

FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA PLANTA *Salacia*
impressifolia

ANA CAROLINA BORGES DA CRUZ RODRIGUES

Salvador – Bahia

2019

IGM

ANA CAROLINA BORGES DA CRUZ RODRIGUES

Potencial antineoplásico da planta *Salacia impressifolia*

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA PLANTA *Salacia
impressifolia***

ANA CAROLINA BORGES DA CRUZ RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do título de Mestre.

Salvador – Bahia

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

R696p Rodrigues, Ana Carolina Borges da Cruz.
Potencial antineoplásico da planta *salacia impressifolia*. / Ana Carolina
Borges da Cruz. - 2019.
91 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra, Laboratório de Engenharia
Tecidual e Imunofarmacologia.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. *Salacia impressifolia*. 2. Triterpenos. 3. Citotoxicidade. 4. Apoptose.
I. Título.

CDU 616-006.6:633.88

" POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DA PLANTA *SALACIA IMPRESSIFOLIA*."

ANA CAROLINA BORGES DA CRUZ RODRIGUES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 21 de fevereiro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Fo R F >

Dr. Fabio Rocha Formiga
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

Maxonubs

Dra. Danzy Flavia Silva Amorim de Vasconcelos
Professora Adjunta
UFBA

Karine A. Damasceno

Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

CNPq

FAPESB

AGRADECIMENTOS

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

À Deus, por ter me concedido saúde e força para superar as dificuldades.

À minha mãe, minha heroína, pelo apoio, dedicação e amor, e, por ser a responsável por me fornecer todas as ferramentas necessárias por cada conquista que tive até hoje.

Ao meu pai e ao meu irmão, por todo incentivo e por sempre demonstrar orgulho e confiança nos meus objetivos.

As minhas avós, Dinária e Maria (*in memoriam*), e a todos os meus familiares por estarem presentes em todas minhas batalhas, sempre enviando-me energias positivas.

Ao meu namorado, Pedro Andrade, por toda paciência, apoio e companheirismo de todas as horas.

À Sara e Larissa pelo apoio, auxílio, amizade, paciência e parceria. Não conseguiria concluir esta etapa sem a ajuda de vocês, amigas que levarei para a vida.

Às minhas amigas da vida, que me apoiam incansavelmente em todas as minhas batalhas.

Ao melhor grupo de pesquisa do Câncer (Rafaela, Rosane, Valdenízia, Luciano, Ingrid, Suellen, Sheila, Mateus e Felipe) e aos colegas do LETI, que ajudaram tornar os dias de trabalho mais agradáveis.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pereira Bezerra, pela oportunidade, suporte e motivação para a realização deste trabalho.

Meu agradecimento a CAPES, CNPq e FAPESB, órgãos financiadores deste projeto.

Meus agradecimentos ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa – IGM e aos membros do corpo docente e funcionários.

A Biblioteca do IGM, pela contribuição e cuidados na revisão das normas desta dissertação.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha caminhada durante esses dois anos de mestrado, meus sinceros agradecimentos.

RODRIGUES, Ana Carolina Borges da Cruz. Potencial antineoplásico da planta *Salacia impressifolia*. 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Medicina Preventiva) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Salacia impressifolia* (Miers) A .C Smith (família Celastraceae) é uma planta medicinal tradicional encontrada na Amazônia conhecida como “miraruíra”, “cipó-miraruíra” ou “panu” e é tradicionalmente usada para tratar dengue, gripe, inflamação, dor, diabetes, impotência masculina, afecções renais, reumatismo e câncer. **OBJETIVO:** Investigar o potencial antineoplásico *in vitro* e *in vivo* da planta *S. impressifolia* em modelos experimentais. **MATERIAL E MÉTODOS:** Determinou-se a atividade citotóxica *in vitro* de extratos, frações e triterpenos quinonametídios (22-hidroxitingenona, tingenona e pristimerina) da casca do caule de *S. impressifolia* em um pequeno painel de linhagens cancerígenas em cultura. Posteriormente, células de leucemia promielocítica humana HL-60 foram incubadas com tingenona (0,6 e 1,2 μ M), 22-hidroxitingenona (1,2 e 2,4 μ M) e pristimerina (2,5 e 5 μ M), e o número de células viáveis foi determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam. A análise do ciclo celular, o potencial transmembrânico mitocondrial, marcação para anexina V/iodeto de propídio e a quantificação de espécies reativas de oxigênio foram determinadas por citometria de fluxo. A atividade antitumoral *in vivo* do extrato de acetato de etila (EAE) e de sua fração (FEAE.3) foi avaliada em camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HL-60. **RESULTADOS:** O extrato EAE, sua fração FEAE.3 e os triterpenos quinonametídeos exibiram potente citotoxicidade contra linhagens de células neoplásicas. Células HL-60 tratadas com tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina apresentaram uma redução no número de células viáveis, aumento da fragmentação do DNA internucleossomal, redução do potencial transmembrânico mitocondrial e aumento da externalização de fosfatidilserina, sugerindo indução de morte celular apoptótica. Os compostos não induziram aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Além disso, o extrato EAE e sua fração FEAE.3 inibiram o desenvolvimento *in vivo* de células HL-60 inoculadas em camundongos C.B-17 SCID. As taxas de inibição da massa tumoral foram mensuradas em 40,4 e 81,5% para o extrato EAE (20 mg/kg) e sua fração FEAE.3 (20 mg/kg), respectivamente. **CONCLUSÃO:** O extrato de acetato de etila e sua fração

obtidos da casca do caule de *S. impressifolia* exibem potencial antineoplásico *in vitro* e *in vivo* que pode ser atribuída aos seus triterpenos quinonametídeos. Esses dados confirmam o uso etnofarmacológico desta espécie e podem contribuir para o desenvolvimento de um novo fitoterápico antineoplásico.

Palavras-chave: *Salacia impressifolia*, Triterpenos, HL-60, Citotoxicidade, Apoptose.

RODRIGUES, Ana Carolina Borges da Cruz. Antineoplastic potential of *Salacia impressifolia* plant. 2019. 91 f. Dissertation (Master in Biotechnology and Preventive Medicine) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (family Celastraceae) is a traditional medicinal plant found in the Amazon Rainforest known as “miraruíra”, “cipó-miraruíra” or “panu” and is traditionally used to treat dengue, flu, inflammation, pain, diabetes, male impotency, renal affections, rheumatism and cancer. **AIM:** To investigate *in vitro* and *in vivo* antineoplastic potential of the plant *S. impressifolia* in experimental models. **MATERIAL AND METHODS:** The *in vitro* cytotoxic activity of extracts, fractions and quinonemethide triterpenes (22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin) from the stem bark of *S. impressifolia* bark in a small panel of cultured cell lines was determined. Subsequently, HL-60 human promyelocytic leukemia cells were incubated with tingenone (0.6 and 1.2 μ M), 22-hydroxytingenone (1.2 and 2.4 μ M) and pristimerin (2.5 and 5 μ M), and the number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay. Cell cycle analysis, mitochondrial transmembrane potential, labeling for annexin V/propidium iodide and quantification of reactive oxygen species were determined by flow cytometry. The *in vivo* antitumor activity of the ethyl acetate extract (EAE) and of its fraction (FEAE.3) from the stem bark of *S. impressifolia* was assessed in C.B-17 SCID mice engrafted with human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **RESULTS:** The extract EAE, its fraction FEAE.3, and quinonemethide triterpenes exhibited potent cytotoxicity against cancer cell lines. HL-60 cells treated with tingenone, 22-hydroxytingenone and pristimerine showed a reduction in the number of viable cells, increased internucleosomal DNA fragmentation, reduced mitochondrial transmembrane potential and increased phosphatidylserine outgrowth, suggesting induction of apoptotic cell death. The compounds did not induce an increase in the levels of reactive oxygen species. Moreover, extract EAE and its fraction FEAE.3 inhibited the *in vivo* development of HL-60 cells engrafted in C.B-17 SCID mice. Tumor mass inhibition rates were measured as 40.4 and 81.5% for the extract EAE (20 mg/kg) and for its fraction FEAE.3 (20 mg/kg), respectively. **CONCLUSION:** Ethyl acetate extract and its fraction from the stem bark of *S. impressifolia* exhibit *in vitro* and *in vivo* antineoplastic potential that can be attributed to their quinonemethide triterpenes. These data confirm the ethnopharmacological use

of this species and may contribute to the development of a novel anticancer herbal medicine.

Keywords: *Salacia impressifolia*, Triterpenes, HL-60, Citotoxicity, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** p53 e suas funções. Adaptado: p53 family and cellular stress responses in câncer.....22
- Figura 2** Fluxograma exibindo um esquema simplificado das bases moleculares do câncer.....24
- Figura 3** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma25
- Figura 4** *Salacia impressifolia*.....34
- Figura 5** Cromatograma semi-preparativo de fase inversa da fração FEAE.3 a 420 nm.37
- Figura 6** Estrutura química dos triterpenos quinonametídeos isolados de *S. impressifolia*. 22-hidroxitingenona (1), tingenona (2) e pristimerina (3). ...37
- Figura 7** Curvas de sobrevivência celular obtidas de três experimentos independentes realizadas em duplicata, avaliadas pelo ensaio de alamar blue após 72 h de incubação.....47
- Figura 8** Efeito dos triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* sobre a viabilidade de células HL-60 determinadas por exclusão com o corante azul de tripam, após 24 e 48 h de incubação.....53
- Figura 9** Efeito de triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* na indução de apoptose em células HL-60 após 24 e 48 h de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP.....55
- Figura 10** *Dot plots* representativos da marcação com Anexina V/Iodeto de propídio por citometria de fluxo.56
- Figura 11** Efeito dos triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HL-60, após 24 h de tratamento57
- Figura 12** Efeito de triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de células HL-60 por citometria de fluxo usando marcação por H2-DCF-DA.58
- Figura 13** Atividade antitumoral *in vivo* do extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) obtidos da casca do caule de *Salacia impressifolia* em camundongos C.B-17 SCID com células HL-60 xenoinxertadas62

Figura 14 Análise histológica representativa de tecido pulmonar, renal e hepático corado com hematoxilina-eosina e analisado por microscopia de luz (barra = 50 μm).....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais classes de agentes naturais anticancerígenos.	30
Tabela 2	Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade.	38
Tabela 3	Delineamento do experimento <i>in vivo</i> em camundongos CB-17 SCID.	43
Tabela 4	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) da atividade citotóxica dos extratos e frações da casca do caule de <i>Salacia impressifolia</i>	49
Tabela 5	Valores de CI_{50} (μM) da atividade citotóxica dos triterpenos quinonametídeos da casca do caule de <i>Salacia impressifolia</i>	50
Tabela 6	Índice de seletividade dos compostos obtidos de <i>Salacia impressifolia</i> para a linhagem MRC-5.....	51
Tabela 7	Índice de seletividade dos compostos obtidos de <i>Salacia impressifolia</i> para PBMC.	51
Tabela 8	Efeito dos triterpenos isolados de <i>Salacia impressifolia</i> sobre o ciclo celular.....	60
Tabela 9	Efeito do tratamento com extrato de acetato de etila (EAE) e de sua fração (FEAE.3) da casca do caule de <i>Salacia impressifolia</i> no peso corporal e relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HL-60.....	63
Tabela 10	Efeito do tratamento com extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) obtidos de <i>Salacia impressifolia</i> sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HL-60.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATO	Trióxido de arsênico
ATRA	Ácido transretinoico
Cl ₅₀	Concentração inibitória média
CDKs	Cinase dependente de ciclina
CO ₂	Dióxido de carbono
CTL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EAE	Extrato de acetato de etila
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetra Acetic Acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EM	Extrato metanólico
E.P.M	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FEAE	Fração do extrato de acetato de etila
FEM	Fração do extrato metanólico
5-fu	5-fluouracil
GST	Gene supressor de tumor
HE	Hematoxilina e eosina
H ₂ -DCF-DA	Diacetato de 2,7 diclorofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Intervalo de confiança
IP	Iodeto de propídio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IS	Índice de seletividade
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLC	Leucemia linfoide crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MeOH	Metanol
NCT	American National Cancer Institute
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato)
PML	Promyelocytic leukemia

RDD	Resposta ao dano de DNA
RNAmi	Micro RNA
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro bovino fetal
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 CÂNCER	19
2.2 LEUCEMIA.....	25
2.3 TERAPIAS DO CÂNCER.....	27
2.4 AGENTES QUIMIOTERÁPICOS E PRODUTOS NATURAIS.....	28
2.5 O GÊNERO <i>SALACIA</i>	31
3. OBJETIVOS	35
3.1 GERAL.....	35
3.2 ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	36
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS ..	36
4.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	38
4.3.1 <i>Células</i>	38
4.3.2 <i>Avaliação da atividade citotóxica (ensaio do alamar blue)</i>	39
4.3.3 <i>Avaliação da viabilidade celular</i>	40
4.3.4 <i>Ensaio de marcação com Anexina-V/IP</i>	40
4.3.5 <i>Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA</i>	41
4.3.6 <i>Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio</i>	42
4.3.7 <i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</i>	42
4.4 ENSAIO <i>IN VIVO</i>	43
4.4.1 <i>Animais</i>	43
4.4.2 <i>Modelo xenográfico</i>	43
4.4.3 <i>Avaliação toxicológica</i>	44
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5. RESULTADOS	46
5.1 OS COMPOSTOS OBTIDOS DE <i>S. IMPRESSIFOLIA</i> SÃO CITOTÓXICOS FRENTE À DIFERENTES CÉLULAS CANCEROSAS	46

5.2 OS TRITERPENOS ISOLADOS DE <i>SALACIA IMPRESSIFOLIA</i> DESENCADAM APOPTOSE MEDIADA POR AUMENTO DA DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL, MAS NÃO VIA ERO	54
5.3 OS TRITERPENOS ISOLADOS DE <i>SALACIA IMPRESSIFOLIA</i> INDUZEM A FRAGMENTAÇÃO DO DNA	59
5.4 O EXTRATO DE ACETATO DE ETILA (EAE) E SUA FRAÇÃO (FEAE.3) OBTIDOS DE <i>SALACIA IMPRESSIFOLIA</i> REDUZEM O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HL-60 EM MODELO XENOGRÁFICO	60
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE.....	91

1. INTRODUÇÃO

O câncer compõe um grupo de várias doenças que exibem em comum o crescimento desordenado de células, possibilitando a invasão agressiva de tumores malignos para outras regiões do corpo, na maioria das vezes, causadas por uma desregulação de múltiplas vias de sinalização celular. Considerado uma das doenças mais graves e comuns atualmente, o câncer representa a segunda principal causa de morte no mundo, de forma que uma em cada seis mortes é devido a esta doença (OMS, 2017).

Dados globais apresentados pelo INCA relatam que existem 20 milhões de pessoas com câncer no mundo, atingindo 190 mil mortes por ano. No Brasil foi estimado a ocorrência de 600 mil casos novos para o biênio 2018-2019. Em 2025 a previsão é de que o impacto do câncer será de 80% entre os países em desenvolvimento, já em 2030, espera-se uma incidência mundial de 21,4 milhões de novos casos (INCA, 2017).

O tratamento do câncer baseia-se principalmente na terapia combinada, pois na maioria dos casos, é uma doença de difícil controle. No entanto, a quimioterapia convencional ainda é a principal abordagem terapêutica para o tratamento do câncer (RAHMAN e HASAN, 2015). Porém, o grande problema deste método é que os medicamentos utilizados não afetam apenas as células cancerosas, mas também células saudáveis (efeito sistêmico) e, por isso, causam efeitos adversos ao paciente (BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2004).

A biodiversidade brasileira é uma fonte imensurável de moléculas bioativas, principalmente de origem vegetal. Os produtos naturais possuem um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de doenças humanas. Mais de 70% dos novos fármacos aprovados entre 1981 e 2010 são direto ou indiretamente relacionados aos produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2012).

O gênero *Salacia* pertence à família Celastraceae, que possui distribuição predominantemente tropical e subtropical, incluindo cerca de 50 gêneros e 1000 espécies (SOUZA *et al.*, 2008). As espécies do gênero *Salacia* já são descritas na literatura por possuir diversas atividades biológicas, dentre elas: atividade antidiabética, antimicrobiana, antioxidante, hepatoprotetora, citotóxica, anti-inflamatória, antiobesidade e hipotensiva, evidenciando a eficácia da utilização das

espécies na medicina popular e assegurando que possuem grande potencial como fonte de moléculas bioativas (PAARAKH *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a planta *Salacia impressifolia* tem sido utilizada por índios da Amazônia peruana para o tratamento de tumores (BRAKO e ZARUCCHI, 1993; CLAVO *et al.*, 2003). Embora diversas utilidades medicinais tenham sido descritas para *S. impressifolia*, poucos trabalhos científicos são encontrados para esta espécie, aos quais descrevem as propriedades antioxidantes e alguns de seus constituintes químicos (SANTO *et al.*, 2013; MANOEL e MOYA, 2015; SILVA *et al.*, 2016; PAZ *et al.*, 2018).

Assim, a hipótese deste estudo é que o extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) e os triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina isolados de *S. impressifolia* apresentam potencial antineoplásico promissor.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer (tumores malignos ou neoplasias) é um termo genérico para um grande grupo de doenças caracterizada pelo crescimento anormal de células anormais além de seus limites habituais, que podem afetar qualquer parte do corpo. Uma característica definidora do câncer é a rápida proliferação de células anormais que crescem além de seus limites habituais e, que pode, em seguida, invadir partes adjacentes do corpo, se espalhando para outros órgãos. Este processo é referido como metástase (WHO, 2014).

A carcinogênese (processo de formação do câncer) em geral se dá lentamente, podendo levar anos até que prolifere e dê origem a um tumor visível, na maioria dos casos. A patogênese neoplásica é um processo complexo que pode ser dividido em três estágios distintos. O primeiro processo é chamado de estágio de iniciação, nele as células sofrem o efeito dos agentes carcinógenos provocando alterações genéticas. O segundo estágio é o de promoção, passando a atuar os agentes carcinogênicos oncopromotores, a célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor. Por último, dá-se o estágio de progressão, que é caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, evoluindo até o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (ALMEIDA *et al.*, 2005; OLIVEIRA, *et al.*, 2007).

As causas primárias do câncer são bastante diversas e ainda não estão muito bem elucidadas, porém é sabido que as neoplasias se originam a partir de mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes carcinogênicos, as quais promovem modificações no ciclo celular e, como consequência, aumento na taxa de proliferação e desregulação no processo de morte celular programada (ALMEIDA *et al.*, 2005).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. Desta forma, vários fatores contribuem para o desenvolvimento de células cancerosas, incluindo ação de substâncias químicas presentes no meio ambiente ou na alimentação, alteração genômica por vírus ou mutações, influência de agentes físicos como a radiação ou herdada geneticamente. Estes fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando

a probabilidade de transformações malignas nas células normais, levando o acúmulo de mutações no DNA em decorrência de alterações de sequências, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos que afeta direta ou indiretamente nas funções dos proto-oncogenes, levando a ativação dos mesmos, como também nas funções dos genes supressores e reparadores do DNA, inativando-os (LUO, SOLMINI, ELLEDGE, 2009; INCA, 2017).

De modo geral, os proto-oncogenes são uma família de genes que codificam proteínas envolvidas no controle do ciclo celular a fim de promover a proliferação celular ordenada. Essas alterações no DNA adquiridas e/ou herdadas levam à transformação de proto-oncogenes em oncogenes, que quando presentes e/ou superexpressos podem predispor ao desenvolvimento de câncer, promovendo a proliferação celular excessiva (VERMEULEN *et al.*, 2003).

Os oncogenes podem ser classificados em cinco classes baseadas em produtos proteicos formados por mutação ou desregulação de proto-oncogenes. As proteínas codificadas pelos oncogenes podem atuar como fatores de crescimento ou como seus receptores, como transdutores de sinais, como fatores de transcrição ou como componentes do ciclo celular. Mutações nos fatores de crescimento podem levar a vários tipos de câncer, como fibrossarcoma, glioblastoma (câncer cerebral), osteossarcoma (câncer ósseo), etc. Em vários tumores, as deleções do "domínio de ligação ao ligante" do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) provocam uma ativação sucessiva do receptor, mesmo na ausência de ligante, pela atividade da proteína transmembrana com um domínio de ligação externa e um domínio citoplasmático do tipo tirosina-cinase. Essa ativação causa interação com outras proteínas citoplasmáticas, como "domínio SRC", e leva à desregulação de várias vias de sinalização. Principalmente nos cânceres gastrointestinal, mama e pulmão, ocorrem mutações de EGFR. Da mesma forma, a superexpressão da cinase Raf-1 e cinases dependentes de ciclina (CDKs), devido à fosforilação descontrolada, pode causar muitos tipos de câncer, como câncer de tireoide e ovário. A ativação desregulada de GTPases, tal como Ras, causa a ativação da via da MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases – Proteínas quinases ativadas por mitógenos) e a sinalização e divisão descontroladas das células, causando vários tipos de câncer, como a leucemia mielóide. Proteínas de fatores de transcrição também são produtos de proto-oncogenes. A mutação, translocação ou rearranjo dessas, causa a superexpressão do gene e a transcrição consecutiva indesejada do gene alvo que

pode levar ao desenvolvimento de qualquer tipo de câncer, como câncer pancreático e de pulmão (IMRAM *et al.*, 2017).

Os genes supressores de tumor (GST) mantêm a proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular e, uma vez mutados perdem sua função permitindo que as células com DNA alterado se multipliquem desordenadamente. Em geral, os GST desempenham papéis-chave nos pontos de verificação do ciclo celular e na manutenção da estabilidade genômica. Os GST defeituosos geralmente permitem o crescimento celular descontrolado sem reparo normal do DNA, apoptose e regulação metabólica normal. As proteínas supressoras de tumor formam uma rede de pontos de checagem que evitam o crescimento desenfreado. Muitos supressores de tumor, tais como a RB e a p53, são parte de uma rede regulatória que reconhece o estresse genotóxico e respondem através da finalização da proliferação (VELEZ e HOWARD, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).

O p53 é um supressor de tumor crucial que responde a diversos sinais de estresse, orquestrando respostas celulares específicas, incluindo a interrupção transitória do ciclo celular, senescência celular e apoptose, que são todos processos associados a supressão tumoral (KUMMAR *et al.*, 2008; BIEGING *et al.*, 2014). Desta forma, o gene TP53 é regulador de uma ampla rede responsável por controlar a integridade do genoma em decorrência a danos celulares, como mutações cromossômicas, hipóxia, choque térmico, redução de metabólitos, oncoproteínas virais e ativação de oncogenes celulares. A proteína p53 é inativada em grande parte dos cânceres, seja por mutações no gene TP53 ou pela desregulação de suas vias associadas (**Figura 1**) (MENENDEZ *et al.*, 2007; MAXIMOV e MAXIMOV, 2008; FERREIRA e ROCHA, 2010).

É fundamental o entendimento dos mecanismos relacionados a p53 e as bases moleculares das vias de sinalização associadas e, como elas são desreguladas em diferentes linhagens de células cancerígenas, fornecerá a plataforma para o desenvolvimento de terapia anticâncer personalizada que complementem os métodos convencionais de tratamento (JOERGER e FERSHT, 2016).

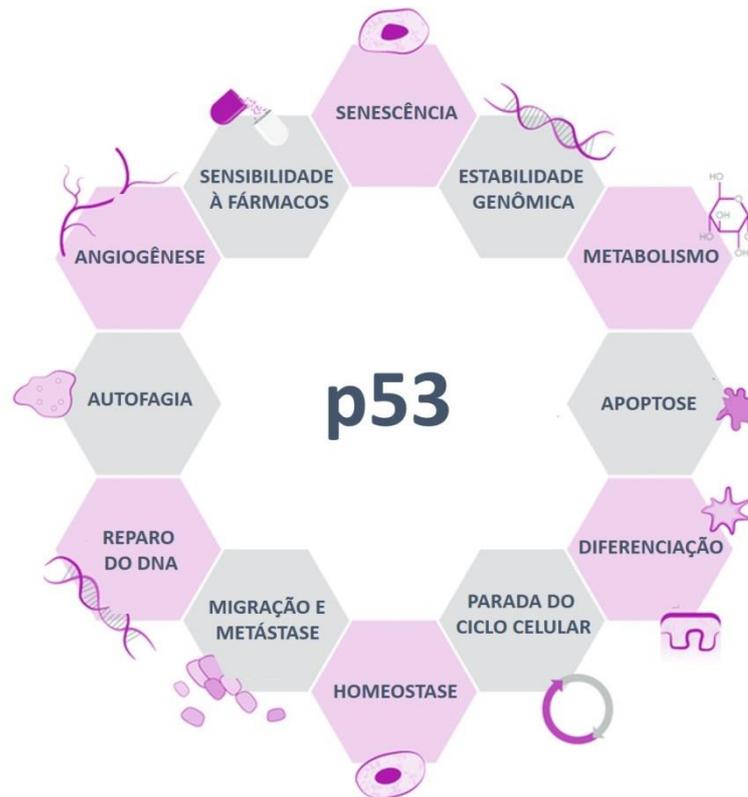


Figura 1. p53 e suas funções. Adaptado: p53 family and cellular stress responses in câncer (PFLAUM *et al.*, 2014).

Os genes reparadores de danos do DNA estão constantemente reparando as moléculas que sofreram mutação. Durante o ciclo celular, as células progridem através de uma série de pontos de controle do ciclo, antes da divisão celular mitótica e distribuição do material genômico para as células filhas. Em resposta ao estresse genotóxico, as células ativam esses pontos de checagem para prevenir a progressão pelo ciclo celular e iniciar o reparo do DNA. Se a extensão do dano ao DNA estiver além da capacidade de reparo, vias adicionais de sinalização que levam à indução da apoptose são ativadas, eliminando células mutantes potencialmente perigosas. Esta rede de sinalização, comumente chamada de resposta ao dano de DNA (RDD), é rigidamente controlada e envolve regulação nos níveis transcripcional, pós-transcripcional e pós-traducional. As células mutadas estão em constante processo de divisão celular devido ao mal funcionamento dos mecanismos de regulação do ciclo celular, com conseqüentemente acúmulo de mutações genéticas nas células cancerosas. Os defeitos nas vias de reparo do DNA permitem que as células cancerígenas acumulem alterações genômicas que contribuem para seu fenótipo agressivo (VERMEULEN *et al.*, 2003; DIETLEIN *et al.*, 2014).

