhora da distribuição desse composto para células tumorais (sítio ativo final), uma vez que o surgimento de células tumorais multirresistentes está diretamente relacionado à superexpressão de transportadores de efluxo, tais como a P-gp.

Portanto, a avaliação, ainda na fase pré-clínica, das propriedades biofarmacêuticas pode prover importantes informações aos

pesquisadores, esclarecendo dúvidas, predizendo resultados *in vivo*, guiando o estabelecimento de relações estrutura-atividade e, sobretudo, fornecendo uma base sólida para a tomada de decisões. Fármacos bem sucedidos podem ser desenvolvidos quando suas propriedades farmacológicas são otimizadas em paralelo com as propriedades farmacêuticas e farmacotécnicas (DI, KERNS, 2005).

REFERÊNCIAS DO APÊNDICE 1

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-, 1995.

BALIMANE, P.V.; HAN, Y.H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **The AAPS Journal**, v. 8, p. 1-13, 2006.

BOHETS, H.; ANNAERT, P.; MANNENS, G.; VAN BEIJSTERVELDT, L.; ANCIAUS, K.; VERBOVEN, P.; MEULDERMANS, W.; LAVRIJSEN, K. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 367-383, 2001.

BROMBERG, L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 99-112, 2008.

DI, L.; KERNS, E.H. Application of pharmaceutical profiling assays for optimization of drug-like properties. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 8, p. 495-504, 2005.

GIACOMINI, K. M.; HUANG, S. M.; TWEEDIE, D. J.; BENET, L. Z.; BROUWER, K. L. R.; CHU, X. Y.; DAHLIN, A.; EVERS, R.; FISCHER, V.; HILLGREN, K. M.; HOFFMASTER, K. A.; ISHIKAWA, T.; KEPPLER, D.; KIM, R. B.; LEE, C. A.; NIEMI, M.; POLLI, J. W.; SUGIYAMA, Y.; SWAAN, P. W.; WARE, J. A.; WRIGHT, S. H.; YEE, S. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J.; ZHANG, L.; TRANSPORTER, I. Membrane transporters in drug

development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 215 – 236, 2010.

HIDALGO, I.J. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 385 - 401, 2001.

KRATZ, J.M.; TEIXEIRA, M.R.; KOESTER, L.S.; SIMÕES, C.M.O. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 531-537, 2011.

KREPSKY, P.B., CERVELIN, M.D.O., PORATH, D., PETERS, R.R., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARIAS, M.R. High performance liquid chromatography determination of cucurbitacins in the roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 715-719, 2009.

MO, R.; JIN, X.; LI, N.; JU, C.; SUN, M.; ZHANG, C.; PING, Q. The mechanism of enhancement on oral absorption of paclitaxel by N-octyl-O-sulfate chitosan micelles. **Biomaterials**, v. 32, p. 4609-4620, 2011.

MOORE, S. Facilitating oral chemotherapy treatment and compliance through patient/family-focused education. **Cancer Nursing**, v. 30, p. 112 – 122, 2007.

O'NEILL, V.J., TWELVES, C.J. Oral cancer treatment: developments in chemotherapy and beyond. **British Journal of Cancer**, v. 87, p. 933-937, 2002.

PANDITA, D.; AHUJA, A.; LATHER, V.; BENJAMIN, B.; DUTTA, T.; VELPANDIAN, T.; KHAR, R.K. Development of Lipid-Based Nanoparticles for Enhancing the Oral Bioavailability of Paclitaxel. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 712 – 722, 2011.

PIRKER, R.; BERZINEC, P.; BRINCAT, S.; KASAN, P.; OSTOROS, G.; PESEK, M.; PLÁTE, S.; PURKALNE, G.; ROONEEM, R.; SKŘÍČKOVÁ, J.; STANCULEANU, D.; TIMCHEVA, C.; TZEKOVA, V.; ZAKOTNIK, B.; ZIELINSKI, C.C.; ZWITTER, M.

Therapy of small cell lung cancer with emphasis on oral topotecan. **Lung Cancer**, v. 70, p. 7-13, 2010.

PRESS, B.; DI GRANDI, D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. **Current Drug Metabolism**, v. 9, p. 893 - 900, 2008.