A expressão gênica é regulada em vários níveis e não apenas em resposta a modificações no DNA. Alterações epigenéticas são definidas como modificações herdadas que não estão presentes na sequência de DNA. Tais mudanças ocorrem por meio de agentes químicos, dieta ou exposições ambientais e são consideradas reversíveis, dentre estas mudanças podemos citar, processos-chave de metilação do DNA, modificações da cromatina, posicionamento dos nucleossomas (desacetilação de histonas) e alterações nos perfis de RNA não-codificante. Os mecanismos epigenéticos são essenciais para o desenvolvimento normal e a manutenção de padrões de expressão de genes específicos de tecidos em mamíferos. A interrupção destes processos podem levar à alteração da função genética e à transformação celular maligna. A metilação de vários promotores de genes supressores de tumor é responsável por seu silenciamento e, portanto, potencialmente sustenta a carcinogênese. Da mesma forma, a desacetilação de histonas pode levar à ativação de oncogenes. Tem sido demonstrado que o crescimento de vários tipos de tumores pode ser estimulado por alterações epigenéticas em várias fases da carcinogênese. As modificações epigenéticas precedem as mudanças genéticas e geralmente ocorrem em estágio inicial do desenvolvimento neoplásico (KANWAL *et al.*, 2015; BISHOP e FERGUSON, 2015; PERRI *et al.*, 2017).

A associação dessas alterações funcionais e/ou estruturais resultam em novas características fenotípicas às células cancerígenas garantindo a malignidade tumoral, tais como: autossuficiência em sinais de crescimento (independem de fatores de crescimento), resistência aos sinais antiproliferativos (insensíveis aos inibidores de crescimento), evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado (imortalidade), angiogênese sustentada (crescimento sustentado em células do estroma para atrair novos vasos), invasão, metástase, e há pouco tempo relatado, evasão do sistema imunológico e reprogramação do metabolismo energético (HANAHAN & WEINBERG, 2011) (**Figura 2**).

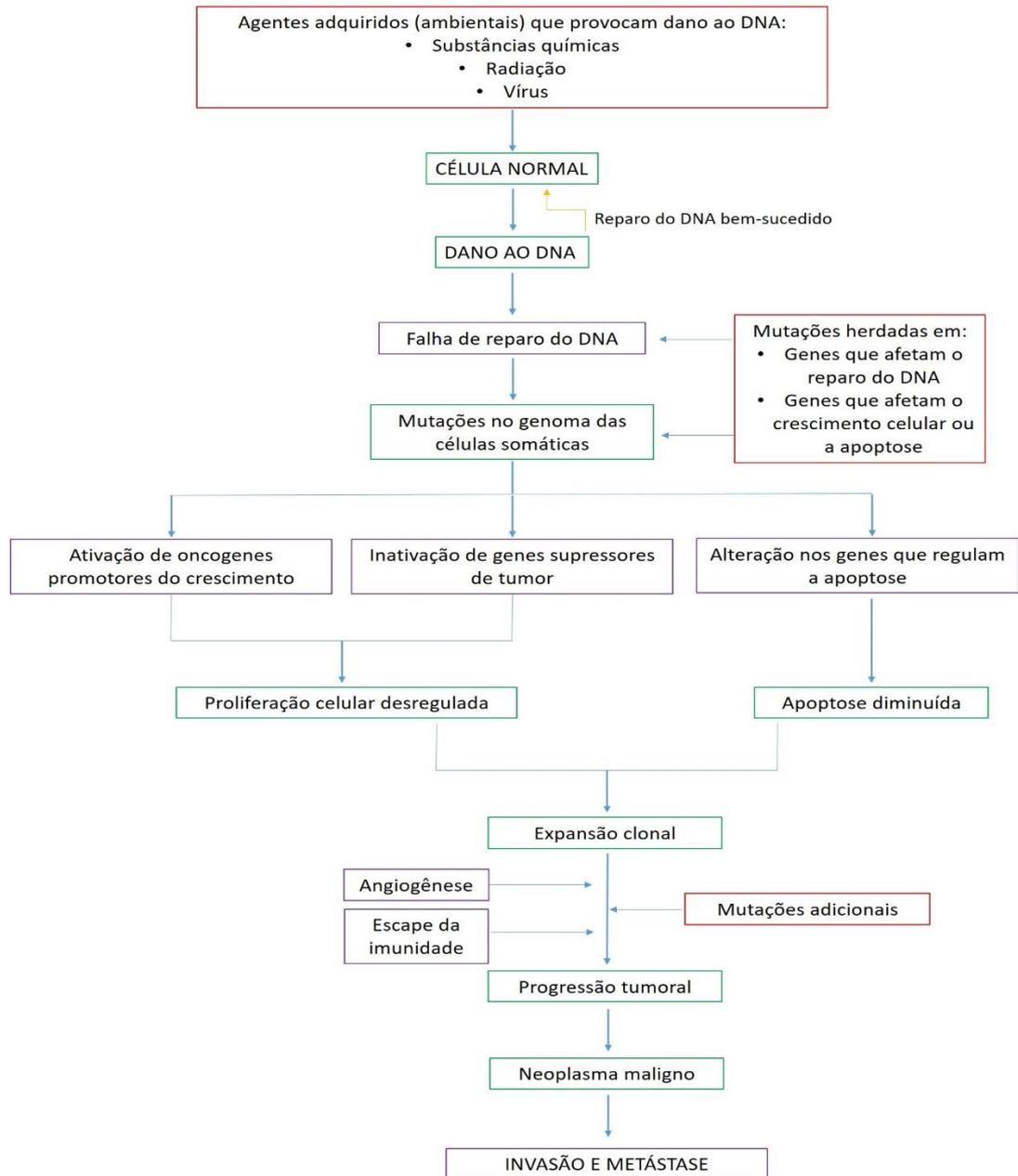


Figura 2. Fluxograma exibindo um esquema simplificado das bases moleculares do câncer. Adaptado: Patologia: Bases patológicas das doenças (KUMMAR *et al.*, 2008).

O câncer é considerado um grande problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Conforme estimativas mundiais do projeto Globocan 2018, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial da Saúde (OMS), os dados globais sobre a doença sugerem que a carga global aumentou para 18,1 milhões de casos e 9,6 milhões de mortes por câncer. E, ainda se estima que em 2030 a carga global será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de morte por câncer. De acordo com o INCA (2017) (Instituto Nacional do Câncer), no Brasil, estima-se que no biênio 2018/2019 ocorreriam 600 mil

novos casos de câncer por ano, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos). Os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres foram os mais frequentes. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes em homens foram próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figuraram entre os principais (**Figura 3**). Na Bahia, as estimativas apontaram 14.350 de casos novos para o ano de 2018 (INCA, 2017).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.700	28,8%	Homens		Colo do Útero	2.300	24,8%
Estômago	1.150	12,2%			Mama Feminina	1.730	18,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	820	8,7%			Cólon e Reto	660	7,1%
Cólon e Reto	450	4,8%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	520	5,6%
Leucemias	390	4,2%			Estômago	480	5,2%
Cavidade Oral	330	3,5%			Leucemias	310	3,3%
Linfoma não Hodgkin	270	2,9%			Ovário	270	2,9%
Sistema Nervoso Central	270	2,9%			Glândula Tireoide	270	2,9%
Laringe	240	2,6%			Sistema Nervoso Central	270	2,9%
Esôfago	240	2,6%			Corpo do Útero	200	2,2%
			Mulheres				

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2017.

2.2 LEUCEMIA

A leucemia é uma neoplasia maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), geralmente, de origem desconhecida. Tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. Para o Brasil, estimam-se 10.800 casos novos de leucemia para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2017).

As causas que levam ao desenvolvimento da leucemia não são completamente elucidadas, ainda que, ultimamente, uma série de fatores descritos como leucemogênicos (produtos químicos diversos, imunodeficiências, entre outros), tenham sido identificados, e estão relacionados com a ativação de oncogenes ou na

inativação de genes supressores de tumor (BACHIREDDY, RAKHRA e FELSHER, 2012). Assim como, ao que acontece na grande maioria dos casos de câncer, diversos fatores podem estar diretamente correlacionados a etiologia das neoplasias hematopoiéticas, incluindo fatores genéticos, imunológicos e ambientais, como também infecções (WIEMELS, 2012).

Todas as células pluripotentes na medula óssea proliferam em duas principais linhagens celulares: as células mielóides, que incluem granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e monócitos; e as células linfóides, que incluem os linfócitos B e T. As leucemias são inicialmente classificadas quanto a linhagem hematopoiética predominantemente envolvida no processo (linfóide ou mielóide) e quanto ao grau de maturidade dessas células (agudas ou crônicas). Desta forma, a classificação combinada geram quatro subtipos; a leucemia linfóide crônica (LLC), como o nome sugere afeta a célula linfóide desenvolvendo-se de maneira lenta e incide em pessoas com idade superior a 55 anos; a leucemia linfóide aguda (LLA) tem um processo de agravamento mais acelerado e é o tipo mais comum em crianças, mas pode haver casos deste tipo em adultos; a leucemia mielóide crônica (LMC) prejudica a célula mielóide e se manifesta lentamente principalmente em adultos e a leucemia mielóide aguda (LMA) que tem uma rápida evolução e ocorre em qualquer uma das faixas etária. Geralmente as leucemias agudas requerem um diagnóstico precoce para o início de tratamento imediato pelo prognóstico desfavorável (BARION, *et al.*, 2007; MEENAGHAN, DOWLING e KELLY, 2012; INMAN e KUEHL, 2017; INCA, 2018).

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo de leucemia mielóide aguda (LMA) com características biológicas e clínicas particulares. A LPA representa aproximadamente 5 a 10% dos casos de LMA, ocorrendo com maior frequência no grupo etário dos 15 aos 60 anos. Alguns estudos descrevem uma prevalência acrescida no sexo feminino (LACERDA *et al.*, 1993). Ao contrário de outras formas de LMA, a LPA é única, pois pode causar coagulopatia e morte se não for prontamente diagnosticado. Morfologicamente classificada como AML-M3 pela classificação Franco-Americano-Britânica (FAB), a LPA é tipicamente caracterizado pela proliferação neoplásica de células na medula óssea com um fenótipo promielocítico e a translocação recíproca equilibrada $t(15; 17)(q24.1; q21.2)$, que resulta na fusão entre os genes RARA e Promyelocytic Leukemia (PML), e cria o gene híbrido PML-RARA. A proteína de fusão recém-produzida reprime os genes alvo RARA e não-RARA, resultando em proliferação descontrolada e inibição da diferenciação celular.

Normalmente, a LPA é sensível ao efeito diferenciador do ácido transretinóico (ATRA) e trióxido de arsênio (ATO) (ADAMS e NASSIRI, 2015).

2.3 TERAPIAS DO CÂNCER

O tratamento do câncer é baseado geralmente na combinação de diferentes técnicas, pois na maioria dos casos, é uma doença progressiva e de difícil controle. As técnicas utilizadas são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, e muitas vezes, podem ser utilizados de forma combinada. Na fase inicial da doença, os pacientes de baixo risco são frequentemente curados apenas com cirurgia, mas em muitos outros casos é necessária uma combinação de tratamentos. Na doença metastática, a terapia sistêmica é a principal modalidade terapêutica, pois o fornecimento através da corrente sanguínea facilita o acesso aos locais das metástases. Terapias sistêmicas incluem terapia hormonal, terapia direcionada, imunoterapia e quimioterapia (DICKENS e AHMED, 2018).

A cirurgia foi a primeira modalidade de tratamento que significativamente alterou o curso de uma neoplasia (KOWALSKI, 2002). A remoção cirúrgica de tumores pode ser eficaz e bem-sucedida, se não houver metástase; no caso de leucemias, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos de terapia, como o transplante de medula óssea. A radioterapia é uma modalidade de tratamento eficaz e comumente usada na terapia do câncer. Esta é uma técnica onde se utiliza a radiação ionizante para tratar a doença, e, ainda é usualmente utilizada associada à cirurgia, como incremento da eficiência do tratamento. Mesmo sozinha, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, a recorrência e a chance de metástase, sendo uma abordagem antineoplásica muito usada; entretanto, mesmo que sejam usados os sensibilizadores (que diminuem os efeitos colaterais), o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (RUSTHOVEN *et al.*, 2008; SOREIDE *et al.*, 2008; KUMMAR *et al.*, 2015; EVANS e STAFFURTH, 2018).

A quimioterapia é um tipo de tratamento sistêmico que utiliza fármacos citotóxicos. Os fármacos quimioterápicos causam a morte celular por apoptose, seja interferindo diretamente no DNA, ou tendo como alvo as principais proteínas necessárias para a divisão celular. Porém, esses fármacos, em sua maioria, não são seletivos apenas para as células neoplásicas, eles também podem ser citotóxicos para

células em divisão normal, particularmente aquelas com alta taxa de renovação, como a medula óssea e membranas mucosas (DICKENS e AHMED, 2018).

Outro problema importante associado a quimioterapia é a resistência adquirida aos medicamentos (BIEDLER e RIEM, 1970). Entre os mecanismos que evidenciam o desenvolvimento de resistência estão: aumento do potencial anti-apoptótico das células cancerosas; incremento do mecanismo de reparo do DNA; e interferências no transporte de medicamento (STOIKA *et al.*, 2003; THOMAS e COLEY 2003; MARIE *et al.*, 2004) pelas proteínas de transporte (proteínas ABC), estas são capazes de promover o efluxo do medicamento das células alvo (JULIANO e LING, 1976).

Algumas abordagens têm sido adotadas recentemente para o tratamento do câncer, são elas, a imunoterapia e hormonoterapia. As estratégias imunoterapêuticas incluem vacinas contra o câncer, vírus oncolíticos, transferência adotiva de células T ativadas e células NK *ex vivo*, e administração de anticorpos ou proteínas recombinantes que, ou estimulam as células ou bloqueiam os chamados checkpoints imunológicos (FARKONA *et al.*, 2016). A terapia hormonal envolve a administração de hormônios exógenos em cânceres dependente de hormônios, principalmente nos cânceres de mama e próstata, para manipular o sistema endócrino, interferindo na produção de hormônios ou na atividade de receptores. Além disso, certos hormônios, como os corticosteróides, têm efeitos antiproliferativos gerais devido à sua capacidade de regular negativamente os genes e induzir a apoptose. Como a quimioterapia e a terapia direcionada, a terapia hormonal pode ser usada para tratar malignidades em vários momentos, incluindo os períodos neoadjuvante, adjuvante e metastático (FAIRCHILD *et al.*, 2015). Outra técnica utilizada que vem sendo considerada um grande avanço é a terapia de fotorradiação. Esta terapia permite a localização e destruição das células cancerosas através da radiação específica de fluorescência com a utilização de fibra ótica (SALMONM, 1998; OLIVEIRA e ALVES, 2002).

2.4 AGENTES QUIMIOTERÁPICOS E PRODUTOS NATURAIS

A descoberta de medicamentos para o câncer está intimamente relacionada a pesquisas de produtos naturais, sendo que cerca de 60% dos medicamentos utilizados tem, em alguma instância, sua origem relacionada a uma fonte natural. A ampla biodiversidade brasileira por si só, justifica o grande potencial para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais, além de que, vários estudos

realizados vêm confirmar a atividade antitumoral destes (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Por milênios, as culturas indígenas em todo o mundo têm usado a fitoterapia tradicional para tratar uma miríade de doenças. As plantas constituem uma alternativa comum para o tratamento do câncer e mais de 3000 plantas em todo o mundo têm propriedades anticancerígenas (ALVES-SILVA *et al.*, 2017; TARIQ *et al.*, 2017).

Os produtos naturais possuem um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de doenças humanas (NEWMAN e CRAGG, 2012). Das 175 moléculas aprovadas ao longo do período de 1940 até o final de 2014, 49% destas são produtos naturais ou derivados diretamente dele (NEWMAN e CRAGG, 2016). O século XX apresentou um grande avanço na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e microorganismos, no campo da oncologia, permitindo a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. A maior parte (60%) dos fármacos anticâncer incorporados na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007; BUTLER e HARVEY, 2008).

Dentre os produtos naturais, encontram-se os metabolitos secundários, um grupo de substâncias que se destaca por demonstrar grande potencial farmacológico. Estas são divididas em diversas classes estruturais: terpenos, lignanas, taninos, esteróides, chalconas, flavonas, flavanonas, alcalóides e quinonas, dentre outros (CLARDY e WALSH, 2004).

No tratamento do câncer, as plantas possuem um amplo histórico de utilização. Os dados do *Food and Drug Administration* mostraram que 40% das moléculas aprovadas são compostos naturais ou inspirados por elas, das quais 74% são usadas na terapia antineoplásica. Grande parte dessas substâncias compõem-se, principalmente, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, a exemplo da vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e tenoposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®), atualmente utilizados na terapia anticâncer (SECA *et al.*, 2018). Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tipos de tumores ainda não dispõem de tratamento adequado (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). A **Tabela 1** resume as principais classes de agentes

anticâncer utilizados na clínica derivados de produtos naturais e o seu mecanismo de ação.

Tabela 1. Principais classes de agentes naturais anticancerígenos.

Classe de agentes anticancerígenos	Agentes	Mecanismo de ação
Taxanos	Paclitaxel Docetaxel	Estabiliza a polimerização da tubulina
Alcaloides da vinca	Vimblastina Vincristina Vinorelbina	Inibe a polimerização da tubulina
Camptotecinas	Irinotecano Topotecano	Inibe a topoisomerase I
Epipodofilotoxinas	Etoposídeo Tenoposídeo	Inibe a topoisomerase II
Antibióticos citotóxicos	Doxorrubicina Mitomicina Idarrubicina Bleomicina Dactinomicina	Radicais livres de oxigênio se ligam às fitas simples ou duplas do DNA causando a quebra da molécula; alguns agentes inibem a topoisomerase II e/ou intercalam no DNA

Fonte: DIAS *et al.*, 2015.

A vimblastina e a vincristina são alcaloides naturais encontrados nas partes aéreas da planta *Catharanthus roseus* var. *albus* G. Don. ou *Vinca rosea* L., (Apocynaceae) e são denominados alcaloides da vinca (GUERITTE-FAHY, 2005; CRAGG e NEWMAN, 2005; NEWMAN e CRAGG, 2007). O alvo destes medicamentos é o aparelho mitótico, em específico, os microtúbulos. O mecanismo de ação envolve o bloqueio da polimerização dos microtúbulos, que possuem função essencial na formação do citoesqueleto e do fuso mitótico. O fármaco liga-se especificamente à proteína microtubular, a tubulina, na forma dimérica. O complexo fármaco-tubulina liga-se a extremidade em formação dos microtúbulos, interrompendo a sua organização e seguinte despolimerização. O processo determina a parada da mitose na fase da metáfase, com dissolução do fuso mitótico e interferência na segregação dos cromossomos (KATZUNG, 2017; SECA *et al.*, 2018).

O paclitaxel é um taxano encontrado nas cascas da planta *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae) (KINGSTON, 2005; CRAGG e NEWMAN, 2005). Este atua como

estabilizador do fuso mitótico por sua ligação de alta afinidade com a tubulina, aumentando sua polimerização, resultando em inibição da mitose e divisão celular. O mecanismo de ação dos taxanos despertou interesse por ser diferente do que, até então, era conhecido. Os taxanos também afetam os microtúbulos, porém, ao contrário de outros fármacos antimitóticos conhecidos, como os alcaloides da vinca que induzem a disjunção dos microtúbulos, os taxanos promovem a polimerização da tubulina em microtúbulos das células. Os microtúbulos formados por indução dos taxanos são bastante estáveis e disfuncionais, havendo assim um deslocamento no equilíbrio dinâmico entre a formação dos microtúbulos e a sua dissociação em tubulina, o que compromete a mitose, bloqueando a divisão celular e comprometendo funções celulares vitais, o que provoca a morte da célula (KINGSTON, 1991; YANG e HORWITZ, 2017).

O etoposídeo e tenoposídeo são derivados semissintéticos da podofilotoxina, que é extraída da raiz do podófilo (*Podophyllum peltatum*). Estes se ligam à topoisomerase II e ao DNA, mantendo o complexo em seu estado clivável. O etoposídeo tem sido usado clinicamente para o tratamento de leucemias monocíticas, câncer testicular e no carcinoma de pequenas células do pulmão, enquanto o tenoposídeo possui atividade contra vários linfomas (HOLTHUIS, 1988; CRAGG e NEWMAN, 2005; ZHANG *et al.*, 2017).

Diante do êxito destes medicamentos de origem vegetal, é possível compreender o interesse entre algumas indústrias multinacionais pela procura de novas moléculas bioativas. Nos anos 90, essa busca foi intensificada, principalmente nas florestas tropicais, por ser o local onde se concentra grande parte da biodiversidade. Além disso, inúmeros análogos foram sintetizados em laboratórios por diferentes grupos de pesquisa, com o objetivo de se identificar os grupos farmacofóricos, estabelecendo, assim, a relação estrutura-atividade na tentativa de se obter fármacos mais potentes (KINGSTON, 2000).

2.5 O GÊNERO *SALACIA*

O gênero *Salacia* é pertencente à família Celastraceae. Esta família possui distribuição predominantemente tropical e subtropical, incluindo cerca de 50 gêneros e 1000 espécies (SOUZA *et al.*, 2008). O gênero compreende cerca de 200 espécies, distribuídas pela América, Ásia e Europa (UDAYAN *et al.*, 2012). Constituem-se de

arbustos com flores pequenas e frutos comestíveis com polpa mucilaginosa (PAARAKH *et al.*, 2008). Diversos estudos relataram que várias espécies da família Celastraceae apresentam constituintes farmacológicos importantes, tais como: triterpenos de quinona-metano, que possuem propriedades antibióticas, citotóxicas, antitumorais, antimaláricas e antioxidantes (SANTANA *et al.*, 1971; LIMA *et al.*, 1972; FIGUEIREDO *et al.*, 1998; ALVARENGA *et al.*, 1999; JELLER *et al.*, 2004); sesquiterpenos, que mostram atividade inseticida (DAGANG *et al.*, 1992); flavonóides, que possuem propriedades antioxidantes (CORSINO *et al.*, 2003); e alcaloides, que apresentam atividades antitumorais e inseticidas (CORSINO *et al.*, 1998; JINBO *et al.*, 2002). Os triterpenos quinonametídeos são constituintes naturais cuja ocorrência é restrita à família Celastraceae (CARVALHO *et al.*, 2005). E, estes já são amplamente estudados na literatura, por demonstrarem múltiplas bioatividades contra diferentes linhagens celulares de câncer e, revelando efeitos antitumorais encorajadores (CHÁIREZ-RAMÍREZ *et al.*, 2016; GILL e KUMMAR, 2016). Alguns compostos desta classe já foram isolados de algumas plantas do gênero *Salacia*, tais como a maitenina e a pristimerina, que demonstraram apresentar não apenas atividades citotóxicas e antimicrobianas significativas, mas também uma potente atividade antitumoral (SANTANA *et al.*, 1971; LIMA *et al.*, 1969, 1972).

Salacia ssp são plantas relevantes no domínio da planta medicinal com benefícios variados para diversas doenças. Estas, contém uma gama abundante de fitoquímicos (metabólitos secundários) como salacicol, katnanol, mangiferina, polifenólicos, taninos e muitos outros. Diversas propriedades biológicas são descritas para estas plantas, dentre elas, atividade antimicrobiana, antifúngica, antimalárica, anticâncer, antiobesidade e antidiabética. As plantas deste gênero são conhecidas por oferecer alta potência biológica devido à biodisponibilidade e segurança. Essas propriedades são úteis na formulação de medicamentos e também oferecem benefícios nutricionais significativos (PAARAKH *et al.*, 2008; RAMAKRISHNA *et al.*, 2016). Os compostos pristimerina, isoiguesterinol, 28-nor-isoiguesterina-17-carbaldeído, 17-(metoxicarbonil)-28-nor-isoiguesterina e 28-hidroxi-iguesterina, isolados da espécie *S. kraussi* por fracionamento guiado por bioensaios, mostraram citotoxicidade potente contra células HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e apresentaram atividade antimalárica (FIGUEREIDO *et al.*, 1998). *Salacia oblonga* também demonstrou ser fonte de agente citotóxicos, onde, extratos metanólicos

extraídos da raiz e parte áreas da planta apresentou atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231) (MUSINI *et al.*, 2015).

A espécie *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith está distribuída pela América Central e América do Sul e pode ser encontrada em cinco estados: Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Mato Grosso (LOMBARDI, 2010). No Brasil, a *S. impressifolia* é popularmente conhecida como “miraruíra” ou “cipó-miraruíra”, e seus galhos são utilizados para tratar inflamações e diabetes (ALMEIDA, 1993; LORENZI e MATOS, 2002). A planta se apresenta em forma de cipó escandescendente, com flores amareladas, botões esverdeados e fruto comestível rugoso (**Figura 4**).

No grupo étnico amazônico Tacana, da Bolívia, *S. impressifolia* é conhecida como “panu”, e sua casca é preparada por decocção, para tratar a dor no corpo, ou macerada em álcool, para ser usada como um remédio restaurador geral ou para tratar a impotência masculina e dor reumática. Além disso, um xarope é preparado para tratar gripe e dor nos rins (BOURDY *et al.*, 2000). Na Amazônia peruana, a *S. impressifolia* também é conhecida como panu e é utilizada para o tratamento de algumas enfermidades, entre elas, dengue, afecções renais, reumatismo e o tratamento de tumores (BRAKO e ZARUCCHI, 1993; CLAVO *et al.*, 2003)

Embora vários usos medicinais tenham sido descritos para *S. impressifolia*, poucos trabalhos científicos são encontrados para esta espécie. O extrato de infusão do caule de *S. impressifolia* mostrou efeito antioxidante (SANTO *et al.*, 2013; MANOEL e MOYA, 2015), e um total de 15 compostos foram isolados do tronco e dos galhos de *S. impressifolia*, incluindo triterpenos quinonametídeos, que são empregados como constituintes característicos comuns da família Celastraceae. A pristimerina e a tingenona foram identificados como os principais compostos. E, também foram isolados os triterpenóides friedelano, lupano, oleanano e ursano (SILVA *et al.*, 2016). Além disso, a partir das raízes de *S. impressifolia* foram isoladas friedelina, β -sitosterol, ácido quinóvico, ácido cincólico, ácido cincólico-3 β -O-6-desoxi- β -D-glucopiranosídeo, ácido-glucopiranosídeo quinovic-3 β -O- β -D e celastrato (PAZ *et al.*, 2018).



Figura 4. *Salacia impressifolia*. Fonte: Adaptado de http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/hippocrateaceae/salacia_impressifolia/salacia_impressifolia.html).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial antineoplásico do extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) e dos triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina obtidos da casca do caule de *S. impressifolia* em diferentes modelos celulares.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de extratos, frações e triterpenos isolados de *S. impressifolia* frente a diferentes linhagens de células cancerosas e células não cancerosas;
- Avaliar o efeito dos triterpenos sobre a externalização de fosfatidilserina em células HL-60;
- Investigar o efeito dos triterpenos sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em células HL-60;
- Avaliar a capacidade dos triterpenos em induzir estresse oxidativo em células HL-60;
- Investigar o efeito dos triterpenos sobre o ciclo celular em células HL-60;
- Avaliar o efeito do extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) *in vivo* em modelo xenográfico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

No presente estudo, os galhos e ramos de *S. impressifolia* foi coletado na Reserva Adolpho Ducke (km 26 da rodovia AM-010, município de Manaus, estado do Amazonas, Brasil) a partir de um espécime previamente catalogado durante o projeto Flora (RIBEIRO *et al.*, 1999). Um exemplar de comprovante (nº 4699) foi depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil e posteriormente cadastrada no SisGen (nº A23BEFD). O isolamento destes compostos foi realizado previamente pelo prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen da Universidade do Estado do Amazonas.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS

O material vegetal em pó e seco ao ar de *S. impressifolia* (900 g) foi sequencialmente macerado à temperatura ambiente (cerca de 26 °C) com 2 L de *n*-hexano, acetato de etila e metanol (3x para cada solvente). Os extratos resultantes foram evaporados a pressão reduzida até à secura, resultando em três extratos: o extrato de *n*-hexano (EH, 12,5 g, 1,38%), extrato de acetato de etila (EAE, 87,8 g, 9,75%), e o extrato de metanol (EM, 102,2 g, 11,3%). Uma parte de EAE (15 g) foi fracionada sobre cromatografia em coluna de gel de sílica (CC) com concentrações crescentes de diclorometano-acetato de etila (100:0, 50:50 e 0:100) e acetato de etila-metanol (100:0, 50:50 e 0:100) proporcionando seis frações FEAE.1-6. O EM teve uma porção (10 g) também submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (CC) com sistemas de gradiente de acetato de etila-acetona (100:0, 50:50 e 0:100), acetona-metanol (100:0, 50:50, e 0:100) proporcionando seis frações FEM.1-6. Uma parte da fração ativa FEAE.3 (250 mg, 10 injeções de 25 mg) foi submetida a uma purificação por HPLC semi-preparativa com um sistema Shimadzu UFLC (Kyoto, Japão) com uma eluição isocrática consistindo de acetonitrila / água 85:15. (v: v) sobre uma coluna de fase reversa Shimadzu Shim-pack C18 (10 mm × 250 mm, 5 µm) a uma taxa de fluxo de 8,0 mL/min e detecção UV a 420 nm. Este procedimento resultou no isolamento de 22-hidroxitingenona (1, tR 9,79 min, 6,40 mg), tingenona (2, tR 10,02

min, 11,0 mg) e pristimerina (3, 10,45 min, 53,5 mg) (**Figura 5**). As estruturas químicas da 22-hidroxitingenona, tingenona e pristimerina estão representadas na **Figura 6**. (SILVA *et al.*, 2016).

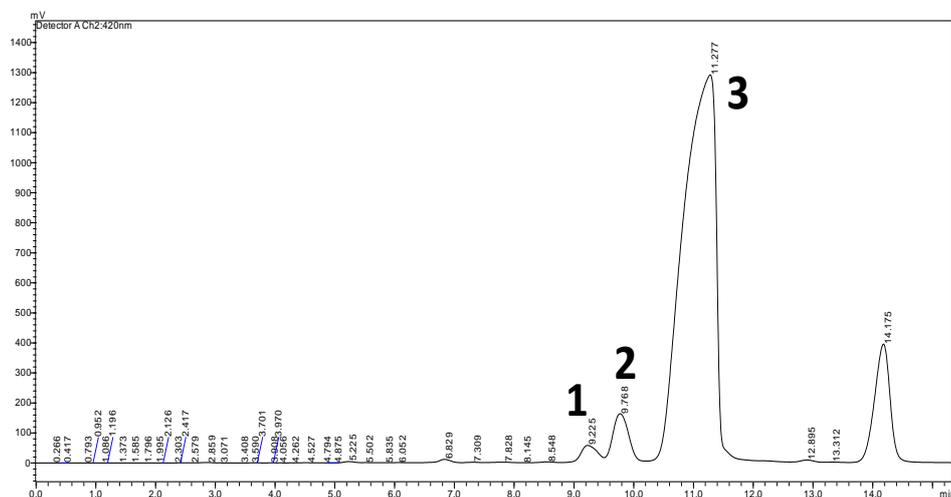


Figura 5. Cromatograma semi-preparativo de fase inversa da fração FEAE.3 a 420 nm. 22-hidroxitingenona (1), tingenona (2) e pristimerina (3).

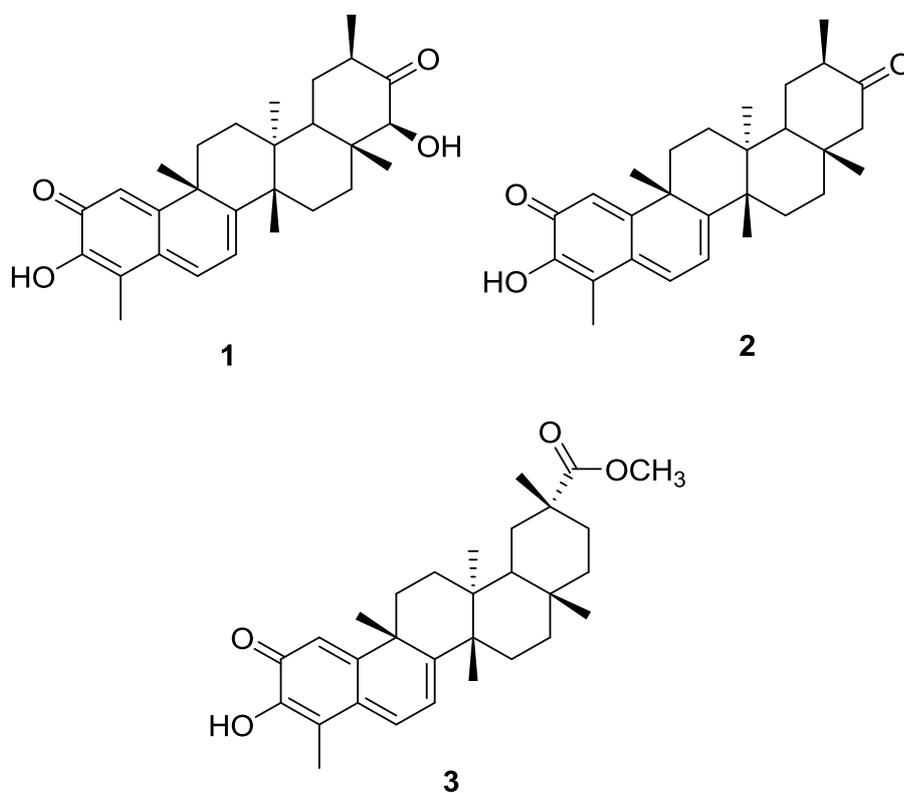


Figura 6. Estrutura química dos triterpenos quinonametídeos isolados de *S. impressifolia*. 22-hidroxitingenona (1), tingenona (2) e pristimerina (3).

4.3 ENSAIOS *IN VITRO*

4.3.1 Células

Para os ensaios de citotoxicidade, as linhagens de células cancerosas foram obtidas da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade.

Células	Tipo Histológico
Células cancerosas	
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano
HCT 116	Carcinoma de cólon humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosas humano
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano
HL-60	Leucemia promielocítica humana
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana
B16-F10	Melanoma murino
Células não cancerosas	
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

Linhagens celulares cancerosas e não cancerosas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC). O Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, BA, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº 031019/2013), para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Os tipos celulares utilizados neste trabalho foram mantidos em garrafas de polipropileno contendo meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA), e acondicionadas em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse

alcançado, ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens aderentes, foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) para destacar as células das garrafas de cultura. Todos os experimentos foram conduzidos com células em fase exponencial de crescimento. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), a fim de evitar o uso de células contaminadas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por protocolo padrão utilizando o Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). Após a separação, as PBMC foram lavadas duas vezes com solução salina e ressuspensas ($0,3 \times 10^6$ células/mL) em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 2 mM de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina. Para induzir a divisão celular de linfócitos T, a concanavalina-A (ConA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente mitógeno.

4.3.2 Avaliação da atividade citotóxica (ensaio do alamar blue)

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos e determinar o valor de CI_{50} (concentração que inibe 50% das células), foi utilizado o ensaio do alamar blue, realizado após 72 horas de exposição com os compostos teste. O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação, ou seja, sua redução irá refletir a proliferação celular. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A doxorubicina (Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) foi utilizada como controle positivo e os poços não-tratados receberam apenas o veículo utilizado para solubilizar as substâncias testadas (0,5% de DMSO, Sigma Chemical, Co). Inicialmente, células de linhagens aderentes foram adicionadas a placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL em 100 µL/ poço) e incubadas por 24 h para aderência. O plaqueamento de células não aderentes (HL-60 e K-562) foi realizado após este período ($0,3 \times 10^6$ células/mL em 100 µL/ poço). Todas as culturas foram tratadas por um período de 72 h com o extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3), o extrato metanólico (EM) e sua fração (FEM.1), 22-hidroxitingenona, tingenona e pristimerina (0,19 – 25 µg/mL) dissolvidos em

DMSO. Antes do final do período de incubação (4 h para linhagens celulares e 24 h para o PBMC), 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar blue foram adicionados a cada poço. As absorvâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190 (AHMED *et al.*, 1994).

Para os ensaios de padrão de morte celular/mecanismo de ação, células da linhagem HL-60 ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram adicionadas a placas de 24 poços. Logo após a adição, as células foram tratadas por 24 e 48 horas com tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina nas concentrações de 0,6 e 1,2, 1,2 e 2,4 e 2,5 e 5 µM, respectivamente (concentrações estabelecidas previamente com base no valor de Cl_{50}). As células foram mantidas em estufa a 37° C e a 5% de CO₂. A doxorubicina (1,0 µM) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo recebeu apenas o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir a substância testada.

4.3.3 Avaliação da viabilidade celular

Este método permite avaliar a viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana plasmática. A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que apenas na necrose ela apresenta-se precocemente alterada (MACKLIS e MADISON, 1990). Para avaliar a viabilidade celular, após o tratamento nos tempos de 24 e 48 horas e, uma alíquota de 90 µL foi acrescida a 10 µL do corante azul de tripam. Células não viáveis, por apresentarem danos na membrana, coram-se em azul. A contagem foi realizada levando em consideração a exclusão do corante por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico (Olympus CX41).

4.3.4 Ensaio de marcação com Anexina-V/IP

A avaliação do perfil de morte celular (apoptose/ necrose) foi realizada através de citometria de fluxo. Células HL-60 foram tratadas com os compostos por 24 e 48h. Após o tratamento, as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP), de acordo com o protocolo do fabricante (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). O ensaio possui como princípio a ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina. A fosfatidilserina é um fosfolípídeo presente na membrana de todas

células eucarióticas e que são externalizadas quando está se iniciando o processo apoptótico, desta forma é possível identificar a externalização do fosfolípido pela ligação com anexina V-FITC. O iodeto de propídio é um corante hidrofóbico que se liga ao DNA das células que não apresentam integridade de membrana, ou seja, células que estão em processo tardio da apoptose e/ou células necróticas.

Portanto, as células HL-60 foram marcadas com anexina V-FITC e IP para determinar a porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial/tardia e células necróticas. As células foram retiradas dos poços, lavadas duas vezes com solução salina e em seguida, ressuspensas numa solução de 100 μ L do tampão de ligação, 5 μ L de IP e 5 μ L de anexina V-FITC. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, na ausência de luminosidade, 400 μ L de tampão de ligação foram adicionados a cada amostra. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de anexina quantificada utilizando o programa FlowJo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.3.5 *Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA*

O ciclo celular é constituído por quatro fases: G₁, S, G₂ e M. Durante o período de crescimento celular (fase G₁) uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2C (C – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) de DNA nuclear, portanto possui duas cópias de cada gene. Na fase S, que é a fase de síntese, ocorre a duplicação do genoma nuclear (2-4C) e na fase seguinte (fase G₂) ocorre o segundo período de crescimento celular, onde o conteúdo em DNA nuclear é mantido em 4C. Na mitose ou fase M (4C), a célula se divide, formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C em DNA. As células que não se encontram em divisão celular (G₀) apresentam um conteúdo 2C de DNA. A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, irá refletir as fases do ciclo celular, e desta forma foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o IP (iodeto de propídio) como agente fluorogênico. Decorridos os períodos de tratamento com os compostos, as células foram recolhidas e centrifugadas (1500rpm/5 minutos) juntamente com o sobrenadante. As células foram

diluídas com a solução de permeabilização (200 µL) contendo 0,1 % de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio, 2 µg/mL iodeto de propídio e 100 µg/mL RNase em água destilada, na ausência de luz e a 37°C. Após 15 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As proporções de DNA fragmentado e as fases do ciclo celular foram obtidas utilizando o software Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.3.6 Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio

Neste experimento, foi utilizado o reagente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), que é um indicador de ERO intracelular (reativo ao H₂O₂). Este atravessa a membrana citoplasmática, posteriormente esterases intracelulares clivam os grupos acetato que são convertidos num produto verde fluorescente na presença de ERO. As células HL-60 foram tratadas com os compostos por 1 h e 3 h. Em seguida, as células foram recolhidas, lavadas e incubadas em 1 mL de solução salina e 5 µM de H₂-DCF-DA. Após 30 minutos de incubação a 37°C, na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas (1500rpm/5 minutos), ressuspendidas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.3.7 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Para a determinação do potencial transmembrânico mitocondrial, foi utilizado o método de incorporação de rodamina 123 (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) pelas células, esse corante é sequestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Desta forma, após o tratamento (24h) com os compostos, as células foram diluídas numa solução de rodamina 123 1µg/mL em salina, Sigma-Aldrich Co.) e incubadas a 37°C na ausência de luz por 15 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e o precipitado foi ressuspendido em salina e então analisado por citometria de fluxo.

Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas.

4.4 ENSAIO *IN VIVO*

4.4.1 *Animais*

Um total de 63 camundongos, fêmeas, portadores de imunodeficiência combinada severa (SCID) da linhagem CB-17 (20-30g) foram obtidos e mantidos nas instalações de animais do Instituto Gonçalo Moniz-FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brasil). Os animais foram alojados em gaiolas com acesso livre a alimentos e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo de claro/ escuro de 12:12 h (luzes acesas às 6:00 da manhã). O Comitê local de ética animal aprovou o protocolo experimental de número 006/2015. A **Tabela 3** demonstra o delineamento do experimento *in vivo*.

4.4.2 *Modelo xenográfico*

Tabela 3. Delineamento do experimento *in vivo* em camundongos CB-17 SCID.

GRUPOS	TRATAMENTO	Dose (mg/kg)	Nº DE ANIMAIS
G1	DMSO	5%	22
G2	DOX	0,8	10
G3	5-FU	15	11
G4	EAE	20	12
G5	FEAE.3	20	10

Para este ensaio, as células tumorais HL-60 foram utilizadas em uma densidade de $1,5 \times 10^7$ células por 500 μ L e implantadas subcutaneamente na axila esquerda dos camundongos CB17 SCID. Os compostos foram dissolvidos em 5% de DMSO. Os tratamentos foram iniciados quando os tumores alcançaram 100 a 200 mm³. As doses utilizadas foram selecionadas com base em trabalhos anteriores utilizando extratos de plantas no modelo tumoral *in vivo* (MOUSINHO *et al.*, 2011; DÓRIA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016). Os animais foram tratados pela via intraperitoneal (200 μ L por animal) uma vez por dia durante 15 dias consecutivos. No 16º dia, os animais foram anestesiados, as amostras de sangue periférico foram coletadas da artéria braquial para análise hematológica, e, após eutanásia por

overdose anestésica, os órgãos e tumores foram excisados para análises posteriores. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula abaixo, onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle e B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

4.4.3 Avaliação toxicológica

Para avaliar os efeitos toxicológicos, os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. Ao longo do período experimental, foram realizadas avaliações diárias comportamentais a fim de qualificar possíveis efeitos tóxicos relacionados ao tratamento. Os parâmetros (motricidade, tremores, tônus musculares, deambulação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, irritabilidade e morte) foram observados durante os 15 dias de tratamento. A análise hematológica foi realizada utilizando o equipamento Advia 360 Hematology System (Bayer, Leverkusen, Alemanha). O fígado, rins, pulmões e coração foram removidos, pesados e examinados quanto a sinais de lesões graves, alterações de cor e/ou hemorragia. Após exame macroscópico, os tumores, fígados, rins, pulmões e corações foram fixados em formaldeído a 4% e embebidos em parafina. Os cortes teciduais foram corados com hematoxilina-eosina e ácido periódico-Schiff (fígado e rim), e as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica por um patologista experiente.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $ALW - (AHW \times R0) \times 100$. Onde, ALW e AHW são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R0 = AOLW/AOHW$. Onde, AOLW e AOHW são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M. ou CI_{50} e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%) obtidos por regressão não linear. O teste Kolmogorov – Smirnov, foi o utilizado como teste de normalidade da distribuição. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5.01 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 OS COMPOSTOS OBTIDOS DE *S. IMPRESSIFOLIA* SÃO CITOTÓXICOS FRENTE À DIFERENTES CÉLULAS CANCEROSAS

Em nosso programa de triagem de descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com potencial anticâncer, nós adotamos o critério estabelecido pelo *American National Cancer Institute* (NCI) onde, compostos puros com valores CI_{50} de $< 4 \mu\text{g/mL}$ e extratos com valores $< 30 \mu\text{g/mL}$ são considerados promissores (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991).

A atividade citotóxica *in vitro* dos extratos EAE e EM e suas respectivas frações FEAE.3 e FEM. 1 e os triterpenos quinonametídeos (22-hidroxtingenona, tingenona e pristimerina) da casca do caule de *S. impressifolia* foi determinada em células cancerígenas cultivadas (MCF-7, HCT116, HepG2, SCC-4, HSC-3, HL-60, K-562 e B16-F10) após 72 h de incubação utilizando o ensaio de alamar blue. A **figura 7** apresenta as curvas de sobrevivência celular obtidas. O extrato EAE e sua fração FEAE.3, bem como os triterpenos quinonametídeos 22-hidroxtingenona e tingenona apresentaram a citotoxicidade mais potente.

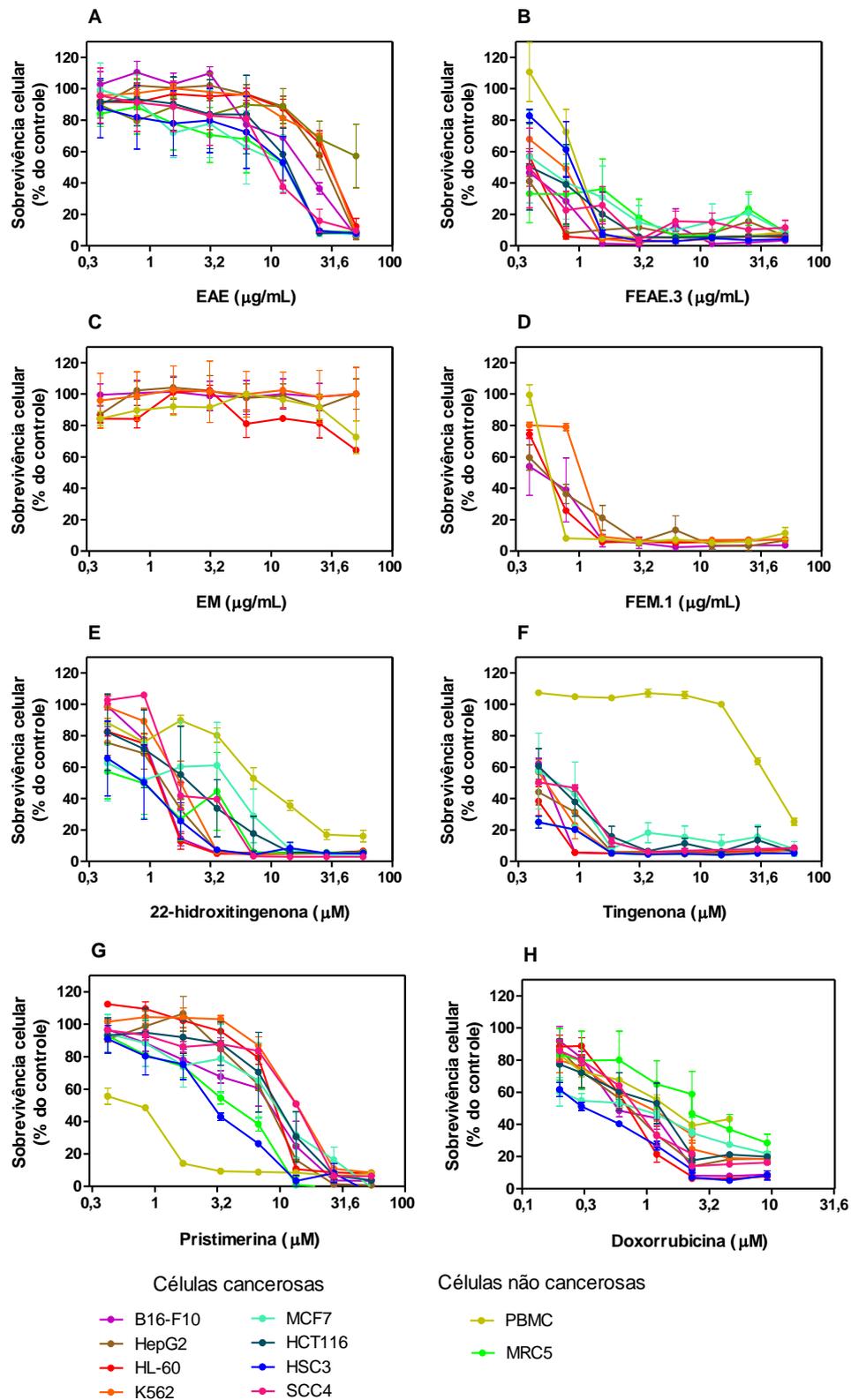


Figura 7. Curvas de sobrevivência celular obtidas de três experimentos independentes realizadas em duplicata, avaliadas pelo ensaio de alamar blue após 72 h de incubação. Células cancerosas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); HCT116 (carcinoma do cólon humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); SCC-4 (carcinoma de células escamosas oral humano); HSC-3 (carcinoma de células escamosas oral humano); HL-60 (leucemia promielocítica humana); K-562 (leucemia mielogênica humana); e B16-F10 (melanoma murino). Células não cancerosas: MRC-5 (fibroblastos de

pulmão humano); e PBMC (células mononucleares do sangue periférico humano). EAE: extrato de acetato de etila. EM: extrato metanólico. FEAE.3: Fração do extrato de acetato de etila. FME.1: Fração do extrato metanólico.

Os valores de CI_{50} da atividade citotóxica dos extratos EAE e EM e suas respectivas frações FEAE.3 e FEM.1 são apresentados na **Tabela 4**. O extrato EAE apresentou o menor valor de CI_{50} na célula cancerígena MCF-7 (8,4 $\mu\text{g/mL}$) e o maior valor de CI_{50} na célula cancerosa K-562 (29,5 $\mu\text{g/mL}$), enquanto o extrato EM apresentou $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ para todas as linhagens celulares testadas. A fração FEAE.3 apresentou o menor valor de CI_{50} na célula cancerígena HepG2 (0,1 $\mu\text{g/mL}$) e o maior valor de CI_{50} na célula cancerígena HSC-3 (0,8 $\mu\text{g/mL}$), e a fração FEM.1 apresentou o menor valor de CI_{50} na célula cancerígena HepG2 / B16-F10 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e o valor mais alto de CI_{50} na célula cancerosa K-562 (1,0 $\mu\text{g/mL}$).

Os valores de CI_{50} da atividade citotóxica dos triterpenos quinonametídeos 22-hidroxtingenona, tingenona e pristimerina também foram obtidos e são mostrados na **Tabela 5**. A 22-hidroxtingenona apresentou o menor valor de CI_{50} na célula cancerígena HSC-3 (0,8 μM) e o valor mais alto de CI_{50} na célula cancerígena SCC-4 (2,0 μM), a tingenona apresentou o menor valor de CI_{50} na célula cancerígena HSC-3 (0,1 μM) e o valor mais alto de CI_{50} na célula cancerígena HCT116 / SCC-4 (0,6 μM) e a pristimerina apresentou o menor valor de CI_{50} na célula cancerígena HSC-3 (2,9 μM) e o maior valor de CI_{50} na célula cancerígena K-562 (13,6 μM). A doxorubicina foi utilizada como controlo positivo e apresentou o menor valor de CI_{50} na célula cancerígena HSC-3 (0,3 μM) e o valor mais elevado de CI_{50} na célula cancerígena K-562 (1,0 μM).

O efeito citotóxico dos extratos EAE e EM, e suas respectivas frações FEAE.3 e FEM.1, e triterpenos quinonametídeos também foi avaliado em células não cancerígenas (MRC-5 e PBMC), e também foram citotóxicos estas linhagens, indicando baixa seletividade para células cancerígenas. A doxorubicina, que é um fármaco quimioterápico usado na clínica, também apresentou citotoxicidade para células não cancerosas.

A linhagem celular de leucemia humana HL-60 é um modelo celular frequentemente usado para estudar a atividade antileucêmica de novos compostos (MAGALHÃES *et al.*, 2013; YUN *et al.*, 2017; CALGAROTTO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Além disso, esta linhagem celular é sensível ao extrato EAE e à sua fração FEAE.3, bem como para os triterpenos quinonametídeos 22-hidroxtingenona, tingenona e pristimerina. Portanto, a linhagem celular foi utilizada para avaliação do

mecanismo de ação dos triterpenos e o extrato EAE e sua fração FEAE.3 para o estudo *in vivo*.

Tabela 4. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) da atividade citotóxica dos extratos e frações da casca do caule de *Salacia impressifolia*.

Células	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	EAE	EM	FEAE.3	FEM.1
Células cancerosas				
MCF-7	8,4 4,6 – 15,5	N.d.	0,4 0,1 – 2,0	N.d.
HCT116	12,7 8,3 – 19,5	N.d.	0,4 0,2 – 1,0	N.d.
HepG2	26,6 23,1 – 30,6	>50	0,1 0,1 – 0,5	0,5 0,4 – 0,7
SCC-4	10,4 6,7 – 16,1	N.d.	0,2 0,1 – 1,2	N.d.
HSC-3	9,8 5,4 – 17,8	N.d.	0,8 0,7 – 1,0	N.d.
HL-60	29,1 25,4 – 33,4	>50	0,4 0,4 – 0,5	0,6 0,5 – 0,6
K-562	29,5 26,0 – 33,4	>50	0,6 0,6 – 0,8	1,0 0,9 – 1,2
B16-F10	17,7 14,4 – 21,7	>50	0,4 0,3 – 0,6	0,5 0,3 – 0,7
Células não cancerosas				
MRC-5	8,4 4,6 – 15,2	N.d.	0,1 0,1 – 0,3	N.d.
PBMC	>50	>50	0,9 0,8 – 1,1	0,6 0,4 – 1,0

Dados são apresentados como valores de CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$ e seus respectivos intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicatas pelo método de Alamar blue, após 72 h de tratamento. N.d: não determinado.

Tabela 5. Valores de CI_{50} (μM) da atividade citotóxica dos triterpenos quinonametídeos da casca do caule de *Salacia impressifolia*.