RAMALHETE, C.; MOLNAR, J.; MULHOVO, S.; ROSARIO, V.E.; FERREIRA, M.J. New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6942-6951, 2009.

SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; DAIMON, T.; SONOBE, T. Screening of biochemical modulator by tumor cell permeability of doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, p.63-69, 2008.

SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; SONOBE, T. Enhancement of doxorubicin concentration in the M5076 ovarian sarcoma cells by cucurbitacin E co-treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p.186-191, 2010.

SAMBUI, Y.; DE ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M.L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology and Toxicology**, v. 21, p. 1-26, 2005.

SUGANO, K.; KANSY, M.; ARTURSSON, P.; AVDEEF, A.; BENDELS, S.; DI, L.; ECKER, G.F.; FALLER, B.; FISCHER, H.; GEREBTZOFF, G.; LENNERNAES, H.; SENNER, F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 597 - 614, 2010.

WEISS, R.B.; DONEHOWER, R.C.; WIERNIK, P.H.; OHNUMA, T.; GRALLA, R.J.; TRUMP, D.L.; BAKER JR., J.R.; VAN ECHO, D.; VON HOFF, D.D.; LEYLAND-JONES, B. Hypersensitivity reactions from taxol. **Journal of Clinical Oncology**, v. 8, p. 1263 - 1268, 1990.

YAMASHITA, S.; KONISHI, K.; YAMAZAKI, Y.; TAKI, Y.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; FURUYAMA, Y. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 669-679, 2002.

APÊNDICE 2

AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DA ASSOCIAÇÃO DAS CUCURBITACINAS ATIVAS (N^{os} 16, 18, 19 e 20) COM PACLITAXEL

Outro aspecto avaliado durante a execução deste projeto foi a interação das CUCs mais ativas, pertencentes ao primeiro grupo avaliado, com um dos fármacos utilizados na clínica para o tratamento do câncer de pulmão. Na clínica oncológica, muitos quimioterápicos são usados em combinação, não só para aumentar a eficácia do tratamento, mas também para reduzir o surgimento de células tumorais multirresistentes. O uso de fármacos combinados pode ser efetivo contra múltiplos alvos, subpopulações ou doenças, simultaneamente. O uso de uma combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação pode ter efeito sinérgico no tratamento de uma doença, por aumentar a eficácia do efeito terapêutico, permitir a diminuição da dose diminuindo a toxicidade, diminuir o desenvolvimento de resistência, e otimizar a farmacodinâmica e a farmacocinética dos mesmos. A terapia combinada, conhecida popularmente como coquetel é amplamente usada e compõe o tratamento de escolha para doenças graves como o câncer e a AIDS (CHOU, 2006). Este autor define sinergismo como um efeito maior do que simplesmente o efeito aditivo, ou seja, o somatório de dois efeitos isoladamente, e o antagonismo como um efeito menor do que o aditivo. Chou e Talalay (1981, 1983, 1984) deduziram um modelo matemático para calcular o índice combinatório (IC, em inglês, *combination index*), que quantifica o sinergismo ou antagonismo entre duas substâncias. Neste teorema, valores de IC <1 , $=1$ e >1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. De acordo com os valores de IC, diferentes graus de sinergismo ou antagonismo podem ser determinados conforme mostra o Quadro 1.

Quadro 1: Descrição de sinergismo e antagonismo em estudos de combinação de substâncias, através do método de determinação do Índice Combinatório (IC), de acordo com Chou (2006).

| FAIXA DO IC | INTERPRETAÇÃO | SÍMBOLO |
|--------------|-------------------------|---------|
| <0,10 | Sinergismo muito forte | +++++ |
| 0,10 – 0,30 | Sinergismo forte | ++++ |
| 0,30 – 0,70 | Sinergismo | +++ |
| 0,70 – 0,85 | Sinergismo moderado | ++ |
| 0,85 – 0,90 | Sinergismo fraco | + |
| 0,90 – 1,10 | Aditivo | +/- |
| 1,10 – 1,20 | Antagonismo fraco | - |
| 1,20 – 1,45 | Antagonismo moderado | -- |
| 1,45 – 3,30 | Antagonismo | --- |
| 3,30 – 10,00 | Antagonismo forte | ---- |
| >10,00 | Antagonismo muito forte | ----- |