Células	CI_{50} (μM)			
	22-hidroxitingenona	Tingenona	Pristimerina	Doxorrubicina
Células cancerosas				
MCF-7	1,9 0,7 – 5,3	0,5 0,2 – 1,4	7,9 4,7 – 13,4	1,8 1,4 – 2,2
HCT116	2,0 1,0 – 3,8	0,6 0,5 – 0,9	9,4 6,6 – 13,3	1,6 1,5 – 1,9
HepG2	1,2 1,0 – 1,4	0,4 0,3 – 0,6	7,8 6,8 – 8,9	0,8 0,6 – 1,1
SCC-4	2,2 1,7 – 2,8	0,6 0,4 – 0,8	12,7 10,9 – 14,8	20,1 9,9 – 40
HSC-3	0,8 0,5 – 1,3	0,1 0,1 – 0,3	2,9 2,3 – 3,7	2,6 2,1 – 3,4
HL-60	1,1 1,1 – 1,3	0,4 0,3 – 0,5	8,8 7,8 – 10,1	0,1 0,09 – 0,6
K-562	1,8 1,5 – 2,0	0,5 0,5 – 0,6	13,6 12,3 – 15,0	0,6 0,3 – 1,0
B16-F10	1,2 1,1 – 1,3	0,5 0,5 – 0,5	6,3 4,7 – 8,4	0,01 0,01 – 0,05
Células não cancerosas				
MRC-5	0,8 0,3 – 1,9	0,1 0,1 – 0,2	3,5 2,9 – 4,2	1,8 1,5 – 2,2
PBMC	8,6 6,5 – 11,2	38,5 34,1 – 43,6	0,6 0,4 – 0,7	1,2 0,9 – 1,7

Dados são apresentados como valores de CI_{50} em μM e seus respectivos intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicatas pelo método de Alamar blue, após 72 h de tratamento.

O índice de seletividade (IS) indica o quanto um composto é ativo sem causar danos às células saudáveis, e é considerado significativo quando apresenta valores $\geq 2,0$ (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991). Este, foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $IS = CI_{50}$ [célula não cancerosa] / CI_{50} [célula cancerosa] (**Tabela 6 e 7**).

Tabela 6. Índice de seletividade dos compostos obtidos de *Salacia impressifolia* para a linhagem MRC-5.

MRC-5								
Células cancerosas	DOX	EAE	ME	FEAE.3	FEM.1	22-hidroxitingena	Tingenona	Pristimerina
	MCF-7	1,1	1	N.d	0,2	N.d	0,4	0,2
HCT116	1,0	0,7	N.d	0,2	N.d	0,4	0,2	0,4
HepG2	2,2	0,3	N.d	1	N.d	0,7	0,2	0,3
SCC-4	0,08	0,8	N.d	0,5	N.d	0,4	0,2	0,3
HSC-3	0,7	0,9	N.d	0,1	N.d	1	1	1,2
HL-60	18,0	0,3	N.d	0,2	N.d	0,7	0,2	0,4
K-562	3,0	0,3	N.d	0,2	N.d	0,4	0,2	0,2
B16-F10	180	0,5	N.d	0,2	N.d	0,7	0,2	0,5

Células cancerosas: HCT116 (carcinoma do cólon humano); MCF7 (adenocarcinoma de mama humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); HSC-3 (carcinoma epidermóide oral humano); SCC-4 (carcinoma epidermóide oral humano); HL-60 (leucemia promielocítica humana); K-562 (leucemia mielóide crônica humana); e B16-F10 (melanoma murino). Células não cancerosas: MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 7. Índice de seletividade dos compostos obtidos de *Salacia impressifolia* para PBMC.

PBMC								
Células cancerosas	DOX	EAE	ME	FEAE.3	FEM.1	22-hidroxitingena	Tingenona	Pristimerina
	MCF-7	0,2	>6	N.d.	2,2	N.d.	4,5	77
HCT116	0,6	>4	N.d.	2,2	N.d.	4,3	64	0,06
HepG2	1,5	>1,8	>1	9	1,2	7,1	96	0,08
SCC-4	0,05	>4,8	N.d.	4,5	N.d.	3,9	64	0,05
HSC-3	0,2	>5	N.d.	1,1	N.d.	10,7	385	0,2
HL-60	12,0	>1,8	>1	2,2	1	7,8	96	0,06
K-562	2,0	>1,7	>1	1,5	0,6	4,7	77	0,04
B16-F10	120	>2,8	>1	2,2	1,2	7,2	77	0,09

Células cancerosas: HCT116 (carcinoma do cólon humano); MCF7 (adenocarcinoma de mama humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); HSC-3 (carcinoma epidermóide oral humano); SCC-4 (carcinoma epidermóide oral humano); HL-60 (leucemia promielocítica humana); K-562 (leucemia mielóide crônica humana); e B16-F10 (melanoma murino). Células não cancerosas: MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Em relação a linhagem de fibroblasto de pulmão humano MRC-5, os compostos testados apresentaram IS semelhantes ao do controle positivo utilizado. Já para o PBMC, os compostos testados foram seletivos para a maioria das linhagens testadas, exceto pela pristimerina, que demonstrou ser menos seletivo e, a tingenona demonstrou ser o mais seletivo de todos os outros compostos testados ($P < 0,05$).

Uma vez que as células da linhagem HL-60 estava entre as células mais sensíveis à atividade citotóxica dos compostos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina, estudos adicionais *in vitro* visando avaliar o efeito destes compostos sobre a proliferação celular e na indução de morte celular apoptótica foram realizados nesta linhagem. As concentrações de tingenona, 22-hidroxitingenonana e pristimerina testadas foram de 0,6 e 1,2, 1,2 e 2,4 e 2,5 e 5,0 μM , respectivamente, definidas de acordo com os valores de CI_{50} para estes compostos nessa linhagem. Foram avaliados a viabilidade celular, o conteúdo de DNA nuclear na célula, que reflete as fases do ciclo celular, o padrão de morte celular, a indução da produção de ERO e o potencial transmembrânico mitocondrial.

A viabilidade celular após o tratamento de células HL-60 com os triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina foi confirmada pelo ensaio de exclusão com o corante azul de tripam após 24 e 48 horas de incubação. Pode-se observar que todos os três compostos induziram uma diminuição no número de células viáveis, quando comparado com o controle negativo. O tratamento levou a uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular para todas as concentrações testadas e em ambos os tempos avaliados. O mesmo resultado pôde ser observado nas células tratadas com o controle positivo, doxorubicina (**Figura 8**).

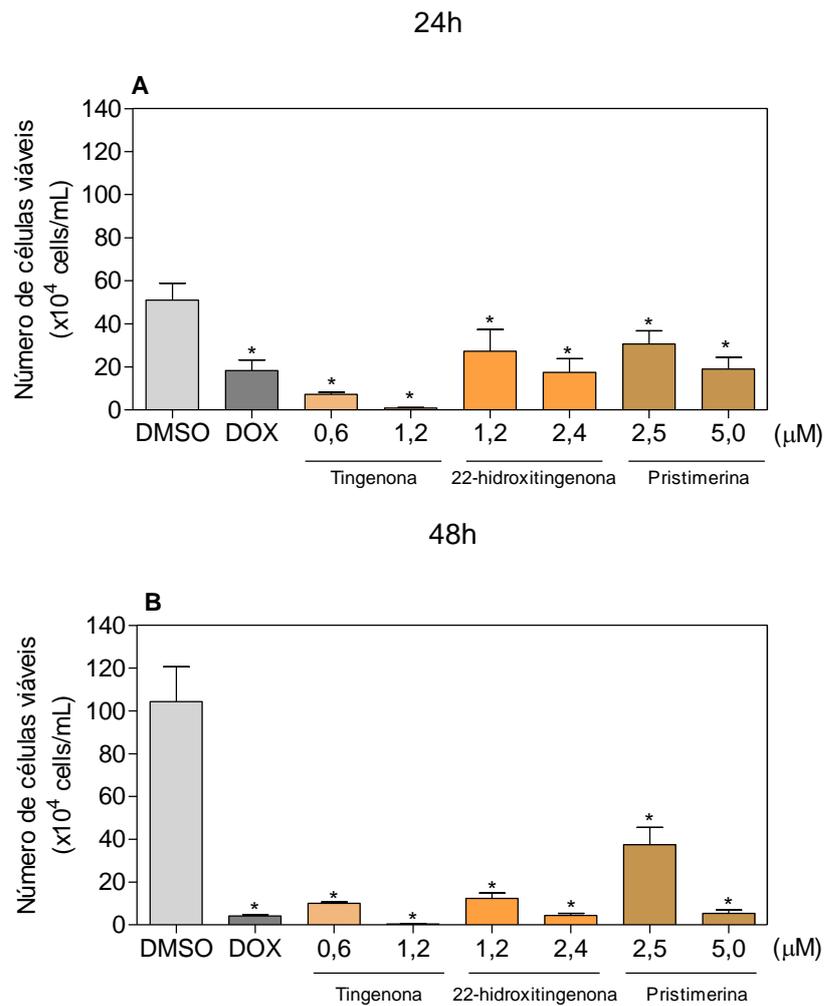


Figura 8. Efeito dos triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* sobre a viabilidade de células HL-60 determinadas por exclusão com o corante azul de tripam, após 24 e 48 h de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) utilizado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorrubicina (DOX 1 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

5.2 OS TRITERPENOS ISOLADOS DE *SALACIA IMPRESSIFOLIA* DESENCADAM APOPTOSE MEDIADA POR AUMENTO DA DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL, MAS NÃO VIA ERO

A marcação de células HL-60 com anexina V-FITC/IP tratadas com os triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina por 24 e 48h permitiu avaliar o perfil de morte celular. Os resultados obtidos demonstram uma exposição significativa de fosfatidilserina em células HL-60 tratadas com tingenona, em ambas as concentrações testadas (0,6 e 1,2 μM) e em todos os tempos avaliados. Para 22-hidroxitingenona e pristimerina, a exposição foi significativa em ambas as concentrações testadas (1,2 e 2,4 e 2,5 e 5,0 μM) no tempo de 48h e apenas significativa na maior concentração (2,4 e 5,0 μM) para o tempo de 24h. A doxorrubicina (DOX, 1 μM), utilizada como controle positivo também induziu aumento na externalização da fosfatidilserina, de modo significativo com 48h de tratamento quando comparado ao grupo controle negativo (DMSO 0,2%) ($P < 0,05$) (**Figura 9 e 10**).

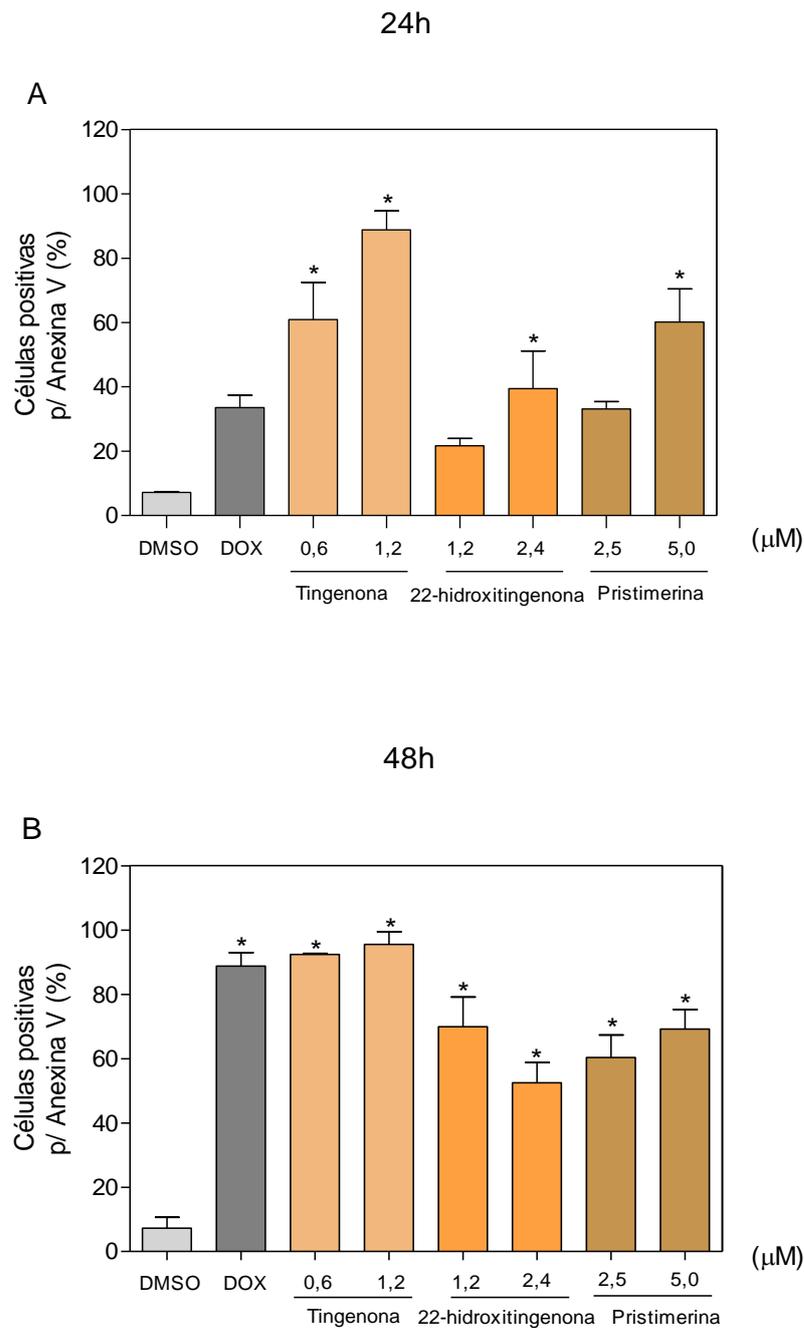


Figura 9. Efeito de triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* na indução de apoptose em células HL-60 após 24 e 48 h de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) utilizado para diluir os compostos testados. Doxorrubicina (DOX 1 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * P < 0,05 quando comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

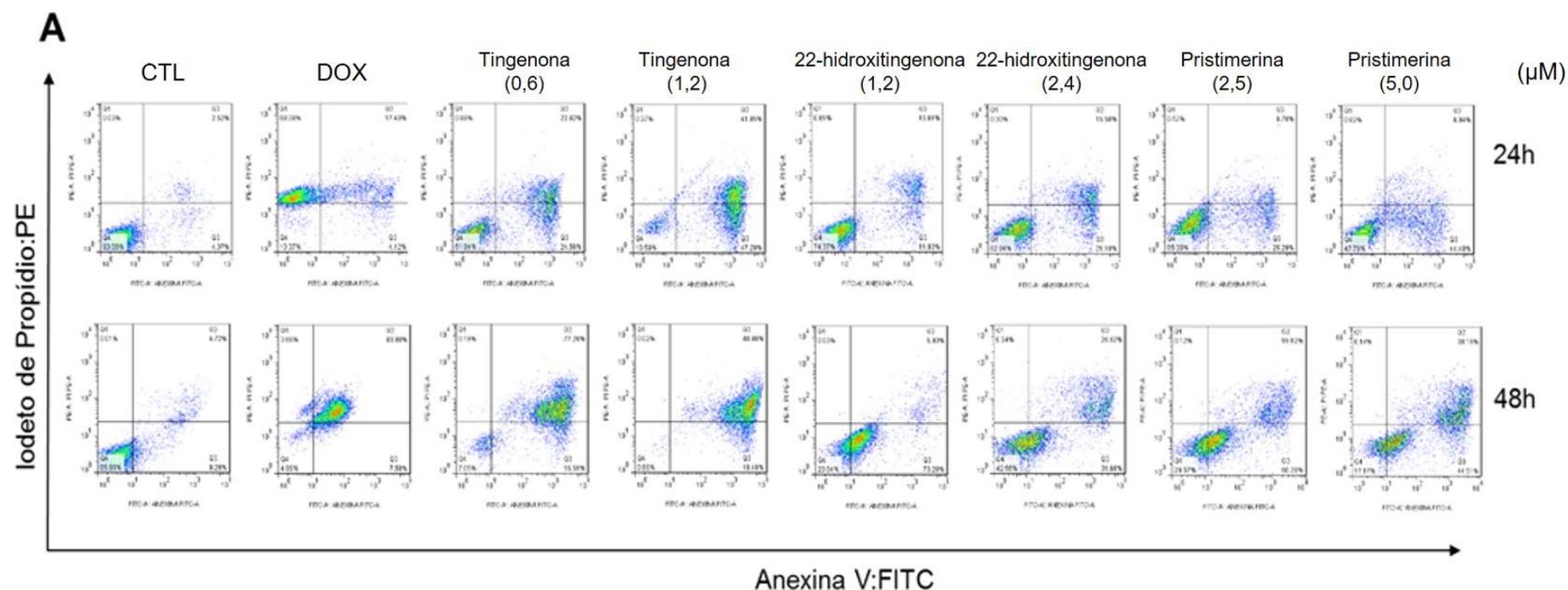


Figura 10. *Dot plots* representativos da marcação com Anexina V/Iodeto de propídio por citometria de fluxo. Células de leucemia humana HL-60 foram analisadas após o tratamento com tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina por 24 e 48h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorrubicina (DOX, 1 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os *dot plots* são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

A mitocôndria é uma importante organela celular responsável por produzir ATP de maneira eficiente, e, a polaridade da membrana interna da mesma é essencial para seu funcionamento correto. Esse ensaio foi realizado para avaliar a taxa de despolarização da membrana interna da mitocôndria induzida pelos triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina. O potencial transmembrânico mitocondrial foi determinado, por citometria de fluxo, pela capacidade de retenção da rodamina 123 pelas células HL-60 tratadas com os triterpenos tingenona (0,6 e 1,2 μM), 22-hidroxitingenona (1,2 e 2,4 μM) e pristimerina (2,5 e 5,0 μM) no tempo de 24 horas. Podemos observar que houve uma redução estatisticamente significativa do número de células com alteração no potencial transmembrânico mitocondrial quando tratado com os triterpenos, comparado com células HL-60 tratadas com o controle negativo. Em células HL-60 tratadas com o controle positivo, a doxorrubicina, também foi capaz de reduzir significativamente o potencial transmembrânico mitocondrial ($P < 0,05$) (**Figura 11**).

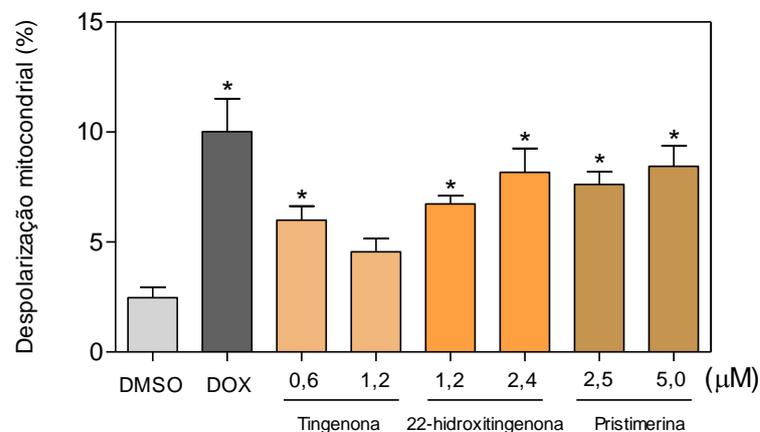


Figura 11. Efeito dos triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HL-60, após 24 h de tratamento. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para diluir as substâncias. A doxorrubicina (DOX 1 μM) foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância), seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

Os níveis intracelulares de ERO foram investigados por citometria de fluxo usando o fluorógeno $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$, após o tratamento de células HL-60 com os triterpenos tingenona (0,6 e 1,2 μM), 22-hidroxitingenona (1,2 e 2,4 μM) e pristimerina (2,5 e 5,0 μM). O tratamento após 1 ou 3 horas de incubação não induziu um aumento

significante nos níveis de ERO (**Figura 12**). Doxorrubicina, usada como controle positivo, aumentou os níveis de ERO após 1 h de incubação ($P < 0,05$).

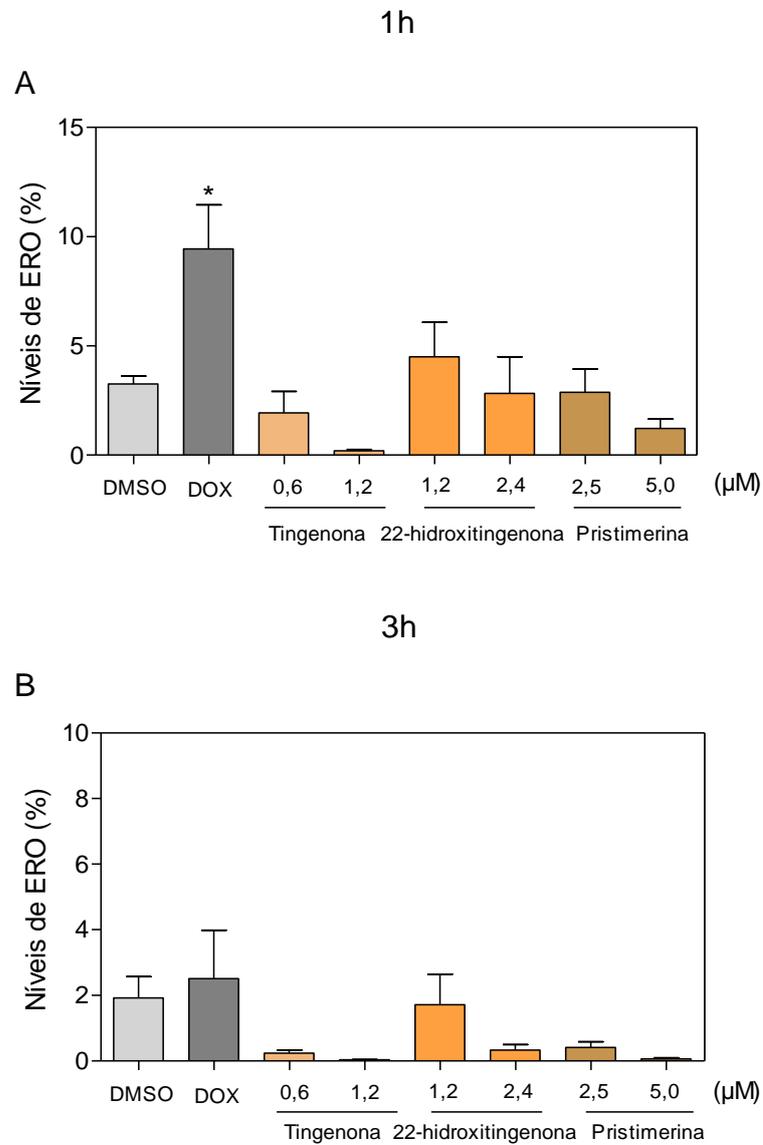


Figura 12. Efeito de triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de células HL-60 por citometria de fluxo usando marcação por H2-DCF-DA. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para diluir os compostos testados. A doxorrubicina (DOX 1 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. Para análise de citometria de fluxo, foram avaliados 10.000 eventos por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

5.3 OS TRITERPENOS ISOLADOS DE *SALACIA IMPRESSIFOLIA* INDUZEM A FRAGMENTAÇÃO DO DNA

A progressão do ciclo celular de células HL-60 tratadas com os triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina, foi avaliada por citometria de fluxo após 24 e 48 horas de incubação. A **Tabela 8** apresenta o conteúdo de DNA das células HL-60 tratadas com os compostos. Todo conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ foi considerado fragmentado.

Foi evidenciado que todos três compostos foram capazes de induzir aumento da fragmentação do DNA internucleossomal (sub-G₀/G₁) após 24 e 48 horas de incubação quando comparado com o controle negativo (DMSO 0,2%). Nas concentrações de 0,6 e 1,2 µM, o tratamento com a tingenona levou a um aumento do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ de 4,62% e 60,22% após 24 h, e, de 44,56% e 76,66% após 48 h. Nas concentrações de 1,2 e 2,4 µM, o composto 22-hidroxitingenona levou a um aumento do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ de 29,30% e 39,66% após 24 h e, de 63,68% e 67,43% após 48 h, respectivamente. Para a pristimerina, nas concentrações de 2,5 e 5,0 µM também foi observado um aumento do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ de 33,43% e 59,94% após 24 h, e, de 48,27% e 68,60% após 48 h (P <0,05). A doxorubicina utilizada como controle positivo, também apresentou fragmentação do DNA celular após 24 e 48h de incubação.

Tabela 8. Efeito dos triterpenos isolados de *Salacia impressifolia* sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA.

Compostos	Concentração (μM)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	3,37 \pm 1,44	47,71 \pm 5,42	20,43 \pm 3,20	22,01 \pm 2,84
Doxorrubicina	1	29,49 \pm 13,57*	1,57 \pm 0,76*	33,62 \pm 13,95	15,67 \pm 4,45*
Tingenona	0,6	4,62 \pm 0,32	13,71 \pm 8,43*	49,73 \pm 6,47	22,39 \pm 7,72
	1,2	60,22 \pm 4,99*	7,47 \pm 1,02*	11,36 \pm 1,38	6,25 \pm 1,04*
22-	1,2	29,30 \pm 3,36*	14,07 \pm 7,47*	28,79 \pm 5,39	14,45 \pm 1,37*
hidroxitingenona	2,4	39,66 \pm 4,47*	8,00 \pm 2,32*	25,77 \pm 4,75	10,36 \pm 2,26*
Pristimerina	2,5	33,43 \pm 8,87*	10,17 \pm 5,89*	28,34 \pm 4,67	10,48 \pm 2,44*
	5,0	59,94 \pm 4,03*	12,41 \pm 1,80*	13,12 \pm 0,90	8,15 \pm 1,30
48h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	5,03 \pm 1,85	54,13 \pm 2,67	21,47 \pm 3,55	16,06 \pm 1,16
Doxorrubicina	1	53,55 \pm 6,61*	10,36 \pm 3,53*	5,10 \pm 1,76*	22,16 \pm 7,70
Tingenona	0,6	44,56 \pm 18,87*	27,12 \pm 8,77*	14,39 \pm 4,78	19,21 \pm 6,64
	1,2	76,66 \pm 4,07*	14,31 \pm 6,99*	2,64 \pm 1,12*	3,80 \pm 1,68
22-	1,2	63,68 \pm 13,62*	23,22 \pm 8,89*	9,72 \pm 4,0	7,89 \pm 3,02
hidroxitingenona	2,4	67,43 \pm 6,65*	12,18 \pm 3,95*	5,44 \pm 3,73*	3,46 \pm 1,68
Pristimerina	2,5	48,27 \pm 8,95*	22,68 \pm 5,75*	10,88 \pm 3,10	11,09 \pm 2,74
	5,0	68,96 \pm 5,83*	11,59 \pm 3,73*	1,85 \pm 1,14*	2,94 \pm 0,89

Dados apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorrubicina (DOX 1 μM) foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados e os detritos celulares foram omitidos da análise. * P < 0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

5.4 O EXTRATO DE ACETATO DE ETILA (EAE) E SUA FRAÇÃO (FEAE.3) OBTIDOS DE *SALACIA IMPRESSIFOLIA* REDUZEM O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HL-60 EM MODELO XENOGRÁFICO

A atividade antileucêmica *in vivo* do extrato EAE e sua fração FEAE.3 da casca do caule de *S. impressifolia* foi investigada em camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HL-60. Os animais foram tratados com o extrato EAE (20 mg/kg) ou sua fração FEAE.3 (20 mg/kg) por injeções intraperitoneais, uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos. No final do tratamento, a média do peso dos tumores dos animais

dos controles negativos foi de $5,23 \pm 0,49$ g (**Figura 13A**). Nos animais tratados com EAE, a média dos pesos dos tumores foi de $3,12 \pm 0,320$, enquanto que nos animais tratados com a fração FEAE.3 foi de $0,97 \pm 0,41$ g. A inibição da massa tumoral foi de 40,4 e 81,5% para o extrato EAE e sua fração FEAE.3, respectivamente (**Figura 13B**). Os controles positivos (doxorrubicina 0,8 mg/kg e 5-fluorouracil 15 mg/kg) reduziram o peso do tumor em 70,7 e 53,9%, respectivamente.