Protocolos clínicos para a quimioterapia do câncer raramente utilizam um fármaco isolado, mas geralmente combinam dois ou mais medicamentos com diferentes mecanismos de ação. Um protocolo ideal de combinação quimioterápica pode aumentar a eficácia terapêutica, diminuir a toxicidade sistêmica ao paciente ou tecido não alvos e minimizar ou retardar o desenvolvimento de resistência (VON MINCKWITZ, 2007). Na terapia combinada, um fármaco pode atuar como um sensibilizador do processo apoptótico e o outro como um fármaco potencialmente citotóxico, ou seja, um fármaco anula o bloqueio antiapoptótico, fato comum em células tumorais, permitindo que o outro fármaco ative a correspondente via de morte. Em alguns casos, genes inibidores do processo apoptótico (NF-kB, PI3K, cAIP, FLIP) são constantemente expressos e ativos em células tumorais, e um fármaco isolado é incapaz de traduzir o sinal apoptótico além desta barreira, a menos que um outro fármaco reverta este bloqueio. Em outras palavras, um dos fármacos da combinação sinérgica torna, o que antes era uma célula resistente ao processo apoptótico, numa célula propensa e, então, o segundo fármaco da mistura induz esta via de morte. Um segundo mecanismo proposto para as combinações

sinérgicas, envolve fármacos ciclo-dependentes, os quais induzem a morte de células numa fase particular do ciclo celular (DIXON; NORBURY, 2002). Por exemplo, os inibidores da enzima topoisomerase I, atuam predominantemente em células de fase S. Portanto, o uso de inibidores dos pontos de checagem G1 do ciclo celular pode potencializar a ação destes fármacos ciclo-dependentes, exercendo um efeito sinérgico (WANG et al., 2002). Outro aspecto importante a ser considerado é que o mecanismo de sinergismo de uma combinação de fármacos pode variar em diferentes linhagens de células tumorais (BLAGOSKLONNY, 2004).

A possível interação das cucurbitacinas mais ativas, pertencentes ao primeiro grupo analisado, com um dos quimioterápicos (paclitaxel) foi avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT, em células A549, após 48 h de tratamento. Foram testadas as combinações de seis diferentes concentrações (aproximadamente 4x o valor de CC_{50} ; 2x o valor de CC_{50} ; o valor de CC_{50} ; 0,5x o valor de CC_{50} e 0,25x o valor de CC_{50}), de acordo com o desenho experimental proposto por Chou (2006). Os dados de citotoxicidade de cada concentração testada foram inseridos em arquivo do programa Calcsyn (versão 2.1, Biosoft) para determinação dos Índices Combinatórios (IC) de cada ponto.

Os valores de IC obtidos (Tabela 1) mostraram que a associação das CUCs com o paclitaxel resultou num efeito sinérgico, com exceção das duas maiores concentrações testadas das CUCs 16 e 20, que demonstraram um efeito antagônico e aditivo, respectivamente. Importante destacar que a associação destes compostos, em seus respectivos valores de CC_{50} e também em valores menores, acarretou num efeito citotóxico sinérgico, corroborando o fato de que a associação de dois fármacos com mecanismos de ação diferenciados pode ser benéfica no tratamento de tumores, uma vez que baixas concentrações dos compostos foram suficientes para exercerem o seu efeito citotóxico.

Tabela 1: Avaliação do sinergismo das cucurbitacinas (CUC) 16, 18, 19 e 20 com paclitaxel na indução da morte de células A549.

| CUC 16: PAC (50:1) | | IC* | Símbolos | Interpretação |
|---------------------------|------------|------------|-----------------|----------------------|
| Concentração (µM) | | | | |
| CUC 16 | PAC | | | |
| 50,00 | 1,00 | 1,222 | -- | Antagonismo moderado |
| 25,00 | 0,50 | 1,019 | +/- | Aditivo |
| 12,50 | 0,25 | 0,730 | ++ | Sinergismo moderado |
| 6,25 | 0,125 | 0,672 | +++ | Sinergismo |
| 3,13 | 0,0625 | 0,708 | ++ | Sinergismo moderado |
| 1,56 | 0,03125 | 0,576 | +++ | Sinergismo |
| CUC 18: PAC (50:1) | | IC* | Símbolos | Interpretação |
| Concentração (µM) | | | | |
| CUC 18 | PAC | | | |
| 50,00 | 1,00 | 0,620 | +++ | Sinergismo |
| 25,00 | 0,50 | 0,564 | +++ | Sinergismo |
| 12,50 | 0,25 | 0,413 | +++ | Sinergismo |
| 6,25 | 0,125 | 0,250 | ++++ | Sinergismo forte |
| 3,13 | 0,0625 | 0,529 | +++ | Sinergismo |
| 1,56 | 0,03125 | 0,486 | +++ | Sinergismo |

Tabela 1: Avaliação do sinergismo das cucurbitacinas (CUC) 16, 18, 19 e 20 com paclitaxel na indução da morte de células A549. Continuação.

| CUC 19: PAC (1:2) | | IC* | Símbolos | Interpretação |
|--------------------------------|---------|-------|----------|------------------------|
| Concentração (μM) | | | | |
| CUC 19 | PAC | | | |
| 0,5 | 1,00 | 0,081 | +++++ | Sinergismo muito forte |
| 0,25 | 0,50 | 0,539 | +++ | Sinergismo |
| 0,125 | 0,25 | 0,588 | +++ | Sinergismo |
| 0,063 | 0,125 | 0,532 | +++ | Sinergismo |
| 0,031 | 0,0625 | 0,349 | +++ | Sinergismo |
| 0,016 | 0,03125 | 0,378 | +++ | Sinergismo |
| CUC 20: PAC (50:1) | | IC* | Símbolos | Interpretação |
| Concentração (μM) | | | | |
| CUC 20 | PAC | | | |
| 50,00 | 1,00 | 2,327 | --- | Antagonismo |
| 25,00 | 0,50 | 1,049 | +/- | Aditivo |
| 12,50 | 0,25 | 0,844 | ++ | Sinergismo moderado |
| 6,25 | 0,125 | 0,873 | + | Sinergismo fraco |
| 3,13 | 0,0625 | 0,559 | +++ | Sinergismo |
| 1,56 | 0,03125 | 0,702 | ++ | Sinergismo moderado |

PAC= paclitaxel; *Índice combinatório (IC): índice quantitativo, baseado na análise de concentração/resposta, que mede o grau de interação entre substâncias em termos de sinergismo/antagonismo (CHOU, 2006).

Já foi descrito previamente, por Liu e colaboradores (2010), o efeito sinérgico *in vitro* e *in vivo* do docetaxel, um antimetabólito pertencente à mesma classe do paclitaxel, com a cucurbitacina B, em células de tumor de laringe (Hep-2). Thoennissen e colaboradores (2009), também já haviam demonstrado o efeito sinérgico *in vitro* da cucurbitacina B com a gencitabina, um quimioterápico comumente empregado para o tratamento de tumores pancreáticos humanos. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou o efeito antitumoral *in vivo* desta combinação em modelos xenogênicos de câncer pancreático humano

(IWANSKI et al., 2010), quando baixas doses destes compostos provocou uma redução significativa dos tumores, com toxicidade sistêmica mínima.

Um estudo mais recente demonstrou que um inibidor de histona desacetilase, o ácido valpróico, sensibilizou células de melanoma murino para o tratamento com baixas concentrações de cucurbitacina B, a qual induziu morte celular por apoptose (OUYANG et al., 2011). Adicionalmente, a cucurbitacina E promoveu o acúmulo intracelular da doxorrubicina em células de sarcoma de ovário, por facilitar o influxo e prevenir o efluxo desse quimioterápico das células tumorais (SADZUKA et al., 2008; 2010).

Em outro estudo, foi demonstrado o efeito sinérgico de derivados de cucurbitacinas com doxorrubicina, em células de linfoma resistentes a este fármaco (RAMALHETE et al., 2009), devido à capacidade das cucurbitacinas de modular os transportadores de efluxo, sendo, portanto, este um possível mecanismo para o efeito sinérgico observado entre as cucurbitacinas 16, 18, 19 e 20 com o quimioterápico paclitaxel.