A análise histológica dos tumores também foi realizada (**Figura 13C**). Observamos aglomerados soltos de células atípicas da linhagem mieloide, que exibiram aparência blástica, cromatina solta, nucléolos claros, citoplasma basofílico e vários graus de granulação citoplasmática em todos os grupos experimentais. Embora necrose e apoptose tenham sido observadas em todos os grupos, observamos mais cariorrexe e apoptose nos grupos doxorrubicina e FEAE.3. Além disso, hemorragia foi um achado importante para os grupos EAE e FEAE.3.

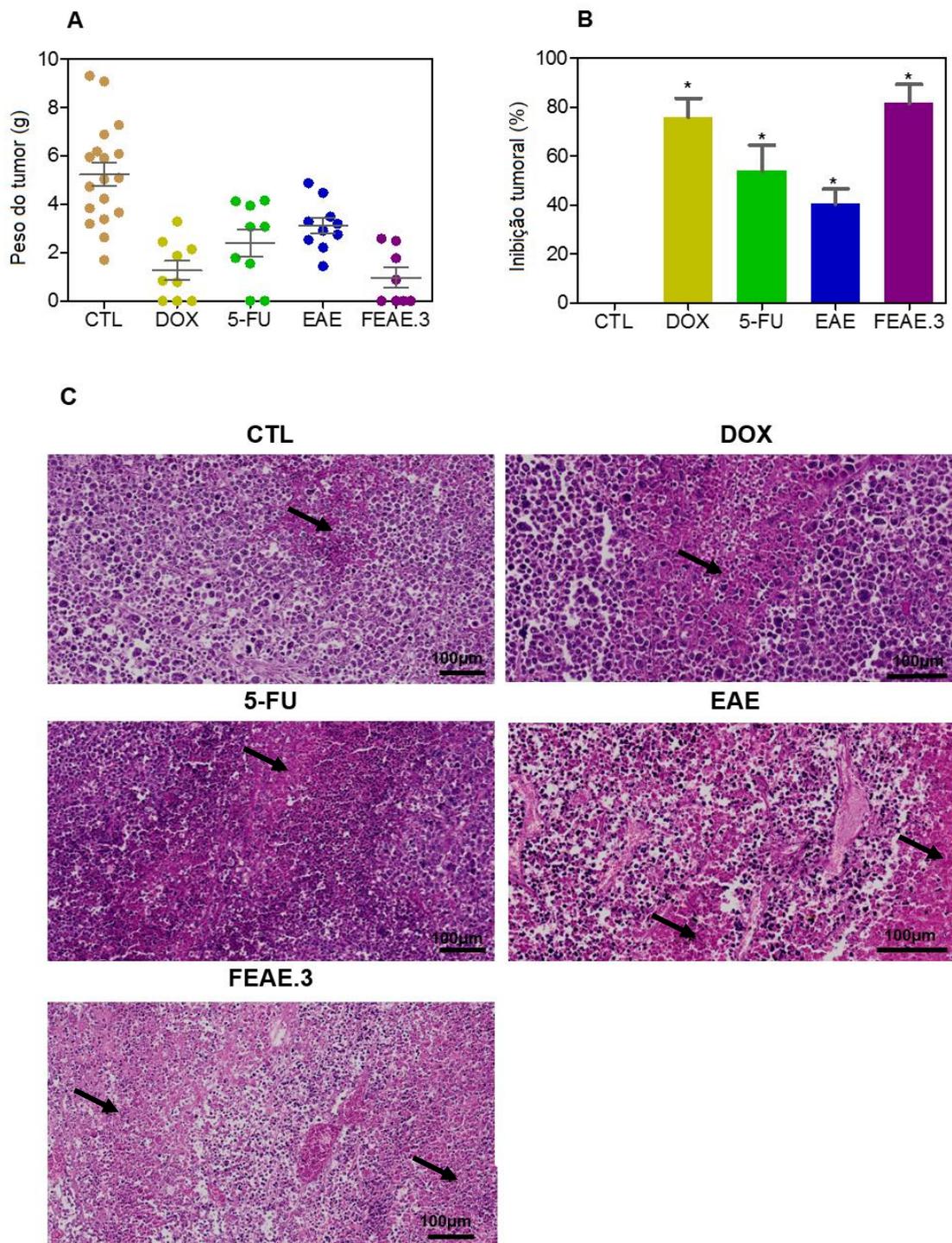


Figura 13. Atividade antitumoral *in vivo* do extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) obtidos da casca do caule de *Salacia impressifolia* em camundongos C.B-17 SCID com células HL-60 xenoenxertadas. **(A)** Peso do tumor (g) após o tratamento. **(B)** Inibição tumoral (%) após o tratamento. Os dados são apresentados como as médias \pm S.E.M. de 8 a 21 animais. * $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. **(C)** Análise histológica representativa dos tumores corados com hematoxilina e eosina e analisados por microscopia de luz (barra = 100 μ m). As setas representam áreas com necrose tumoral. Quando os tumores atingiram 100 a 200 mm³, os animais foram tratados por via intraperitoneal durante 15 dias consecutivos com EAE (20 mg/kg) e FEAE.3 (20 mg/kg). O controle negativo (CTL) foi tratado com o

veículo (5% de DMSO) utilizado para diluir os compostos testes. Doxorrubicina (DOX, 0,8 mg/kg) e 5-fluorouracil (5-FU, 15 mg/kg) foram usados como controles positivos.

Os parâmetros toxicológicos também foram avaliados nos animais tratados com os compostos. Uma diminuição do peso corporal foi observada nos animais tratados com EAE, FEAE.3 e doxorrubicina. Quando comparado com o grupo controle (CTL), não foi observado alteração significativa no peso relativo dos órgãos de nenhum dos grupos avaliados ($P > 0,05$) (**Tabela 9**).

Tabela 9. Efeito do tratamento com extrato de acetato de etila (EAE) e de sua fração (FEAE.3) da casca do caule de *Salacia impressifolia* no peso corporal e relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HL-60.

Parâmetros	CTL	DOX	5-FU	EAE	FEAE.3
Dose (mg/kg)	-	0,8	15	20	20
Sobrevida	21/22	10/10	11/11	12/12	8/10
Peso corporal inicial (g)	24,5 ± 0,2	24,5 ± 0,3	25,4 ± 0,6	24,0 ± 0,5	23,5 ± 0,6
Peso corporal final (g)	25,6 ± 0,4	20,3 ± 0,7*	25,6 ± 0,4	22,5 ± 0,8*	17,6 ± 0,5*
Fígado (g/100 g peso corporal)	5,5 ± 0,3	5,5 ± 0,4	5,3 ± 0,3	5,7 ± 0,4	4,6 ± 0,4
Rim (g/ 100 g peso corporal)	1,4 ± 0,04	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,04	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Coração (g/100 g peso corporal)	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,04	0,7 ± 0,1
Pulmão (g/100 g peso corporal)	0,7 ± 0,02	0,8 ± 0,03	0,7 ± 0,04	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Quando os tumores alcançaram de 100 a 200 mm³, os animais foram tratados por via intraperitoneal por 15 dias consecutivos. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para diluir as substâncias teste. Doxorrubicina (DOX) e 5-fluorouracil (5-FU) foram utilizados como controles positivo. Dados apresentados como a média ± E.P.M. de 10-22 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni.

A contagem total de eritrócitos e leucócitos, assim como a contagem diferencial de leucócitos, tais como granulócitos, linfócitos e monócitos, foram utilizadas como parâmetro hematológico. Não ocorreram alterações estatisticamente significantes nos parâmetros hematológicos do sangue periférico nos grupos EAE e FEAE.3, por outro lado, uma diminuição no número de plaquetas no grupo tratado com doxorrubicina foi observado quando comparado com o grupo controle. ($P > 0,05$) (**Tabela 10**).

Tabela 10. Efeito do tratamento com extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) obtidos de *Salacia impressifolia* sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HL-60.

Parâmetros	S/ tumor	CTL	DOX	5-FU	EAE	FEAE.3
Dose (mg/kg)	-	-	0,8	15	20	20
Eritrócitos (10⁶/mm³)	10,8 ± 0,2	10,0 ± 0,3	10,1 ± 0,5	9,4 ± 0,3	10,3 ± 0,3	10,8 ± 0,6
Hemoglobina (g/dL)	13,7 ± 0,2	13,9 ± 0,5	12,2 ± 0,3	12,1 ± 0,8	12,8 ± 0,3	14,2 ± 0,7
Hematócrito (%)	56,0 ± 1,0	52,0 ± 1,1	46,0 ± 1,5*	47,3 ± 0,6	50,1 ± 1,3	48,8 ± 3,4
VCM (fL)	54,0 ± 0,3	47,8 ± 0,3	46,4 ± 0,4	47,9 ± 0,3	49,1 ± 0,1	47,6 ± 0,5
Plaquetas (10³/mm³)	750,8 ± 41,0	759,6 ± 111,9	343,0 ± 65,9*	479,9 ± 47,9	654,0 ± 39,0	506,1 ± 50,6
Leucócitos (10³/mm³)	1,4 ± 0,3	3,4 ± 0,6	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	4,8 ± 1,4	5,4 ± 1,2
Contagem diferencial de leucócitos (%)						
Granulócitos	17,2 ± 4,5	36,3 ± 3,1	37,6 ± 3,5	36,0 ± 4,1	45,9 ± 8,7	50,1 ± 1,8
Linfócitos	64,6 ± 4,7	24,0 ± 3,5	36,0 ± 6,6	39,3 ± 7,0	27,8 ± 10,9	8,0 ± 0,7
Monócitos	18,3 ± 0,2	32,9 ± 1,8	26,5 ± 5,1	24,5 ± 2,9	26,1 ± 3,2	41,8 ± 1,7

O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) usado para diluir os compostos testados. Doxorrubicina (DOX 0,8 mg/kg) e 5-fluorouracil (15 mg/kg) foram utilizadas como controles positivo. Quando os tumores alcançaram de 100 a 200 mm³, os animais foram tratados por via intraperitoneal por 15 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de 6 a 13 animais. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla Bonferroni. VCM: Volume corpuscular médio.

Análises morfológicas do fígado, rins, pulmões e coração em todos os grupos também foram avaliadas. No fígado, a arquitetura acinar e a veia centrolobular também foram preservadas em todos os grupos. A inflamação observada no espaço portal do fígado foi discreta na maioria dos animais. Outros achados, como congestão e degeneração hidrópica, foram encontrados em todos os grupos, variando de leve a moderado. Além disso, áreas focais de necrose de coagulação foram observadas em todos os grupos e, nódulos metastáticos foram detectados em todos os animais do grupo FEAE.3. Nos rins, a arquitetura dos tecidos foi mantida em todos os grupos experimentais. Nos rins dos animais, as alterações histopatológicas incluíram congestão vascular e espessamento da membrana basal do glomérulo renal com diminuição do espaço urinário, que foram observados em todos os grupos tratados com os compostos. Além disso, uma discreta necrose de coagulação foi observada na região medular dos rins de alguns animais tratados com doxorrubicina e 5-fluorouracil. No entanto, a arquitetura dos tecidos foi mantida em todos os grupos experimentais. Nos pulmões, a arquitetura do parênquima variou de parcialmente mantida a modificada em todos os grupos. As alterações histopatológicas em todos os

animais variaram de leve a grave. Inflamação aguda significativa, edema, congestão, hemorragia e espessamento do septo alveolar com espaço aéreo diminuído foram frequentemente observados (**Figura 14**). A análise histopatológica dos corações dos animais não mostrou alterações em nenhum grupo. Algumas características histopatológicas neste estudo (degeneração hidrópica, congestão vascular e áreas focais de inflamação) são respostas celulares agudas a estímulos, e as células lesadas são capazes de retornar ao estado homeostático quando a estimulação terminar.

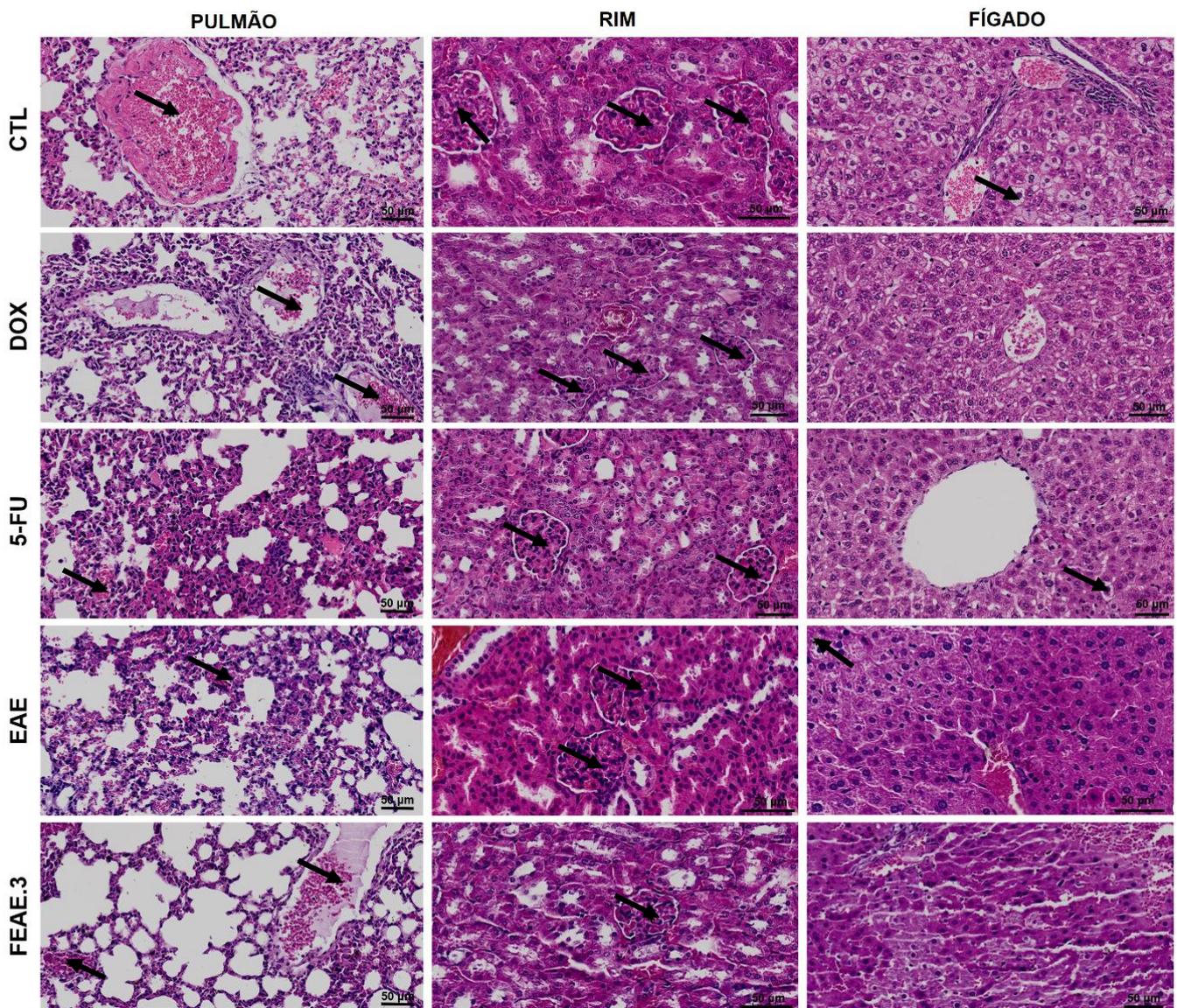


Figura 14. Análise histológica representativa de tecido pulmonar, renal e hepático corado com hematoxilina-eosina e analisado por microscopia de luz (barra = 50 µm). Quando os tumores atingiram 100 a 200 mm³, os animais foram tratados por via intraperitoneal durante 15 dias consecutivos com EAE (20 mg / kg) e FEAE.3 (20 mg / kg). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (5% DMSO) usado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (DOX, 0,8 mg / kg) e 5-fluorouracil (5-FU, 15 mg / kg) foram usados como controles positivos. As setas representam congestão vascular (pulmão), espessamento da membrana basal do glomérulo renal com diminuição do espaço urinário (rim) e degeneração hidrópica (fígado).

6. DISCUSSÃO

Plantas medicinais são tradicionalmente fonte de descoberta e desenvolvimento de fármacos anticâncer. A descoberta e o desenvolvimento de extratos ou frações padronizados, assim como compostos puros isolados de plantas medicinais como fonte de compostos citotóxicos, são estratégias importantes no tratamento do câncer. Neste trabalho, a atividade antileucêmica *in vitro* e *in vivo* da casca do caule de *S. impressifolia* foi demonstrada pela primeira vez. Embora esta espécie tenha relevância etnofarmacológica para o tratamento de muitas doenças, incluindo o tratamento do câncer, apenas trabalhos científicos que investigaram seu constituintes químicos e atividade antioxidante foram encontrados.

O extrato EAE, e as frações FEAE.3 e FEM.1, e triterpenos quinonametídeos (22-hidroxitingenona, tingenona, pristimerina) da casca do caule de *S. impressifolia* apresentaram citotoxicidade potente contra um pequeno painel de células cancerígenas. Linhagens celulares de cânceres de cólon, mama, fígado, língua, gástrico, da pele e hematológicos, incluindo atividade antileucêmica *in vitro* contra células HL-60 e K-562. De acordo com o nosso programa de triagem de compostos citotóxico que está em acordo com o programa de triagem do National Cancer Institute dos Estados Unidos da América, um extrato que mostra valores de CI_{50} abaixo de 30 $\mu\text{g/mL}$ e um composto puro que apresenta valores de CI_{50} inferiores a 4 $\mu\text{g/mL}$ em ensaios baseados em linhagem de células de câncer são considerados promissores para o desenvolvimento de fármacos anticâncer (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991; RIBEIRO *et al.*, 2012; DÓRIA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016). O extrato EAE, e as frações FEAE.3 e FEM.1 apresentaram valores de CI_{50} abaixo de 30 $\mu\text{g/mL}$ e os triterpenos quinonametídeos (22-hidroxitingenona, tingenona e pristimerina) apresentaram valores de CI_{50} inferiores a 4 $\mu\text{g/mL}$, indicando que apresentam citotoxicidade promissora. Particularmente, o extrato EAE e sua fração FEAE.3, bem como os triterpenos quinonametídeos, 22-hidroxitingenona e tingenona apresentaram citotoxicidade mais potente e apesar de apresentarem baixa seletividade, apresentam efeito em células não cancerosas com potência equivalente ao controle positivo utilizado (doxorubicina).

Como mencionado anteriormente, algumas espécies do gênero *Salacia* foram previamente descritas como fonte de agentes citotóxicos. Similar ao efeito citotóxico

observado para os extratos de *S. impressifolia*, os extratos metanólicos obtidos a partir dos galhos e da raiz de *S. oblonga* apresentaram valores de CI_{50} de 35 e 44 $\mu\text{g/mL}$ em células de câncer de mama (MDA-MB-231) (MUSINI *et al.*, 2015). O fracionamento guiado por bioensaio do extrato acetônico das cascas de caule de *S. leptoclada* resultou no isolamento de triterpenos quinonametídeos e pentacíclicos que apresentou citotoxicidade em células de leucemia murina P388 com valor de CI_{50} de 0,04 $\mu\text{g/mL}$ (RUPHIN *et al.*, 2013). O fracionamento guiado por bioensaio da casca do caule de *S. sp. petenensis* levou ao isolamento do composto puro citotóxico tingenona, o qual induziu potente efeito antiproliferativo em células das linhagens HepG2 (carcinoma hepatocelular), H-4-II-E (carcinoma hepatocelular de rato) e SK-Mel-28 (melanoma humano), apresentando valores de CI_{50} de 1,9, 2,7 e 1,7 μM , respectivamente (SETZER *et al.*, 1998). A tingenona e 22-hidroxitingenona (ou tingenina B) isolada a partir da planta *Elaeodendron croceum*, também foram descritas por apresentar valores de CI_{50} promissores para as linhagens celulares HeLa (adenocarcinoma cervical), SNO (carcinoma esofágico) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) (YELANI *et al.*, 2010). Estudos similares demonstraram que a tingenona, pristimerina, 22-hidroxitingenona isoladas da planta *Maytenus chuchhuasca*, possuem atividade citotóxica contra a linhagem celular cancerígena P-388 (leucemia linfocítica murina), com valores de CI_{50} de 0,12 (pristimerina), 0,041 (tingenona) e 0,012 (22-hidroxitingenona) $\mu\text{g/mL}$ (SHIROTA *et al.*, 1994). A tingenona e a pristimerina também foram capazes de inibir o crescimento celular de células RPMI8226 de mieloma humano, o que foi associado à sua capacidade de inibir a polimerização da tubulina (MORITA *et al.*, 2008). Também foi relatado que a 22-hidroxitingenona (ou tingenina B) é citotóxica contra a linhagem de células-tronco de câncer de mama MCF-7s (verificou-se que o valor de CI_{50} durante 48 h de incubação foi de 2,38 mM) (CEVATEMRE *et al.*, 2016).

O potencial citotóxico dos triterpenos quinonametídeos isolados de *S. impressifolia* foi corroborado através do ensaio de viabilidade celular. Estudos previamente reportados também demonstraram diminuição da viabilidade celular em células HeLa (carcinoma cervical) (BYUN *et al.*, 2009), como também em células HCT-116 e HepG2 (GUO *et al.*, 2013; YOUSEF *et al.*, 2016), quando tratadas com a pristimerina. Cevatemre *et al.* (2016) relatou que o triterpeno 22-hidroxitingenona (ou tingenina B) diminuiu a viabilidade celular de maneira dependente da concentração.

A apoptose desempenha um papel importante no tratamento do câncer, pois é um alvo popular de muitas estratégias de tratamento. A abundância de literatura sugere que o direcionamento da apoptose no câncer é viável, visto que o desenvolvimento de fármacos de alto potencial apoptótico é de grande interesse para quimioterapia do câncer, uma vez que a morte celular por apoptose seria ideal para a terapia anticâncer (MIZUTANI *et al.*, 2005; BRENES *et al.*, 2007; WONG, 2011). A apoptose é caracterizada por uma série de eventos morfológicos típicos, como a condensação citoplasmática e nuclear, a formação de vesículas na membrana plasmática (*blebs*), exposição de fosfatidilserina, redução do tamanho celular, picnose, a clivagem do DNA por endonucleases específicas e a formação de corpos apoptóticos (SARASTE e KARI, 2000; KROEMER *et al.*, 2009; PISTRITTO *et al.*, 2016).

Em estudos prévios, foi relatado que a pristimerina induziu aumento de células marcadas para anexina V nas linhagens de osteosarcoma MNNG e 143B, onde houve uma indução do aumento da produção de caspase 3 e ativação das caspases 8 e 9, indicando que a apoptose foi induzida por via intrínseca e extrínseca (MORI *et al.*, 2017), bem como na linhagem HepG2 (GUO *et al.*, 2013). A pristimerina também induziu apoptose dependente de caspase nas células MDA-MB-231 (WU *et al.*, 2005) e induz apoptose através de disfunção mitocondrial mediada por espécies reativas de oxigênio em células de glioma U87 (YAN *et al.*, 2013). O tratamento com 22-hidroxitingenona em uma população de células-tronco da linhagem MCF-7 apresentou resultados condizentes com indução de morte celular apoptótica (CEVATEMRE *et al.*, 2016), corroborando os achados a respeito dos mecanismos de morte celular causados por triterpenos. A pristimerina é um composto bem descrito na literatura, entretanto, poucos estudos são encontrados para a tingenona e a 22-hidroxitingenona. Neste trabalho, nós mostramos pela primeira vez que a tingenona e a 22-hidroxitingenona são capazes de induzir morte celular por apoptose em células HL-60.

Eventos bioquímicos relevantes associados à morte celular apoptótica incluem ativação de caspases, permeabilização de membrana mitocondrial (MMP), fragmentação de DNA internucleossômico e exposição superficial do fosfolípido fosfatidilserina (SARASTE e KARI, 2000). Decidimos então, elucidar quais mecanismos de ação estariam envolvidos no processo de morte celular apoptótica induzida pelos triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina.

As mitocôndrias desempenham papéis fundamentais na ativação da apoptose em células de mamíferos, sendo responsável por liberar fatores pró-apoptóticos em decorrência de alterações no potencial da membrana mitocondrial (MMP) (WANG e YOULE, 2009). Desta forma, para melhor caracterizar a via apoptótica envolvida no processo de morte induzida pelos compostos teste, foi avaliado o efeito dos mesmos sobre o potencial transmembrânico mitocondrial. Os resultados obtidos a partir dessa análise demonstram que os triterpenos estudados, alteraram a integridade mitocondrial de células HL-60 tratadas por 24 horas, nas concentrações testadas. Em estudos similares, também foi reportado perda no potencial da membrana mitocondrial induzida pela pristimerina em células HepG2 (GUO *et al.*, 2013), em células de câncer de colón HCT-116, SW-620 e COLO-205 (YOUSEF *et al.*, 2016), como também em células de câncer de mama MDA/MB-231 (WU *et al.*, 2005). Adicionalmente, células-tronco de adenocarcinoma de mama MCF-7s tratadas com 22-hidroxitingenona (ou tingenina B) reduziu o potencial da membrana mitocondrial de maneira dependente da concentração (CEVAMTERE *et al.*, 2016). Neste estudo, também relatamos pela primeira vez a capacidade da tingenona induzir diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial.

Como citado anteriormente, a fragmentação internucleossômica do DNA genômico tem sido a marca bioquímica da apoptose por muitos anos. O ciclo celular rege a transição da quiescência (G_0) para a proliferação, garantindo a fidelidade do transcrito genético. As fases associadas à síntese de DNA (fase S) e mitose (fase M) são separadas pelos pontos de checagem G_1 e G_2 (WYLLIE, 1980; DICKSON e SCHWARTZ, 2009), e, diversos estudos confirmam que o ciclo celular é alvo de diversos medicamentos originados a partir de produtos naturais. O tratamento de células de câncer de pâncreas (BxPC-3, PANC-1 e AsPC-1) com a pristimerina resultou em parada na fase G_1 (WANG *et al.*, 2012) e o mesmo foi observado em células de câncer de cólon HCT-116, SW-620 e COLO-205, quando submetidas ao tratamento com esse composto (YOUSEF *et al.*, 2016). Contudo, outros estudos relataram que a pristimerina foi capaz de aumentar o conteúdo de DNA em sub- G_0/G_1 em células SKBR3 (câncer de mama) (LEE *et al.*, 2013) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) (WU, 2013). Neste estudo, também foi observado o aumento do conteúdo de DNA em sub- G_0/G_1 nas células HL-60 tratadas com os triterpenos pristimerina, 22-hidroxitingenona e tingenona, sugerindo fragmentação internucleossomal do DNA, e, portanto, que os mesmos são efetivos em causar morte

celular. Na literatura, há uma escassez de trabalhos que visem avaliar os efeitos dos triterpenos tingenona e 22-hidroxitingenona sobre o ciclo celular em células cancerosas. Sendo assim, este é o primeiro trabalho a relatar indução de fragmentação do DNA após tratamento de células cancerosas da linhagem HL-60 com estes compostos.

Diversos compostos com atividade anticâncer em uso clínico induzem a apoptose através da geração de ERO (espécies reativas de oxigênio). Em células normais, as espécies reativas de oxigênio são geradas como subprodutos do metabolismo aeróbico normal, como segundos mensageiros em várias vias de transdução de sinal ou em resposta ao estresse ambiental. Dependendo da concentração, as espécies reativas de oxigênio produzem um amplo espectro de respostas biológicas que vão desde efeitos mitogênicos a efeitos proliferativos em baixa concentração, até o dano macromolecular e a apoptose em altas concentrações.

As ERO também podem ativar a transição de permeabilidade mitocondrial e a despolarização mitocondrial (BURDON, 1995; VERCESI *et al.*, 1997; MARTINDALE e HOLBROOK, 2002; NOHL *et al.*, 2003; RAMANATHAN *et al.*, 2005; ALEXANDRE *et al.*, 2006; KUWABARA *et al.*, 2008; SUN e RIGAS, 2008). Guo *et al.* (2013) quantificou os níveis intracelulares de ERO em células HepG2 após o tratamento com a pristimerina. O tratamento desencadeou aumento significativo de ERO e o aumento dessas espécies desempenha um papel essencial na indução da apoptose pela pristimerina em células HepG2. Liu *et al.* (2013) também relatou que a pristimerina ativa a via apoptótica mitocondrial através da geração de ERO intracelular e, o efeito antiproliferativo / apoptótico da pristimerina é regulado por Bcl-2 e medeia a regulação negativa de Bcl-2 através da via de degradação ubiquitina-proteassoma dependente de ERO. Estudos similares indicam que a pristimerina induz morte celular mitocondrial por ativação dependente de ERO, como também da proteína pró-apoptótica Bax e PARP-1 em células de câncer de colo de útero humano, como também foi capaz de induzir aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, implicando na indução de apoptose e disfunção mitocondrial em células de glioma U87 (BYUN *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2013). Entretanto, um estudo realizado com a pristimerina, avaliou a capacidade deste triterpeno de induzir a produção de ERO em células MDA-MB-231 e, a produção de ERO não foi diretamente associada com a apoptose induzida por este composto nessas células (WU *et al.*, 2005). No nosso estudo, a pristimerina não foi capaz de induzir a produção de ERO em células HL-60, corroborando com este

último estudo. Nossos achados demonstraram que a citotoxicidade causada pelos triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina não é mediada pelo estresse oxidativo, como citado anteriormente.

EAE e sua fração FEAE.3 também inibiram o desenvolvimento *in vivo* de células HL-60 inoculadas em camundongos C.B-17 SCID. Na família Celastraceae, o extrato acetato de etila de *Celastrus orbiculatus* reduziu o desenvolvimento de células humanas de câncer gástrico em camundongos nude, juntamente com a regulação negativa do nível de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-12 e proteínas relacionadas à proliferação PI3K, mTOR e p70s6k, e aumento da expressão do nível de expressão das proteínas pró-apoptóticas caspase-3 e Bax (WANG *et al.*, 2017). A pristimerina que é um dos triterpenos quinonametídeos presentes no extrato EAE e sua fração FEAE.3 foi previamente relatada como capaz de inibir o desenvolvimento *in vivo* de células HCT-116 enxertadas em camundongos nude através da inibição da expressão de NF-κB acompanhada de supressão significativa da fosforilação da p65 (YOUSEF *et al.*, 2018). Pristimerina também inibe o crescimento de glioma *in vivo* em camundongos nude com glioma de xenoenxerto subcutâneo, que foi associado com ativação de JNK, translocação de AIF para núcleo e aumento de Bax/Bcl-2 (ZHAO *et al.*, 2016). Além disso, a pristimerina inibiu o plasmocitoma cultivado a partir de células de mieloma humano xenoenxertadas em camundongos nude (TIEDEMANN *et al.*, 2009). Os triterpenos quinonametídeos 22-hidroxitingenona e tingenona, que também estão presentes no extrato EAE e sua fração FEAE.3, não foram previamente avaliados em um modelo xenográfico *in vivo*; entretanto, são agentes citotóxicos potentes e devem contribuir para a ação da antileucêmica *in vivo* do extrato EAE e sua fração FEAE.3.

Com relação à toxicidade desses fármacos, alguns efeitos não esperados foram encontrados nos animais tratados com os compostos, incluindo nódulos metastáticos detectados nos animais tratados com a fração FEAE.3 e a redução dos pesos corporais nos animais tratados com o extrato EAE e sua fração FEAE.3, indicando toxicidade. No estudo *in vitro*, também observamos baixa seletividade dessas substâncias para células cancerígenas *versus* células não cancerígenas. Isso significa que, embora essas substâncias naturais possam suprimir o crescimento do tumor *in vivo*, sua toxicidade é um problema em potencial para o desenvolvimento delas como agentes anticancerígenos. Por outro lado, os atuais medicamentos quimioterápicos contra o câncer apresentam toxicidade severa e não são eficazes em

muitos tipos de câncer, incluindo a leucemia mielóide aguda. O desenvolvimento de novos candidatos antineoplásicos é uma necessidade urgente, e mesmo aqueles medicamentos com certa toxicidade são tolerados. Além disso, não foi observada alteração no peso dos órgãos nem na análise hematológica do sangue periférico dos animais tratados com o extrato EAE e sua fração FEAE.3.

7. CONCLUSÃO

O nosso estudo revelou que os triterpenos tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina obtidos de *S. impressifolia*, exibiram citotoxicidade potente em um painel de diferentes células cancerosas, induzindo fragmentação do DNA. Observamos também alteração no potencial transmembrânico mitocondrial. Além disso, o extrato de acetato de etila (EAE) e sua fração (FEAE.3) também exibiram citotoxicidade *in vitro* e atividade antileucêmica *in vivo* que pode ser atribuída aos triterpenos quinonametídeos (tingenona, 22-hidroxitingenona e pristimerina). Esses dados confirmam o uso etnofarmacológico desta espécie e contribui para o desenvolvimento de um novo fármaco fitoterápico antineoplásico.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.; NASSIRI, M. Acute promyelocytic leukemia: a review and discussion of variant translocations. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 139, n. 10, p. 1308-1313, 2015.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v.170, p.211-224, 1994.

ALEXANDRE, J. *et al.* Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. **International journal of cancer**, v. 119, n. 1, p. 41-48, 2006.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. Sao Paulo: Hemus, 1993. v. 4. 341p.il.

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Quimica Nova** v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from celastraceae. In: ATTA UR, R. (Ed.) **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, 2005. v.30, p. 635-702.

ALVARENGA, N. L. *et al.* A new antibiotic nortriterpene quinone methide from *Maytenus catingarum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 750-751, 1999.

ALVES-SILVA, J. M. *et al.* North African medicinal plants traditionally used in cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 383, 2017.

BACHIREDDY, P.; RAKHRA, K.; FELSHER, D. W. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: multiple roles for the immune system in oncogene addiction. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 167, n. 2, p. 188-194, 2012.

BARION, L. A. *et al.* Associação entre HLA e leucemia em uma população brasileira de etnia mista. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 53, n.3, p. 252-256, 2007.

BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. **Cancer Research**, v. 30, n. 4, p. 1174-1184, 1970.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359, 2014.

BISHOP, K. S.; FERGUSON, L. R. The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p.922–947, 2015.

BOURDY, G. *et al.* Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 87-109, 2000.

BRAKO, L.; ZARUCCHI, J. L. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Peru. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.**, v. 45, p. 1-1286, 1993.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.

BRENES, O. *et al.* Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.61, p.347-355, 2007.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em:
<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 20 jul 2018.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>. Acesso em: 25 ago 2018.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em:
http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=81. Acesso em: 15 jul 2018.

BURDON, R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 4, p. 775-794, 1995.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.25, p. 475 – 516, 2008.

BYUN, J. Y. *et al.* Reactive oxygen species-dependent activation of Bax and poly (ADP-ribose) polymerase-1 is required for mitochondrial cell death induced by triterpenoid pristimerin in human cervical cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 734-744, 2009.

CALGAROTTO, A. K. *et al.* Antitumor activities of Quercetin and Green Tea in xenografts of human leukemia HL60 cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3459, 2018.

CARVALHO, P. R. *et al.* Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v.2, n. 3, p. 367-372, 2005.

CEVATEMRE, B. *et al.* The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 248-255, 2016.

CHÁIREZ-RAMÍREZ, M. H. *et al.* Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 758, 2016.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829 – 837, 2004.

CLAVO, Z. M. P.; CARDENAS, Z. P. S.; ORIHUELA, A. O. **Plantas medicinales: usadas por mujeres nativas y mestizas en la región Ucayali**. Cali, Colombia: Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria; Guanare, Venezuela: Centro de Investigación y Divulgación en Sistemas Sostenibles Tropicales de Producción Agropecuaria, 2003.

CORSINO, J. *et al.* Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998.

CORSINO, J. *et al.* Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 8, p. 913-916, 2003.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.72–79, 2005.

DAGANG, W.; JIKAI, L.; CHUNQUAN, C. Angulatueoid G and H, sesquiterpenes from the seeds of *Celastrus angulatus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4219-4222, 1992.

DIAS, R. B. *et al.* Principles of cancer pathogenesis and therapies: a brief overview. In: **Bioactive Essential Oils and Cancer**. Springer, Cham, 2015. p. 1-17.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery-Oxford International Edition**, v. 36, n. 3, p. 134-138, 2018.

DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Oncology**, v. 16, n. 2, p. 36, 2009.

DIETLEIN, F.; THELEN, L.; REINHARDT, H. C. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 8, p. 326-339, 2014.

DÓRIA, G. A. A. *et al.* In vivo antitumor effect, induction of apoptosis and safety of *Remirea maritima* Aubl.(Cyperaceae) extracts. **Phytomedicine**, v. 23, n. 9, p. 914-922, 2016.

EVANS, E.; STAFFURTH, J. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery, Oxford**, v. 36, n. 3, p. 111-116, 2018.

FARKONA, S.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? **BMC Medicine**, v. 14, n. 1, p. 73, 2016.

FAIRCHILD, A. *et al.* Hormonal therapy in oncology: a primer for the radiologist. **American Journal of Roentgenology**, v. 204, n. 6, p. W620-W630, 2015.

FERREIRA, C.; ROCHA, J. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

FERREIRA, P. M. P. *et al.* Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270-279, 2016.

FIGUEIREDO, J. N.; RAZ, B.; SEQUIN, U. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity. **Journal of Natural Products** v. 61, n. 6, p. 718-23, 1998.

GILL, B. S.; KUMMAR, S. Triterpenes in cancer: significance and their influence. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 9, p. 881-896, 2016.

GOLAN, D. *et al.* **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Guanabara Koogan, 2009.

GUERITTE, F.; FAHY, J. The vinca alkaloids. **Anticancer agents from natural products**, v. 10, p. 123-135, 2005.

GUO, Y. *et al.* Triterpenoid pristimerin induced HepG2 cells apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction. **Journal BUON**, v. 18, n. 2, p. 477-85, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of Cancer: the Next Generation**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HOLTHUIS, J. J. M. Etoposide and teniposide. **Pharmaceutisch Weekblad**, v. 10, n. 3, p. 101-116, 1988.

IMRAN, A. *et al.* Role of molecular biology in cancer treatment: a review article. **Iranian Journal of Public Health**, v. 46, n. 11, p. 1475, 2017.

INMAN, H. R.; KUEHL, D. Acute Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.31, p.1011-1028, 2017.

JELLER, A. H. *et al.* Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1977-1982, 2004.

JINBO, Z. *et al.* Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Euonymus* species. **Phytochemistry**, v. 61, n. 6, p. 699-704, 2002.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 375-404, 2016.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 455, n. 1, p. 152-162, 1976.

KANWAL R.; GUPTA K.; GUPTA S. Cancer Epigenetics: An Introduction. **Methods in Molecular Biology**, v.1238, p.3-25, 2015.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A.J. (Org.). **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Rio de Janeiro, RJ: AMGH, 2017.

KINGSTON, D. G. I. The Chemistry of Taxol. **Pharmacology & Therapeutics**, v.52, p.1 - 34, 1991.

KINGSTON, D. G. I. Recent advances in the chemistry of taxol. **Journal of Natural Products**, v.63, p.726 - 734, 2000.

KINGSTON, D. G. I. Taxol and its analogs. In: CRAGG, G.M., KINGSTON, D.G.I., NEWMAN, D.J. (Eds.). **Anticancer Agents from Natural Products**. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005. p. 89 – 122.

KOWALSKI, L. P. Results of salvage treatment of the neck in patients with oral cancer. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 128, n. 1, p. 58-62, 2002.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p.3, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Bases Patológicas das Doenças**. 8ª ed., 2008.

KUWABARA, M. *et al.* Regulation of cell survival and death signals induced by oxidative stress. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 51-57, 2008.

KUMMAR, V. *et al.* **Pathology Basis of Disease**. 9th ed. Canadá: Elsevier Saunders, 2015. p.266.

LACERDA, J. F.; CARMO, J. A.; LACERDA, J. M. Acute promyelocytic leukemia. The therapeutic advances. **Acta Medica Portuguesa**, v. 6, n. 10, p. 473-80, 1993.

LEE, J. S. *et al.* Anticancer activity of pristimerin in epidermal growth factor receptor 2-positive SKBR3 human breast cancer cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 2, p. 316-325, 2013.

LIMA, O. G. *et al.* Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXVII. Atividade antimicrobiana e antineoplásica de Juglona (5-hidroxi-1, 4-naftoquinona), Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1, 4-naftoquinona) e Plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1, 4-naftoquinona) e Lawsona (2-hidroxi-1, 4-naftoquinona). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 12, p. 3-12, 1972.

LIMA, O. G. *et al.* Antimicrobial substances from higher plants. XXX: Antimicrobial and antineoplastic activity of pristimerin isolated from *Prionostemma aspera*, from the humid bushes of Pernambuco region. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 9, p. 17, 1969.

LIU, Y. B. *et al.* Pristimerin induces apoptosis in prostate cancer cells by down-regulating Bcl-2 through ROS-dependent ubiquitin-proteasomal degradation pathway. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, p. 5, 2013.

LOMBARDI, J. Notas nomenclaturais em Salacioideae (Celastraceae). **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 123-125, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, p.823-837, 2009.

MACKLIS, J.D.; MADISON R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, v.31, p.43–46, 1990.

MAGALHÃES, H. I. *et al.* 4-Methoxyphenyl(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) methanone inhibits tubulin polymerization, induces G2/M arrest, and triggers apoptosis in human leukemia HL-60 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 1, p. 117-126, 2013.

MANOEL, H. R.; MOYA, H. D. A Comprehensive study of the use of Cu(II)/4, 4'-dicarboxy-2, 2'-biquinoline complexes to measure the total reducing capacity: application in herbal extracts. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22411-22421, 2015.

MARIE, J.; MARZAC, C.; LEGRAND, O. Cytostatic drug resistance mechanisms. **EMC - Hematologie**, v.1, p. 59-68, 2004.

MAXIMOV, G. K.; MAXIMOV, K. G. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 22, n. 2, p. 664-668, 2008.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1-15, 2002.

MEENAGHAN, T.; DOWLING, M.; KELLY, M. Acute leukaemia: making sense of a complex blood cancer. **British Journal of Nursing**, v. 21, n. 2, p. 76-83, 2012.

MENENDEZ, D. *et al.* Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2191, 2007.

MIZUTANI, H. *et al.* Mechanisms of Apoptosis Induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v.76, p.1439-1453, 2005.

MORI, Y. *et al.* Antitumor effects of pristimerin on human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 5703, 2017.

MORITA, H. *et al.* Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 1050-1052, 2008.

MOUSINHO, K. C. *et al.* Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel–Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 421-426, 2011.

MUSINI, A.; RAO, J. P.; GIRI, A. Phytochemicals of *Salacia oblonga* responsible for free radical scavenging and antiproliferative activity against breast cancer cell lines (MDA-MB-231). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 4, p. 583-590, 2015.

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, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NOHL, H. *et al.* Cell respiration and formation of reactive oxygen species; Facts And Artefacts: 7. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, p. S13, 2003.

O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421- 5426, 2000.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6/A, p. 976-984, 2002.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA, M. S. *et al.* Ru (II)-Thymine Complex Causes Cell Growth Inhibition and Induction of Caspase-Mediated Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1609, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 06 set. 2017.

OWADALLY, W.; STAFFURTH, J. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 127-130, 2015.

PAARAKH, P. M.; PATIL, L. J.; THANGA, S. A. Genus Salacia: A comprehensive review. **Journal of Natural Remedies**, v. 8, n. 2, p. 116-131, 2008.

PAZ, W. H. *et al.* Triterpenes from the Roots of Salacia impressifolia. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 1, p. 200-201, 2018.

PERRI, F. *et al.* Epigenetic control of gene expression: potential implications for cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 111, p. 166-172, 2017.

PFLAUM, J.; SCHLOSSER, S.; MÜLLER, M. p53 family and cellular stress responses in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 285, 2014.

PISTRITTO, G. *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Ageing**, Albany NY, v. 8, n. 4, p. 603, 2016.

- RAHMAN, M.; HASAN, M. R. Cancer metabolism and drug resistance. **Metabolites**, v. 5, n. 4, p. 571-600, 2015.
- RAMANATHAN, B. *et al.* Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. **Cancer Research**, v. 65, n. 18, p. 8455-8460, 2005.
- RAMAKRISHNA, D. *et al.* Salacia sps.: a source of herbal drug for several human diseases and disorders. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 7, n. 3, p. 122-133, 2016.
- RIBEIRO, J. E. L. S. **Flora da reserva ducke**. DFID, 1999.
- RIBEIRO, S. S. *et al.* Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, v. 78, n. 14, p. 1601-1606, 2012.
- RUPHIN, F. P. *et al.* Antiplasmodial, cytotoxic activities and characterization of a new naturally occurring quinone methide pentacyclic triterpenoid derivative isolated from *Salacia leptoclada* Tul.(Celastraceae) originated from Madagascar. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 10, p. 780, 2013.
- RUSTHOVEN, K. E. *et al.* Effect of Radiation Techniques in Treatment of Oropharynx Cancer. **Laryngoscope**, v.118, p.635 - 639, 2008.
- SAGRILLO, M. R. *et al.* Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2005.
- SALMONM, S. E. **Em farmacologia básica & clínica**. In: KATZUNG B.G. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.,1998. p. 629–655.
- SANTANA, C. F.; ASFORA, J. J.; COTIAS, C. T. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, p. 37-49, 1971.

SANTO, M. G.; NUNEZ, C. V.; MOYA, H. D. A new method for quantification of total polyphenol content in medicinal plants based on the reduction of Fe (III)/1, 10-phenanthroline complexes. **Advances in Biological Chemistry**, n. 3, p. 525-535, 2013.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 263, 2018.

SETZER, W. N. *et al.* The cytotoxic activity of a *Salacia* liana species from Monteverde, Costa Rica, is due to a high concentration of tingenone. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 583-583, 1998.

SHIROTA, O. *et al.* Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 12, p. 1675-1681, 1994.

SILVA, F. M. A. *et al.* Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith collected at the Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 77-80, 2016.

SOMWONG, P.; SUTTISRI, R.; BUAKEAW, A. A new 1, 3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 7, p. 1047-1051, 2011.

SOREIDE, J. A. *et al.* Surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. **Tidsskr nor Laegeforen**, v. 128, p.50 – 53, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II**. Nova Odessa, SP, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

STOIKA, R. *et al.* Potential role of transforming growth factor b1 in drug resistance of tumor cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 497-508, 2003.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 6, p. 71-133, 1991.

SUN, Y.; RIGAS, B. The thioredoxin system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer agents. **Cancer Research**, v. 68, n. 20, p. 8269-8277, 2008.

TARIQ, SADIA, S. *et al.* Systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 2, p. 202-264, 2017.

TIEDEMANN, R. E. *et al.* Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF- κ B with antimyeloma activity in vitro and in vivo. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 4027-4037, 2009.

THOMAS, H.; COLEY, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. **Cancer Control**, v. 10, n. 2, p. 159-159, 2003.

UDAYAN, P. S. *et al.* A new species of Salacia (Hippocrateaceae) from South India. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 69, n. 2, p. 255-258, 2012.

VELEZ, A. M. A.; HOWARD, M. S. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 176, 2015.

VERCESI, A. E. *et al.* The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 1, p. 43-52, 1997.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN, B. D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 165-175, 2003.

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

WANG, TAO, L. *et al.* Anticancer efficacy of the ethyl acetate extract from the traditional Chinese medicine herb *Celastrus orbiculatus* against human gastric cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 147-157, 2017.

WANG, Y. *et al.* Pristimerin causes G1 arrest, induces apoptosis, and enhances the chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cells. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e43826, 2012.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 196, n. 3, p. 59-67, 2012.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, n. 5756, p. 555, 1980.

World Health Organization. Cancer. WHO. Fact sheet n° 297. Feb 2014. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>. Acesso em: 22 ago 2018.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

WU, C. C. *et al.* Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 8, p. 1277-1285, 2005.

YAN, Y. Y. *et al.* The triterpenoid pristimerin induces U87 glioma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. **Oncology Letters**, v. 5, n. 1, p. 242-248, 2013.

YANG, C. P. H.; HORWITZ, S. B. Taxol®: The first microtubule stabilizing agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1733, 2017.

YELANI, T.; HUSSEIN, A. A.; MEYER, J. M. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 15, p. 1418-1425, 2010.

YOUSEF, B. A. *et al.* Pristimerin exhibits in vitro and in vivo anticancer activities through inhibition of nuclear factor- κ B signaling pathway in colorectal cancer cells. **Phytomedicine**, v. 40, p. 140-147, 2018.

YUN, S. H. *et al.* In vitro and in vivo anti-leukemic effects of cladoloxide C2 are mediated by activation of Fas/ceramide synthase 6/p38 kinase/c-Jun NH2-terminal kinase/caspase-8. **Oncotarget**, v. 9, n. 1, p. 495, 2018.

ZHANG, X. *et al.* Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: A key current imminent needs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2017.

ZHAO, H. *et al.* Pristimerin triggers AIF-dependent programmed necrosis in glioma cells via activation of JNK. **Cancer Letters**, v. 374, n. 1, p. 136-148, 2016.

ZHAO, M. *et al.* TSGene 2.0: an updated literature-based knowledgebase for tumor suppressor genes. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1023-D1031, 2015.

APÉNDICE



In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae)



Ana Carolina B. da C. Rodrigues^a, Felipe P. de Oliveira^a, Rosane B. Dias^a, Caroline B.S. Sales^b, Clarissa A.G. Rocha^a, Milena B.P. Soares^{a,c}, Emmanoel V. Costa^d, Felipe M.A. da Silva^d, Waldireny C. Rocha^e, Hector H.F. Koolen^f, Daniel P. Bezerra^{a,*}

^a Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, Bahia 40296-710, Brazil

^b Department of Biomorphology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador (UFBA), Bahia 40110-902, Brazil

^c Center of Biotechnology and Cell Therapy, Hospital São Rafael, Salvador, Bahia 41253-190, Brazil

^d Department of Chemistry, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas 69077-000, Brazil

^e Health and Biotechnology Institute, Federal University of Amazonas (UFAM), Coari, Amazonas 69460-000, Brazil

^f Metabolomics and Mass Spectrometry Research Group, Amazonas State University (UEA), Manaus, Amazonas 690065-130, Brazil

ARTICLE INFO

Chemical compounds examined in this article:

22-hydroxytingenone
5-fluorouracil
Doxorubicin
Pristimerin
Tingenone

Keywords:

Salacia impressifolia
Celastraceae
Anti-leukemia
HL-60

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (family Celastraceae) is a traditional medicinal plant found in the Amazon Rainforest known as “miraruíra”, “cipó-miraruíra” or “panu” and is traditionally used to treat dengue, flu, inflammation, pain, diabetes, male impotency, renal affections, rheumatism and cancer. **Aim of the study:** The aim of this study was to investigate in vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *S. impressifolia* in experimental models. **Materials and methods:** The in vitro cytotoxic activity of extracts, fractions and quinonemethide triterpenes (22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin) from the stem bark of *S. impressifolia* in cultured cancer cells was determined. The in vivo antitumor activity of the ethyl acetate extract (EAE) and of its fraction (FEAE.3) from the stem bark of *S. impressifolia* was assessed in C.B-17 severe combined immunodeficient (SCID) mice engrafted with human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Results:** The extract EAE, its fraction FEAE.3, and quinonemethide triterpenes exhibited potent cytotoxicity against cancer cell lines, including in vitro anti-leukemia activity against HL-60 and K-562 cells. Moreover, extract EAE and its fraction FEAE.3 inhibited the in vivo development of HL-60 cells engrafted in C.B-17 SCID mice. Tumor mass inhibition rates were measured as 40.4% and 81.5% for the extract EAE (20 mg/kg) and for its fraction FEAE.3 (20 mg/kg), respectively. **Conclusions:** Ethyl acetate extract and its fraction from the stem bark of *S. impressifolia* exhibit in vitro and in vivo anti-leukemia activity that can be attributed to their quinonemethide triterpenes. These data confirm the ethnopharmacological use of this species and may contribute to the development of a novel anticancer herbal medicine.