REFERÊNCIAS DO APÊNDICE 2

BLAGOSKLONNY, M.V. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. **Oncogene**, v. 23, p. 2967 - 2975, 2004.

CHOU, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 621 - 681, 2006.

CHOU, T.C., TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, p. 450 - 454, 1983.

CHOU, T.C., TALALAY, P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. **European Journal Biochemistry**, v. 115, p. 207-216, 1981.

CHOU, T.C., TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

DIXON, H.; NORBURY, C.J. Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 1, p. 362 - 368, 2002.

IWANSKI, G.B.; LEE, D.H.; EN-GAL, S.; DOAN, N.B.; CASTOR, B.; VOGT, M.; TOH, M.; BOKEMEYER, C.; SAID, J.W.; THOENNISSSEN, N.H.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B, a novel *in vivo* potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 998-1007, 2010.

LIU, T.; PENG, H.; ZHANG, M.; DENG, Y.; WU, Z. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, p. 15-22, 2010.

OUYANG, D.; ZHANG, Y.; XU, L.; LI, J.; ZHA, Q.; HE, X. Histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes B16F10 melanoma cells to cucurbitacin B treatment. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 43, p. 487 - 495, 2011.

RAMALHETE, C.; MOLNAR, J.; MULHOVO, S.; ROSARIO, V.E.; FERREIRA, M.J. New potent P-glycoprotein modulators with the cucurbitane scaffold and their synergistic interaction with doxorubicin on resistant cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6942-6951, 2009.

SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; DAIMON, T.; SONOBE, T. Screening of biochemical modulator by tumor cell permeability of doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, p.63-69, 2008.

SADZUKA, Y.; HATAKEYAMA, H.; SONOBE, T. Enhancement of doxorubicin concentration in the M5076 ovarian sarcoma cells by cucurbitacin E co-treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p.186-191, 2010.

THOENNISSSEN, N.H.; IWANSKI, G.B.; DOAN, N.B.; OKAMOTO, R.; LIN, P.; ABBASSI, S.; SONG, J.H.; YIN, D.; TOH, M.; XIE, W.D.; SAID, J.W.; KOEFFLER, H.P. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. **Cancer Research**, v. 69, p.5876-5884, 2009.

VON MINCKWITZ, G. Docetaxel/anthracycline combinations for breast cancer treatment. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 8, p. 485 - 495, 2007.

WANG, J.L.; WANG, X.; WANG, H.; ILIAKIS, G.; WANG, Y. CHK1-regulated S-phase checkpoint response reduces camptothecin cytotoxicity. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 1, p. 267 - 272, 2002.

APÊNDICE 3

Artigos correspondentes a outras atividades realizadas no período do Doutorado (2009-2013).

Artigos publicados

OLIVEIRA, S.Q.; ALMEIDA, M.T.R.; **SILVA, I.T.**; SINCERO, T.C.M.; PALERMO, J.A.; CABRERA, G.M.; CARO, M.S.B.; SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Isolation of three new ent-labdane diterpenes from *Dodonaea viscosa* Jacquin (Sapindaceae): preliminary evaluation of antiherpes activity. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 500 - 505, 2012.

LANG, K.L.; **SILVA, I.T.** ; ZIMMERMANN, L.A.; LHULLIER, C.; ARANA, M.V.M.; PALERMO, J.A.; FALKENBERG, M.B.; SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; DURÁN, F.J. Cytotoxic activity of semi-synthetic derivatives of elatol and isoobtusol. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2254-2264, 2012.

SILVA, I.T.; CAON, T.; LUCKEMEYER, D.D.; RAMOS, F.A.; AREVALO-FERRO, C.; SCHENKEL, E.P.; DUQUE, C.; SIMOES, C.M. O. Antiherpes screening of marine organisms from Colombian Caribbean Sea. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 608 - 614, 2011.

MONTAGNER, C.; SAVI, L.A.; **SILVA, I.T.**; KRATZ, J.M.; SMÂNIA, E.F.A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA JUNIOR, A.; SIMOES, C.M.O. In Vitro Cytotoxic Screening of Coumarins. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1669 - 1674, 2011.

SILVA, I.T.; COSTA, G.M.; STOCO, P.H.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; SIMOES, C.M.O. *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 143 - 148, 2010.