1. Introduction

The genus *Salacia* (family Celastraceae) includes approximately 200 species distributed throughout the Americas, Asia and Europe (Udayan et al., 2012). The genus is of great ethnopharmacological relevance, as numerous plants belonging to it exhibit pharmacological properties

including anti-diabetic (Stohs and Ray, 2015; Shirakawa et al., 2016), anti-hyperlipidemic (Stohs and Ray, 2015), immunomodulation (Oda et al., 2015), antiviral (Romero-Pérez et al., 2016; Ferreira et al., 2018), antioxidant (Ghadage et al., 2017), antimutagenicity (Carneiro et al., 2018) effects. In particular, anticancer potential has been reported for *S. oblonga* (Musini et al., 2015), *S. leptoclada* (Ruphin et al., 2013), *S.*

Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; ANOVA, analysis of variance; ATCC, American Type Culture Collection; CC, column chromatography; CTL, negative control; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOX, doxorubicin; EAE, ethyl acetate extract; FEAE.3, fraction of the ethyl acetate extract; FME.1, fraction of the methanol extract; HE, hexane extract; HPLC, high-performance liquid chromatography; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; INPA, National Institute of Research in the Amazon; IR, infrared; ME, methanol extract; NMR, nuclear magnetic resonance; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SCID, severe combined immunodeficient; UV, ultraviolet

* Correspondence to: Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail addresses: daniel.bezerra@fiocruz.br, danielpbezerra@gmail.com (D.P. Bezerra).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.008>

Received 10 July 2018; Received in revised form 18 October 2018; Accepted 3 November 2018

Available online 13 November 2018

0378-8741/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

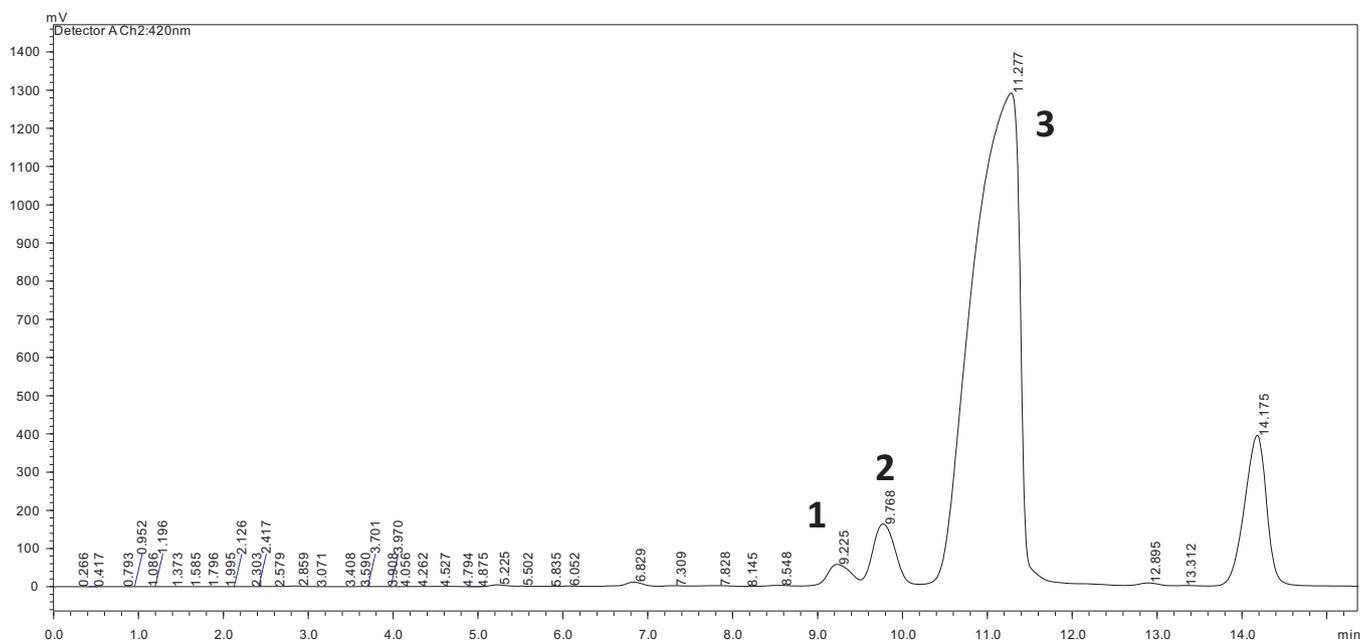


Fig. 1. Reverse phase semi-preparative chromatogram of fraction FEAE.3 at 420 nm.

verrucosa (Somwong et al., 2011), *S. madagascariensis* (Snedden, 1981) and *S. sp. near petenensis* (Setzer et al., 1998).

The species *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith is distributed throughout Central and South America and can be found in the Brazilian states of Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, and Mato Grosso (Lombardi, 2010). In Brazil, *S. impressifolia* is popularly known as “miraruíra” or “cipó-miraruíra,” and its stalks are used to treat inflammation and diabetes (Almeida, 1993; Lorenzi and Matos, 2002). In the Amazonian ethnic group Tacana from Bolivia, *S. impressifolia* is known as “panu,” and its bark is prepared by decoction to treat general body pain or is macerated in alcohol for use as general restorative medicine or to treat male impotency and rheumatic pain (Bourdy et al., 2000). Moreover, a syrup is prepared to treat kidney pain and the flu (Bourdy et al., 2000). In the Peruvian Amazon it is also known as “panu” and is used to treat dengue, renal affections, rheumatism and cancer (Brako and Zarucchi, 1993; Clavo et al., 2003).

Although several medicinal uses of *S. impressifolia* have been discovered, few scientific works have focused on this species, for which the antioxidant properties and some of its chemical constituents have been reported. The infusion extract drawn from stems of *S. impressifolia* has antioxidant effects (Santo et al., 2013; Manoel and Moya, 2015), and 15 compounds have been isolated from the trunk and twigs of *S. impressifolia*, among which pristimerin and tingenone have been isolated as major constituents along with friedelin, α -amyirin, β -amyirin, β -sitosterol, lupeol, 2-oxo-20(29)-lupen-3 β -ol, salicin B, 2 β ,3 β -dihydroxylup-20(29)-ene, 30-hydroxypristimerin, isoquaterin, 22-hydroxytingenone, regeol A, and netzahualcoyene (Silva et al., 2016). In addition, from *S. impressifolia* roots, friedelin, β -sitosterol, quinovic acid, cincholic acid, cincholic-3 β -O-6-deoxy- β -D-glucopyranoside acid, quinovic-3 β -O- β -D-glucopyranoside acid and celastrol have been isolated (Paz et al., 2018). The aim of this study was to investigate the in vitro and in vivo anti-leukemia activity of stem bark of *S. impressifolia* using experimental models.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Stems of a flowering specimen of *S. impressifolia* were collected in April 2014 from the jungle of the Adolpho Ducke Botanical Garden

(coordinates 2°56'58.2" S, 59°56'36.3" W) in the municipality of Manaus, Amazonas State, Brazil. The plant material was identified at the herbarium of the National Institute of Research in the Amazon (INPA) (voucher code #4699).

2.2. Preparation of extracts and compound purification

Air-dried and powdered plant material of *S. impressifolia* (900 g) was sequentially macerated at room temperature (c.a. 26 °C) with 2 L of *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol (3 x to each solvent). The resulting extracts were evaporated at lower pressure until dry to form *n*-hexane extract (HE, 12.5 g, 1.38%), ethyl acetate extract (EAE, 87.8 g, 9.75%), and methanol extract (ME, 102.2 g, 11.3%). Some EAE (15 g) was fractionated via silica gel column chromatography (CC) with increasing concentrations of dichloromethane-ethyl acetate (100:0, 50:50, and 0:100) and ethyl acetate-methanol (100:0, 50:50, and 0:100), forming six fractions of FEAE.1–6. A portion of extract ME (10 g) was subjected to silica gel CC with gradient systems of ethyl acetate-acetone (100:0, 50:50, and 0:100) and acetone-methanol (100:0, 50:50, and 0:100), forming six main fractions of FME.1–6. Some of the active fraction FEAE.3 (250 mg, 10 injections of 25 mg) was subjected to semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) purification using a Shimadzu ultra-fast liquid chromatograph (UFLC) system (Kyoto, Japan) with an isocratic elution consisting of acetonitrile/water 85:15 (v:v) fitted over a Shimadzu Shim-pack C18 reversed-phase column (10 mm \times 250 mm, 5 μ m) at a flow rate of 8.0 mL/min and UV detection at 420 nm. We in turn isolated 22-hydroxytingenone (**1**, t_R 9.22 min, 6.40 mg), tingenone (**2**, t_R 9.77 min, 11.0 mg), and pristimerin (**3**, 11.28 min, 53.5 mg) (Silva et al., 2016) (Fig. 1). The chemical structures of 22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin are shown in Fig. 2. Ultraviolet (UV), infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectra for pure compounds are available in the supplementary materials section (Figs. S1–13).

2.3. In vitro assays

2.3.1. Cells

Cancer cells MCF-7 (human breast adenocarcinoma), HCT116 (human colon carcinoma), HepG2 (human hepatocellular carcinoma), SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma), HSC-3 (human oral

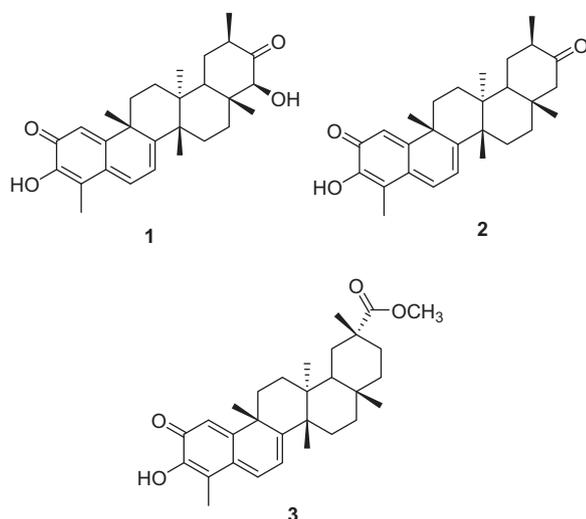


Fig. 2. Chemical structures of 22-hydroxytingenone (1), tingenone (2) and pristimerin (3).

squamous cell carcinoma), HL-60 (human promyelocytic leukemia), K-562 (human chronic myelogenous leukemia) and B16-F10 (mouse melanoma) and noncancerous cell MRC-5 (human lung fibroblast) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were cultured as recommended by the ATCC. Primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained using a standard ficoll density protocol, and the Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (Salvador, Bahia, Brazil) approved of the experimental protocol employed (#031019/2013). Cell viability was examined via trypan blue exclusion assay for all experiments.

2.3.2. Cytotoxicity assay

Cell viability was quantified using an Alamar blue assay and was performed following a procedure previously described (Ahmed et al., 1994). In brief, cells were inserted into 96-well plates for all experiments (7×10^4 cells/mL for adherent cells or 3×10^5 cells/mL for suspended cells in 100 μ L of medium). After 24 h the samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to each well and incubated for 72 h. Doxorubicin (purity $\geq 95\%$, doxorubicin hydrochloride, Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) was used as the positive control. Four (for cell lines) or 24 h (for PBMCs) before the end of incubation, 20 μ L of a stock solution (0.312 mg/mL) of Alamar blue (resazurin, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) was added to each well. Absorbance at 570 nm and 600 nm was measured using a SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), and the drug effect was quantified as the percentage of control absorbance.

2.4. In vivo assays

2.4.1. Animals

In total, 70 C.B-17 severe combined immunodeficient (SCID) mice (females, 25–30 g) were obtained and maintained at Gonçalo Moniz Institute-FIOCRUZ animal facilities (Salvador, Bahia, Brazil). Animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were subjected to a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). A local animal ethics committee approved of the experimental protocol employed (number #06/2015).

2.4.2. Human leukemia xenograft model

HL-60 cells (1.5×10^7 cells per 500 μ L) were implanted subcutaneously into the left front armpits of the mice. At the beginning of

the experiment, mice were randomly divided into five groups: group 1 animals received injections of vehicle with 5% DMSO solution ($n = 22$); group 2 animals received injections of doxorubicin (0.8 mg/kg, $n = 10$); group 3 animals received injections of 5-fluorouracil (15 mg/kg, Sigma-Aldrich, $n = 11$); group 4 animals received injections of EAE at 20 mg/kg ($n = 12$); and group 5 animals received injections of FEAE.3 at 20 mg/kg ($n = 10$). These doses were selected based in previous works using herbal extracts in vivo tumor models (Mousinho et al., 2011; Dória et al., 2016; Ferreira et al., 2016). When the tumors reached 100–200 mm³, the animals were treated through the intraperitoneal route (200 μ L per animal) once daily for 15 consecutive days. One day after the end of the treatment, the animals were anesthetized, and peripheral blood samples were collected from the brachial artery. Animals were euthanized by anesthetic overdose, and tumors were excised and weighed.

2.4.3. Toxicological evaluation

To assess toxicological effects, mice were weighed at the beginning and end of the experiment. Animals were observed for signs of abnormality throughout the study. A hematological analysis was performed using the Advia 60 hematology system (Bayer, Leverkusen, Germany). Livers, kidneys, lungs and hearts were removed, weighed and examined for signs of gross lesion formation, color change and/or hemorrhaging. After gross macroscopic examination, the tumors, livers, kidneys, lungs and hearts were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. Tissue sections were stained with hematoxylin–eosin and Periodic acid-Schiff (liver and kidneys), and histological analyses were performed under optical microscopy by an experienced pathologist.

2.5. Statistical analysis

Data are presented as means \pm S.E.M. or as half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) with 95% confidence intervals obtained by non-linear regression. Differences between the experimental groups were compared through an analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Intuitive Software for Science; San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. In vitro cytotoxicity

The in vitro cytotoxic activity of extracts EAE and ME and of their respective fractions FEAE.3 and FME.1 and quinonemethide triterpenes (22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin) from the stem bark of *S. impressifolia* was determined in cultured cancer cells (MCF-7, HCT116, HepG2, SCC-4, HSC-3, HL-60, K-562 and B16-F10) after 72 h of incubation using the alamar blue assay. Fig. 3 presents the cell survival curves obtained. Extract EAE, its fraction FEAE.3, and quinonemethide triterpenes 22-hydroxytingenone and tingenone showed the most potent levels of cytotoxicity.

IC₅₀ values of the cytotoxic activity of extracts EAE and ME and of respective fractions FEAE.3 and FME.1 are shown in Table 1. Extract EAE presented the lowest IC₅₀ value in the cancer cell MCF-7 (8.4 μ g/mL) and the highest IC₅₀ value in the cancer cell K-562 (29.5 μ g/mL) while extract ME showed IC₅₀ values of > 50 μ g/mL for all cancer cell lines tested. Fraction FEAE.3 presented the lowest IC₅₀ value in cancer cell HepG2 (0.1 μ g/mL) and the highest IC₅₀ value in cancer cell HSC-3 (0.8 μ g/mL), and fraction FME.1 presented the lowest IC₅₀ value in cancer cell HepG2/B16-F10 (0.5 μ g/mL) and the highest IC₅₀ value in cancer cell K-562 (1.0 μ g/mL).

IC₅₀ values reflecting the cytotoxic activity of quinonemethide triterpenes 22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin were also obtained and are shown in Table 2. 22-Hydroxytingenone presented the

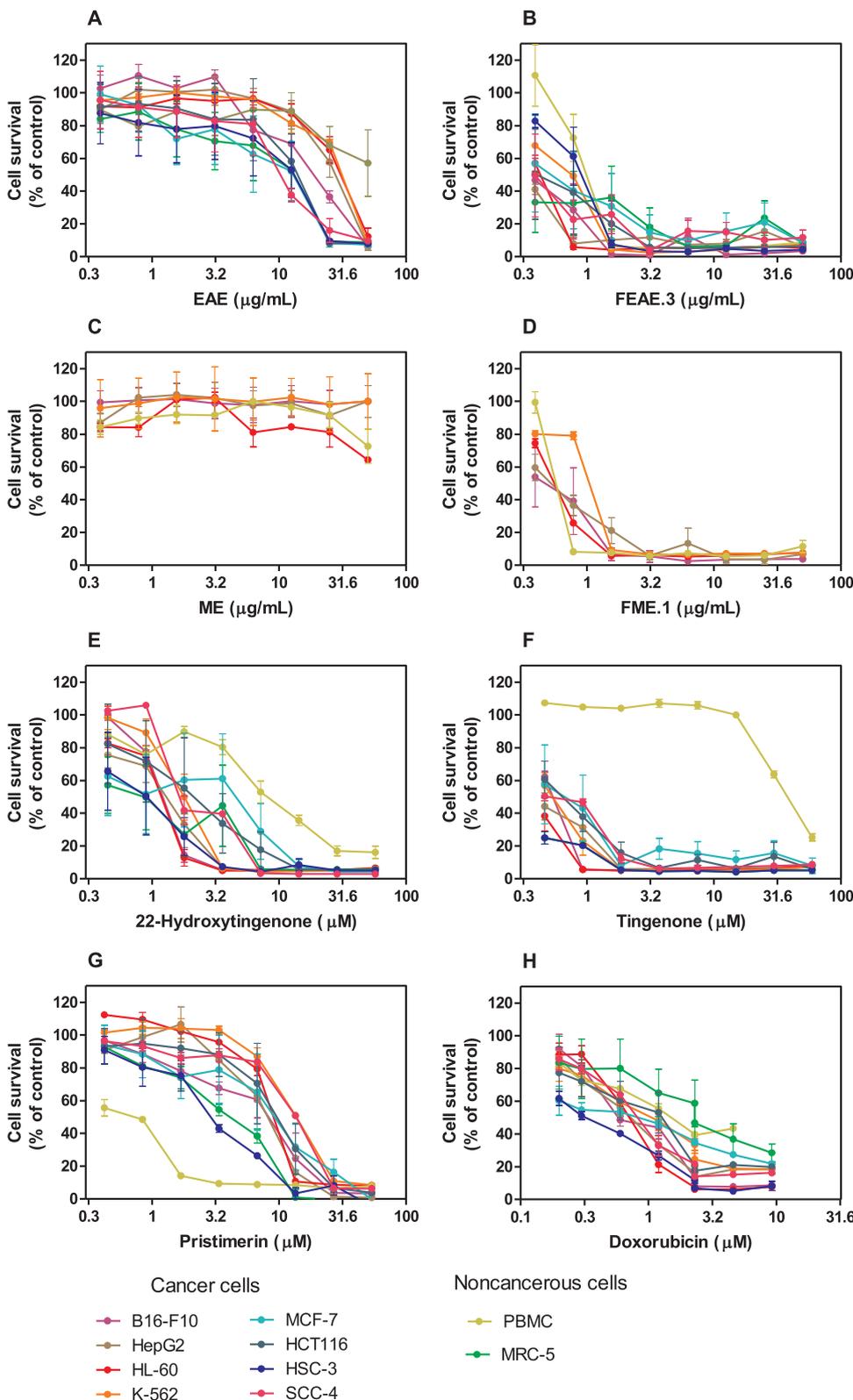


Fig. 3. Cell survival curves obtained from three independent experiments performed in duplicate and measured by alamar blue assay after 72 h of incubation. Cancer cells: MCF-7 (human breast adenocarcinoma); HCT116 (human colon carcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma); HSC-3 (human oral squamous cell carcinoma); HL-60 (human promyelocytic leukemia); K-562 (human chronic myelogenous leukemia); and B16-F10 (mouse melanoma). Noncancerous cells: MRC-5 (human lung fibroblast) and PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). EAE: Ethyl acetate extract. ME: Methanol extract. FEAE.3: Fraction of the ethyl acetate extract. FME.1: Fraction of the methanol extract.

lowest IC₅₀ value in cancer cell HSC-3 (0.8 µM) and the highest IC₅₀ value in cancer cell SCC-4 (2.0 µM). Tingenone presented the lowest IC₅₀ value in cancer cell HSC-3 (0.1 µM) and the highest IC₅₀ value in cancer cell HCT116/SCC-4 (0.6 µM). Finally, pristimerin presented the lowest IC₅₀ value in cancer cell HSC-3 (2.9 µM) and the highest IC₅₀ value in cancer cell SCC-4 (12.7 µM). Doxorubicin was used as the positive control and showed the lowest IC₅₀ value in cancer cell HSC-3

(0.3 µM) and the highest IC₅₀ value in cancer cell K-562 (1.0 µM).

In addition to applying a cytotoxicity assay of cancer cells, the cytotoxic effect of extracts EAE and ME, of their respective fractions FEAE.3 and FME.1 and of quinonemethide triterpenes was also evaluated in noncancerous cells (MRC-5 and PBMC), and were cytotoxic to these cells, indicating low selectivity for cancer cells. Doxorubicin, a clinically useful chemotherapy drug, also exhibited cytotoxicity to

Table 1
IC₅₀ values (in µg/mL) of the cytotoxic activity of the extracts and fractions from the stem bark of *Salacia impressifolia*.

Cells	IC ₅₀ (95% CI)			
	EAE	ME	FEAE.3	FME.1
Cancer cells				
MCF-7	8.4 (4.6–15.5)	N.d.	0.4 (0.1 – 2.0)	N.d.
HCT116	12.7 (8.3–19.5)	N.d.	0.4 (0.2 – 1.0)	N.d.
HepG2	26.6 (23.1–30.6)	> 50	0.1 (0.1–0.5)	0.5 (0.4–0.7)
SCC-4	10.4 (6.7–16.1)	N.d.	0.2 (0.1–1.2)	N.d.
HSC-3	9.8 (5.4–17.8)	N.d.	0.8 (0.7 – 1.0)	N.d.
HL-60	29.1 (25.4–33.4)	> 50	0.4 (0.4–0.5)	0.6 (0.5–0.6)
K-562	29.5 (26.0–33.4)	> 50	0.6 (0.6–0.8)	1.0 (0.9–1.2)
B16-F10	17.7 (14.4–21.7)	> 50	0.4 (0.3–0.6)	0.5 (0.3–0.7)
Noncancerous cells				
MRC-5	8.4 (4.6–15.2)	N.d.	0.1 (0.1–0.3)	N.d.
PBMC	> 50	> 50	0.9 (0.8–1.1)	0.6 (0.4–1.0)

Data are presented as IC₅₀ values, in µg/mL, with respective 95% confidence interval (95% CI) obtained by nonlinear regression from at the least three independent experiments performed in duplicate, measured by alamar blue assay after 72 h of incubation. Cancer cells: MCF-7 (human breast adenocarcinoma); HCT116 (human colon carcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma); HSC-3 (human oral squamous cell carcinoma); HL-60 (human promyelocytic leukemia); K-562 (human chronic myelogenous leukemia); and B16-F10 (mouse melanoma). Noncancerous cells: MRC-5 (human lung fibroblast) and PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). EAE: Ethyl acetate extract. ME: Methanol extract. FEAE.3: Fraction of the ethyl acetate extract. FME.1: Fraction of the methanol extract. N.d. Not determined.

noncancer cells.

The human leukemia HL-60 cell line is a cellular model often used to study of the antileukemia activity of new compounds (Magalhães et al., 2013; Yun et al., 2017; Calgarotto et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Moreover, this cell line is sensitive to extract EAE and to its fraction FEAE.3. Therefore, the cell line HL-60 was used in an in vivo study.

3.2. In vivo anti-leukemia activity

The in vivo anti-leukemia activity of extract EAE and of its fraction FEAE.3 drawn from the stem bark of *S. impressifolia* was investigated in C.B-17 SCID mice engrafted with HL-60 cells. The animals were treated with extract EAE (20 mg/kg) or with its fraction FEAE.3 (20 mg/kg)

Table 2

IC₅₀ values (in µM) of the cytotoxic activity of the quinonemethide triterpenes from the stem bark of *Salacia impressifolia*.

Cells	IC ₅₀ (95% CI)			
	22-Hydroxytingenone	Tingenone	Pristimerin	Doxorubicin
Cancer cells				
MCF-7	1.9 (0.7–5.3)	0.5 (0.2–1.4)	7.9 (4.7–13.4)	0.6 (0.5–0.8)
HCT116	2.0 (1.0–3.8)	0.6 (0.5–0.9)	9.4 (6.6–13.3)	0.9 (0.6–1.5)
HepG2	1.2 (1.0–1.4)	0.4 (0.3–0.6)	7.8 (6.8–8.9)	0.7 (0.6–0.9)
SCC-4	2.2 (1.7–2.8)	0.6 (0.4–0.8)	12.7 (10.9–14.8)	0.8 (0.7 – 1.0)
HSC-3	0.8 (0.5–1.3)	0.1 (0.1–0.3)	2.9 (2.3–3.7)	0.3 (0.3–0.4)
HL-60	1.1 (1.1–1.3)	0.4 (0.3–0.5)	8.8 (7.8–10.1)	0.7 (0.6–0.8)
K-562	1.8 (1.5–2.0)	0.5 (0.5–0.6)	13.6 (12.3–15.0)	1.0 (0.8–1.2)
B16-F10	1.2 (1.1–1.3)	0.5 (0.5–0.5)	6.3 (4.7–8.4)	0.7 (0.6–0.9)
Noncancerous cells				
MRC-5	0.8 (0.3–1.9)	0.1 (0.1–0.2)	3.5 (2.9–4.2)	2.6 (1.4–4.9)
PBMC	8.6 (6.5–11.2)	38.5 (34.1–43.6)	0.6 (0.4–0.7)	1.7 (1.3–2.1)

Data are presented as IC₅₀ values, in µM, with respective 95% confidence interval (95% CI) obtained by nonlinear regression from at the least three independent experiments performed in duplicate, measured by alamar blue assay after 72 h of incubation. Cancer cells: MCF-7 (human breast adenocarcinoma); HCT116 (human colon carcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma); HSC-3 (human oral squamous cell carcinoma); HL-60 (human promyelocytic leukemia); K-562 (human chronic myelogenous leukemia); and B16-F10 (mouse melanoma). Noncancerous cells: MRC-5 (human lung fibroblast); and PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). Doxorubicin was used as the positive control.

through intraperitoneal injections delivered once a day for 15 consecutive days. By the end of the treatment, the mean tumor mass weight of the negative control animals was 5.23 ± 0.49 g (Fig. 4A). In EAE-treated animals, the mean tumor mass weights was 3.12 ± 0.320 while it was measured as 0.97 ± 0.41 g for animals treated with fraction FEAE.3. Tumor mass inhibition was measured as 40.4% and 81.5% for extract EAE and its fraction FEAE.3, respectively (Fig. 4B). The positive controls (0.8 mg/kg doxorubicin and 15 mg/kg 5-fluorouracil) reduced the tumor weight by 70.7% and 53.9%, respectively.

A histology analysis of the tumors was also performed (Fig. 4C). We observed loose clusters of atypical cells of myeloid lineage exhibiting blast appearance, loose chromatin, clear nucleoli, basophilic cytoplasm, and varying degrees of cytoplasmic granulation in all experimental groups. Although necrosis and apoptosis were observed in all of the groups, we observed more karyorrhexis and apoptosis in the doxorubicin and FEAE.3 groups. In addition, the occurrence of bleeding was an important finding for the EAE and FEAE.3 groups.

Toxicological factors were also assessed in C.B-17 SCID mice with HL-60 cell xenografts. A decrease in body weight was observed in the animals treated with EAE, FEAE.3 and doxorubicin ($P < 0.05$). No significant alterations were observed in the liver, kidney, lung or heart wet weights of any group ($P > 0.05$) (Table 3). Hematological parameters of peripheral blood drawn from C.B-17 SCID mice with HL-60 cell xenografts were analyzed (Table 4). All hematological parameters remained unchanged after treatment with EAE and FEAE.3 ($P > 0.05$). On the other hand, a decline in the number of platelets and hematocrit in the doxorubicin group was observed when compared to those of the negative control group ($P < 0.05$).

Morphological analyses of liver, kidney, lung, and heart tissue for each group were also conducted (Fig. S14). In liver tissue, the acinar architecture and centrilobular vein were preserved in all groups. Inflammation observed in the liver portal space was discrete in most animals. Other symptoms such as congestion and hydropic degeneration were found in all groups at mild to moderate levels. In addition, focal areas of coagulation necrosis were observed in all groups and metastatic nodules were detected in all animals of group FEAE.3.

In the kidneys of animals, histopathological changes involved vascular congestion and the thickening of the basal membrane of the renal glomerulus with decreased urinary space, which were observed in all groups treated with the compounds. Furthermore, discrete coagulation necrosis was observed in the medullary region of the kidneys of certain animals treated with doxorubicin and 5-fluorouracil. However, tissue architectures were maintained in all experimental groups.

In the lungs, architectures of the parenchyma ranged from partially

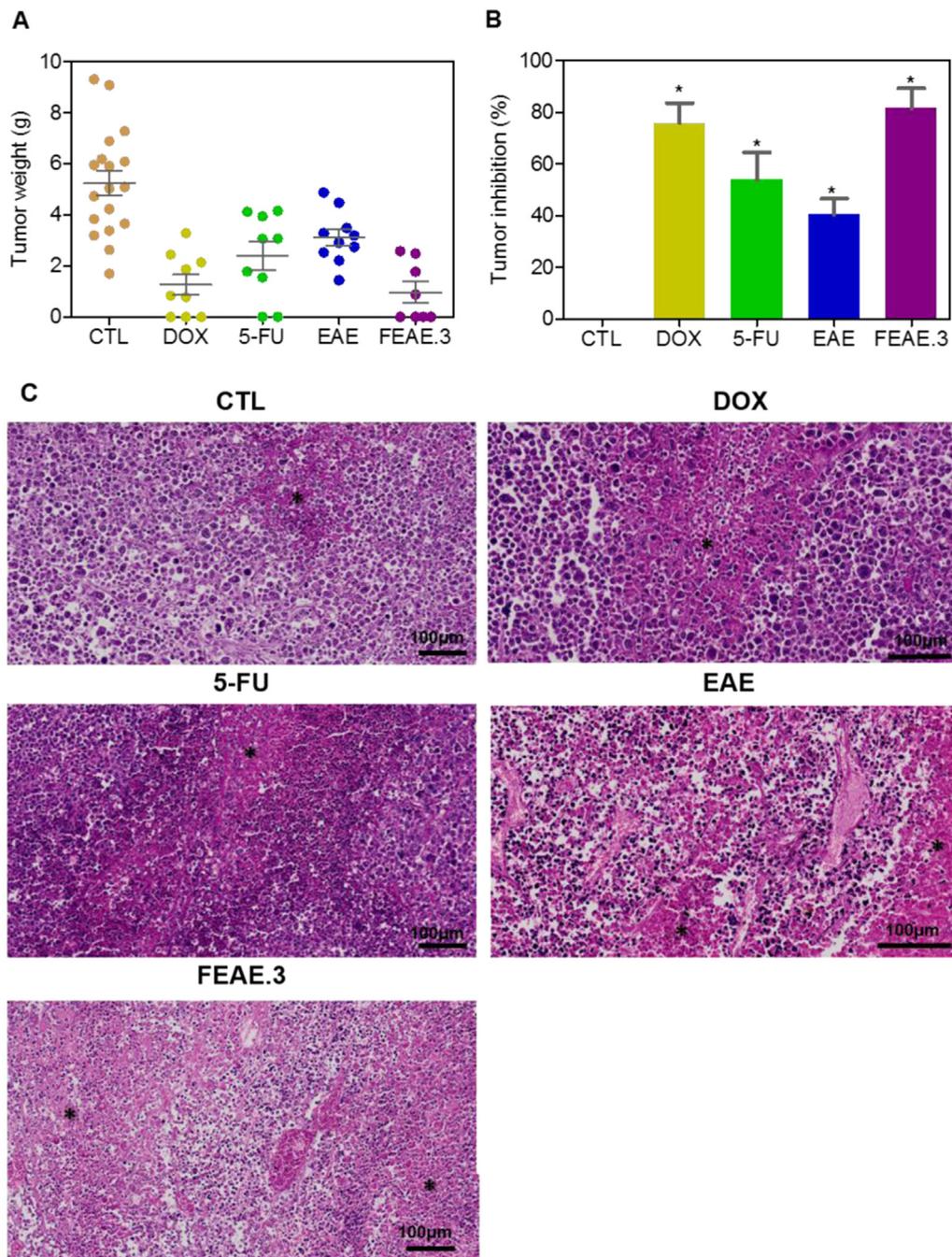


Fig. 4. In vivo antitumor activity of the ethyl acetate extract (EAE) and of its fraction (FEAE.3) from the stem bark of *Salacia impressifolia* in C.B-17 SCID mice with HL-60 cell xenografts. (A) Tumor weight (g) after treatment. (B) Tumor inhibition (%) after treatment. Data are presented as means \pm S.E.M. of 8–21 animals. * $P < 0.05$ compared to the negative control by ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test. (C) Representative histological analysis of tumors stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy (bar = 100 μ m). The asterisks represent areas with tumor necrosis. When the tumors reached 100–200 mm³, the animals were treated through the intraperitoneal route for 15 consecutive days with EAE (20 mg/kg) and FEAE.3 (20 mg/kg). The negative control (CTL) was treated with the vehicle (5% DMSO) used to dilute the tested substances. Doxorubicin (DOX, 0.8 mg/kg) and 5-fluorouracil (5-FU, 15 mg/kg) were used as positive controls.

Table 3

Effect of the ethyl acetate extract (EAE) and of its fraction (FEAE.3) from the stem bark of *Salacia impressifolia* on body and relative organ weight from C.B-17 SCID mice with HL-60 cell xenografts.

Parameters	CTL	DOX	5-FU	EAE	FEAE.3
Dose (mg/kg)	–	0.8	15	20	20
Survival	21/22	10/10	11/11	12/12	8/10
Initial body weight (g)	24.5 \pm 0.2	24.5 \pm 0.3	25.4 \pm 0.6	24.0 \pm 0.5	23.5 \pm 0.6
Final body weight (g)	25.6 \pm 0.4	20.3 \pm 0.7 [*]	25.6 \pm 0.4	22.5 \pm 0.8 [*]	17.6 \pm 0.5 [*]
Liver (g/100 g body weight)	5.5 \pm 0.3	5.5 \pm 0.4	5.3 \pm 0.3	5.7 \pm 0.4	4.6 \pm 0.4
Kidney (g/100 g body weight)	1.4 \pm 0.04	1.6 \pm 0.1	1.4 \pm 0.04	1.4 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1
Heart (g/100 g body weight)	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.04	0.5 \pm 0.02	0.5 \pm 0.04	0.7 \pm 0.1
Lung (g/100 g body weight)	0.7 \pm 0.02	0.8 \pm 0.03	0.7 \pm 0.04	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1

When the tumors reached 100–200 mm³, the animals were treated through the intraperitoneal route for 15 consecutive days. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (5% DMSO) used to dilute the tested substances. Doxorubicin (DOX) and 5-fluorouracil (5-FU) were used as positive controls. Data are presented as means \pm S.E.M. of 8–21 animals.

* $P < 0.05$ compared to the negative control by ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Table 4

Effect of the ethyl acetate extract (EAE) and of its fraction (FEAE.3) from the stem bark of *Salacia impressifolia* on hematological parameters of peripheral blood from C.B-17 SCID mice with HL-60 cell xenografts.

Parameters	Non-tumor	CTL	DOX	5-FU	EAE	FEAE.3
Dose (mg/kg)	–	–	0.8	15	20	20
Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³)	10.8 ± 0.2	10.0 ± 0.3	10.1 ± 0.5	9.4 ± 0.3	10.3 ± 0.3	10.8 ± 0.6
Hemoglobin (g/dL)	13.7 ± 0.2	13.9 ± 0.5	12.2 ± 0.3	12.1 ± 0.8	12.8 ± 0.3	14.2 ± 0.7
Hematocrit (%)	56.0 ± 1.0	52.0 ± 1.1	46.0 ± 1.5 [†]	47.3 ± 0.6	50.1 ± 1.3	48.8 ± 3.4
MCV (fL)	54.0 ± 0.3	47.8 ± 0.3	46.4 ± 0.4	47.9 ± 0.3	49.1 ± 0.1	47.6 ± 0.5
Platelets (10 ³ /mm ³)	750.8 ± 41.0	759.6 ± 111.9	343.0 ± 65.9 [†]	479.9 ± 47.9	654.0 ± 39.0	506.1 ± 50.6
Leukocytes (10 ³ /mm ³)	1.4 ± 0.3	3.4 ± 0.6	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.2	4.8 ± 1.4	5.4 ± 1.2
Differential leukocytes (%)						
Granulocytes	17.2 ± 4.5	36.3 ± 3.1	37.6 ± 3.5	36.0 ± 4.1	45.9 ± 8.7	50.1 ± 1.8
Lymphocytes	64.6 ± 4.7	24.0 ± 3.5	36.0 ± 6.6	39.3 ± 7.0	27.8 ± 10.9	8.0 ± 0.7
Monocytes	18.3 ± 0.2	32.9 ± 1.8	26.5 ± 5.1	24.5 ± 2.9	26.1 ± 3.2	41.8 ± 1.7

Non-tumor group represents C.B-17 SCID mice without tumor inoculation or any treatment. When the tumors reached 100–200 mm³, the animals were treated through the intraperitoneal route for 15 consecutive days. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (5% DMSO) used to dilute the tested substances. Doxorubicin (DOX) and 5-fluorouracil (5-FU) was used as positive controls. Data are presented as means ± S.E.M. of 5–13 animals.

* $P < 0.05$ compared with to negative control by ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test. MCV: Mean Corpuscular Volume.

maintained to modified in all groups. Histopathological changes observed in all animals ranged from mild to severe. Significant acute inflammation, edema, congestion, hemorrhaging, and the thickening of the alveolar septum with decreased airspace were frequently observed. A histopathological analysis of animal hearts did not reveal alterations in any group.

Interestingly, most of these histopathological alterations, including those involving hydropic degeneration, vascular congestion and focal areas of inflammation, are acute cellular responses. Therefore, when treatment is concluded, the organism can return to a state of homeostasis, as most of these disturbances are reversible.

4. Discussion

Medicinal plants have traditionally been used in the realms of anticancer drug discovery and development. The discovery and development of standardized extracts or fractions and of single pure compounds isolated from medicinal plants with cytotoxicity are central to cancer treatment. The present work is the first to describe the in vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *S. impressifolia*. Although this species is of ethnopharmacological relevance to the treatment of several diseases (e.g., cancer treatment), scientific works have only investigated its antioxidant and chemical constituents.

Extract EAE, fractions FEAE.3 and FME.1, and quinonemethide triterpenes (22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin) in the stem bark of *S. impressifolia* exhibit potent cytotoxicity against a small panel of cancer cell lines representative of colon, breast, liver, tongue, gastric, skin and hematological cancers, including in vitro anti-leukemia activity against HL-60 and K-562 cells. According to our anticancer screening program, which complements the anticancer screening program of the National Cancer Institute of the United States of America, a crude extract with IC₅₀ values of below 30 µg/mL and a lead compound with IC₅₀ values of below 4 µg/mL in cancer cell line-based assays are considered promising as tools of anticancer drug development (Suffness and Pezzuto, 1990; Ribeiro et al., 2012; Bezerra et al., 2015; Silva et al., 2016; Dória et al., 2016). Extract EAE, fraction FEAE.3 and fraction FME.1 present IC₅₀ values of below 30 µg/mL and quinonemethide triterpenes (22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin) present IC₅₀ values of below 4 µg/mL, denoting their cytotoxicity. In particular, extract EAE, its fraction FEAE.3, and quinonemethide triterpenes 22-hydroxytingenone and tingenone exhibit the highest levels of cytotoxicity, and although they exhibit low levels of selectivity, they affect noncancerous cells when the power equivalent of the positive control is used (doxorubicin).

Like the cytotoxic effect observed for *S. impressifolia* extracts, methanolic aerial and root extracts of *S. oblonga* exhibit cytotoxic

properties with IC₅₀ values of 35 and 44 µg/mL for breast cancer cells (MDA-MB-231), respectively (Musini et al., 2015). In *S. impressifolia* extracts, this effect is associated with quinonemethide triterpenes 22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin, which also exhibit potent cytotoxicity. Tingenone and pristimerin are known to inhibit the cell growth of human myeloma RPMI8226 cells due to their ability to inhibit the polymerization of tubulin (Morita et al., 2008). Works on pristimerin also illustrate its capacity to exhibit cytotoxicity through the inhibition of the nuclear factor-κB signaling pathway in HCT-116 cells (Yousef et al., 2018), to induce caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells (Wu et al., 2005) and to induce apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction in U87 glioma cells (Yan et al., 2013).

Extract EAE and its fraction FEAE.3 also inhibit the in vivo development of HL-60 cells engrafted in C.B-17 SCID mice. Pristimerin, a quinonemethide triterpene found in extract EAE, and its fraction FEAE.3 are also known to inhibit the in vivo development of HCT-116 cells engrafted in nude mice through the inhibition of NF-κB expression accompanied with the significant suppression of p65 phosphorylation p65 phosphorylation (Yousef et al., 2018). The inhibition of glioma growth in nude mice in vivo with subcutaneous xenograft glioma and the inhibition of a plasmacytoma grown from xenografted myeloma cells in nude mice has also previously been reported in relation to pristimerin treatment (Tiedemann et al., 2009; Zhao et al., 2016). Quinonemethide triterpenes 22-hydroxytingenone and tingenone, which are also found in extract EAE and in its fraction FEAE.3, have not previously been evaluated in an in vivo cancer xenograft model; however, they are potent cytotoxic agents and must contribute to the in vivo antileukemia activity of extract EAE and of its fraction FEAE.3.

Concerning the toxicity of these drugs, some unexpected effects were found in the drug-treated animals, including metastatic nodules in animals treated with fraction FEAE.3 and a reduction of body weight in animals treated with extract EAE and with its fraction FEAE.3, indicating toxicity. In our in vitro study we also observed the low selectivity of these drugs to cancer cells versus noncancerous cells. Thus, while these herbal drugs can suppress tumor growth in vivo, their toxicity may compromise their development as anticancer agents. On the other hand, currently used cancer chemotherapeutic drugs present severe levels of toxicity and cannot be applied to treat many forms of cancer such as acute myeloid leukemia. The development of new anticancer candidates is urgently needed, and even drugs with certain levels of toxicity can be tolerated. Moreover, no changes in organ weight were observed from our hematological analysis of peripheral blood in animals treated with extract EAE and with its fraction FEAE.3.

5. Conclusion

This study shows that ethyl acetate extract and its fraction from the stem bark of *S. impressifolia* exhibits in vitro and in vivo anti-leukemia activity that can be attributed to its quinonemethide triterpenes (22-hydroxytingenone, tingenone and pristimerin). These data confirm the ethnopharmacological use of this species and may contribute to the development of new anticancer herbal medicines.

CRedit authorship contribution statement

Ana Carolina B. da C. Rodrigues: Conceptualization, Methodology, Formal analysis. **Felipe P. de Oliveira:** Methodology, Formal analysis. **Rosane B. Dias:** Methodology, Formal analysis. **Caroline B.S. Sales:** Methodology, Formal analysis. **Clarissa A.G. Rocha:** Methodology, Formal analysis. **Milena B.P. Soares:** Methodology, Formal analysis. **Emmanuel V. Costa:** Methodology, Formal analysis. **Felipe M.A. da Silva:** Methodology, Formal analysis. **Waldireny C. Rocha:** Methodology. **Hector H.F. Koolen:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis. **Daniel P. Bezerra:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft.

Acknowledgments

The authors are grateful to the histotechnology core of FIOCRUZ-Bahia for performing the histological studies. This work was financially supported by Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jep.2018.11.008.

References

- Ahmed, S.A., Gogal Jr., R.M., Walsh, J.E., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* 170, 211–224.
- Almeida, E.R., 1993. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. Hemus Editora, São Paulo, pp. 341.
- Bezerra, D.P., Ferreira, P.M., Machado, C.M., de Aquino, N.C., Silveira, E.R., Chammas, R., Pessoa, C., 2015. Antitumor efficacy of *Piper tuberculatum* and piplartine based on the hollow fiber assay. *Planta Med.* 81, 15–19.
- Bourdy, G., DeWalt, S.J., Michel, L.R.C., Roca, A., Deharo, E., Muñoz, V., Balderrama, L., Quenevo, C., Gimenez, A., 2000. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *J. Ethnopharmacol.* 70, 87–109.
- Brako, L., Zarucchi, J.L., 1993. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Peru. *Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 1286.
- Calgarotto, A.K., Maso, V., Junior, G.C.F., Nowill, A.E., Filho, P.L., Vassallo, J., Saad, S.T.O., 2018. Antitumor activities of quercetin and green tea in xenografts of human leukemia HL60 cells. *Sci. Rep.* 8, 3459.
- Carneiro, C.C., Vêras, J.H., Góes, B.R.L., Pérez, C.N., Chen-Chen, L., 2018. Mutagenicity and antimutagenicity of *Salacia crassifolia* (mart. Ex. Schult.) G. Don. evaluated by Ames test. *Braz. J. Biol.* 78, 345–350.
- Clavo, Z.M.P., Cardenas, Z.P.S., Orihuela, A.O., 2003. Plantas medicinales: usadas por mujeres nativas y mestizas en la región Ucayali. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria, Cali (Colombia) Centro de Investigación y Divulgación en Sistemas Sostenibles Tropicales de Producción Agropecuaria, Guanare (Venezuela).
- Dória, G.A., Menezes, P.P., Lima, B.S., Vasconcelos, B.S., Silva, F.A., Henriques, R.M., Melo, M.G., Alves, Â.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., Carvalho, A.A., Prata, A.P., Junior, R.L., Lima-Verde, I.B., Quintans-Júnior, L.J., Bezerra, D.P., Nogueira, P.C., Araujo, A.A., 2016. In vivo antitumor effect, induction of apoptosis and safety of *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae) extracts. *Phytomedicine* 23, 914–922.
- Ferreira, P.G., Ferraz, A.C., Figueiredo, J.E., Lima, C.F., Rodrigues, V.G., Taranto, A.G., Ferreira, J.M.S., Brandão, G.C., Vieira-Filho, S.A., Duarte, L.P., Magalhães, C.L.B., Magalhães, J.C., 2018. Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. *Arch. Virol.* 163, 1567–1576.
- Ferreira, P.M.P., Bezerra, D.P., Silva, J.D.N., Costa, M.P., Ferreira, J.R.O., Alencar, N.M.N., Figueiredo, I.S.T., Cavalheiro, A.J., Machado, C.M.L., Chammas, R., Alves, A.P.N.N., Moraes, M.O., Pessoa, C., 2016. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. *J. Ethnopharmacol.* 186, 270–279.
- Ghadage, D.M., Kshirsagar, P.R., Pai, S.R., Chavan, J.J., 2017. Extraction efficiency, phytochemical profiles and antioxidative properties of different parts of Saptarangi (*Salacia chinensis* L.) - An important underutilized plant. *Biochem. Biophys. Rep.* 12, 79–90.
- Lombardi, J., 2010. Notas nomenclaturais em Salacioideae (Celastraceae). *Rodriguésia* 61, 123–125.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas, Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Magalhães, H.L., Wilke, D.V., Bezerra, D.P., Cavalcanti, B.C., Rotta, R., de Lima, D.P., Beatriz, A., Moraes, M.O., Diniz-Filho, J., Pessoa, C., 2013. (4-Methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone inhibits tubulin polymerization, induces G₂/M arrest, and triggers apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 117–126.
- Manoel, H.R., Moya, H.D., 2015. A comprehensive study of the use of Cu(I)/4,4'-di-carboxy-2,2'-biquinoline complexes to measure the total reducing capacity: application in herbal extracts. *Molecules* 20, 22411–22421.
- Morita, H., Hirasawa, Y., Muto, A., Yoshida, T., Sekita, S., Shirota, O., 2008. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1050–1052.
- Mousinho, K.C., Oliveira, C.C., Ferreira, J.R., Carvalho, A.A., Magalhães, H.I., Bezerra, D.P., Alves, A.P., Costa-Lotuf, L.V., Pessoa, C., Matos, M.P., Ramos, M.V., Moraes, M.O., 2011. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel - Apocynaceae. *J. Ethnopharmacol.* 137, 421–426.
- Musini, A., Rao, J.P., Giri, A., 2015. Phytochemicals of *Salacia oblonga* responsible for free radical scavenging and antiproliferative activity against breast cancer cell lines (MDA-MB-231). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 21, 583–590.
- Oda, Y., Ueda, F., Utsuyama, M., Kamei, A., Kakinuma, C., Abe, K., Hirokawa, K., 2015. Improvement in human immune function with changes in intestinal microbiota by *Salacia reticulata* extract ingestion: a randomized placebo-controlled trial. *PLoS One* 10, e0142909.
- Oliveira, M.S., Santana, Á.A.D., Correa, R.S., Soares, M.B.P., Batista, A.A., Bezerra, D.P., 2018. Ru(II)-thymine complex causes cell growth inhibition and induction of caspase-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, E1609.
- Paz, W.H.P., Silva, F.M.A., da Silva-Filho, F.A., Almeida, R.A., Pinheiro, M.L.B., Koolen, H.H.F., 2018. Triterpenes from the roots of *Salacia impressifolia*. *Chem. Nat. Compd.* 54, 200–201.
- Ribeiro, S.S., Jesus, A.M., Anjos, C.S., Silva, T.B., Santos, A.D., Jesus, J.R., Andrade, M.S., Sampaio, T.S., Gomes, W.F., Alves, P.B., Carvalho, A.A., Pessoa, C., Moraes, M.O., Pinheiro, M.L., Prata, A.P., Blank, A.F., Silva-Mann, R., Moraes, V.R., Costa, E.V., Nogueira, P.C., Bezerra, D.P., 2012. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. *Planta Med.* 78, 1601–1606.
- Romero-Pérez, G.A., Egashira, M., Harada, Y., Tsuruta, T., Oda, Y., Ueda, F., Tsukahara, T., Tsukamoto, Y., Inoue, R., 2016. Orally administered *Salacia reticulata* extract reduces H1N1 influenza clinical symptoms in murine lung tissues putatively due to enhanced natural killer cell activity. *Front. Immunol.* 7, 115.
- Ruphin, F.P., Baholy, R., Emmanue, A., Amelie, R., Martin, M.T., Koto-te-Nyiwa, N., 2013. Antiplasmodial, cytotoxic activities and characterization of a new naturally occurring quinone methide pentacyclic triterpenoid derivative isolated from *Salacia leptoclada* Tul. (Celastraceae) originated from Madagascar. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 780–784.
- Santo, M.G., Nunez, C.V., Moya, H.D., 2013. A new method for quantification of total polyphenol content in medicinal plants based on the reduction of Fe(III)/1,10-phenanthroline complexes. *Adv. Biol. Chem.* 3, 525–535.
- Setzer, W.N., Setzer, M.C., Hopper, A.L., Moriarity, D.M., Lehrman, G.K., Niekamp, K.L., Morcomb, S.M., Bates, R.B., McClure, K.J., Stessman, C.C., Haber, W.A., 1998. The cytotoxic activity of a *Salacia liana* species from Monteverde, Costa Rica, is due to a high concentration of tingenone. *Planta Med.* 64, 583.
- Shirakawa, J., Arakawa, S., Tagawa, T., Gotoh, K., Oikawa, N., Ohno, R., Shinagawa, M., Hatano, K., Sugawa, H., Ichimaru, K., Kinoshita, S., Furusawa, C., Yamanaka, M., Kobayashi, M., Masuda, S., Nagai, M., Nagai, R., 2016. *Salacia chinensis* L. extract ameliorates abnormal glucose metabolism and improves the bone strength and accumulation of AGEs in type 1 diabetic rats. *Food Funct.* 7, 2508–2515.
- Silva, T.B., Costa, C.O., Galvão, A.F., Bomfim, L.M., Rodrigues, A.C., Mota, M.C., Dantas, A.A., Santos, T.R., Soares, M.B., Bezerra, D.P., 2016. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 199.
- Snedden, A.T., 1981. Isoiguesterin, a new antileukemic bisnortriterpene from *Salacia madagascariensis*. *J. Nat. Prod.* 44, 503–507.
- Somwong, P., Suttisri, R., Buakeaw, A., 2011. A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. *Fitoterapia* 82, 1047–1051.
- Stohs, S.J., Ray, S., 2015. Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic effects and safety of *Salacia reticulata* and related species. *Phytother. Res.* 29, 986–995.
- Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London, pp. 71–133.

- Tiedemann, R.E., Schmidt, J., Keats, J.J., Shi, C.X., Zhu, Y.X., Palmer, S.E., Mao, X., Schimmer, A.D., Stewart, A.K., 2009. Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF-kappaB with antimyeloma activity in vitro and in vivo. *Blood* 113, 4027–4037.
- Udayan, P.S., Yohannan, R., Devipriya, M.S., Devipriya, V., 2012. A new species of *Salacia* (Hippocrateaceae) from South India. *Edinb. J. Bot.* 69, 255–258.
- Wu, C.C., Chan, M.L., Chen, W.Y., Tsai, C.Y., Chang, F.R., Wu, Y.C., 2005. Pristimerin induces caspase-dependent apoptosis in MDA-MB-231 cells via direct effects on mitochondria. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1277–1285.
- Yan, Y.Y., Bai, J.P., Xie, Y., Yu, J.Z., Ma, C.G., 2013. The triterpenoid pristimerin induces U87 glioma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *Oncol. Lett.* 5, 242–248.
- Yousef, B.A., Hassan, H.M., Zhang, L.Y., Jiang, Z.Z., 2018. Pristimerin exhibits in vitro and in vivo anticancer activities through inhibition of nuclear factor-kB signaling pathway in colorectal cancer cells. *Phytomedicine* 40, 140–147.
- Yun, S.H., Sim, E.H., Han, S.H., Kim, T.R., Ju, M.H., Han, J.Y., Jeong, J.S., Kim, S.H., Silchenko, A.S., Stonik, V.A., Park, J.I., 2017. In vitro and in vivo anti-leukemic effects of cladolose C₂ are mediated by activation of Fas/ceramide synthase 6/p38 kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase/caspase-8. *Oncotarget* 9, 495–511.
- Zhao, H., Wang, C., Lu, B., Zhou, Z., Jin, Y., Wang, Z., Zheng, L., Liu, K., Luo, T., Zhu, D., Chi, G., Luo, Y., Ge, P., 2016. Pristimerin triggers AIF-dependent programmed necrosis in glioma cells via activation of JNK. *Cancer Lett.* 374, 136–148.